

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie

Option : Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives

Thème

**Activité biologique *in vitro* des extraits de
Pistacia lentiscus contre les radicaux $ABTS^{\bullet+}$, $O_2^{\bullet-}$ et $\bullet NO$
et caractérisation des fractions actives**

Présenté par

M^{elle} CHERAFT Nassima

Devant le jury :

Président :	M ^f IGUEROUADA M.	Professeur (Université de Bejaia)
Promoteur :	M ^f ATMANI D.	Professeur (Université de Bejaia)
Examineurs :	M ^{me} BEDJOU F.	Maître de conférences A (Université de Bejaia)
	M ^f TAMENDJARI A.	Maître de conférences A (Université de Bejaia)

Année 2011



Remerciements

Au terme de ce modeste travail ;

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Monsieur le Professeur ATMANI Djebbar mon enseignant avant d'être mon promoteur de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de Biochimie Appliquée pour la deuxième fois après la réalisation du mémoire de fin de cycle (DES). Je le remercie de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé dans mes premiers pas dans la recherche. Je lui suis très reconnaissante pour sa rigueur scientifique sans faille qui m'a remise de nombreuses fois dans le droit chemin, pour ses suggestions et ses conseils éclairés et disponibilité constante malgré ses tâches administratives et ses multiples responsabilités. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères pour tout le temps qu'il m'a consacré.

Je suis très honorée que Monsieur le Professeur IGUER-OUADA M. ait voulu accepter de présider le jury et d'évaluer ce travail, je le remercie de m'avoir permis d'effectuer des manipulations dans son laboratoire.

Mes sincères considérations et remerciements sont également exprimés pour mes enseignants : Madame le Docteur BEDJOUF, et Monsieur Docteur TAMANDJARI A. qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail et de consacrer de leurs temps pour son évaluation.

J'associe mes vifs remerciements à tous les membres de l'équipe du laboratoire de Biochimie Appliquée : Mme ATMANI, Mme DEBACHE, Mme OUAHMED, M^{elle} AYOUNI, Mme RAHMANI, M^{elle} CHAHER, M^{elle} LOUNIS, M^{elle} LAIB, M^{elle} SEBAIHI, M^{elle} REMILA, M^{elle} MOULAOUI et M^{elle} SAIDENE, pour leurs qualités humaines et scientifiques, disponibilités et orientations, pendant toute la période de réalisation de ce travail. Merci aussi pour l'ambiance amicale et détendue qu'elles ont su faire régner au laboratoire qui sans tous ça, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Je veux remercier du fond du cœur ma camarade de travail SONIA, avec qui j'ai partagé les bons et difficiles moments des deux ans de pratique, pour cette expérience humaine très enrichissante pour moi, son aide et son soutien continu merci pour tous les bons moments partagés.

Un grand merci à Mr HAMOUM et Mr BOUCHENOUA pour leur aide et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biophysique où plusieurs manipulations de mon travail ont été effectuées. J'aimerais aussi remercier tous les membres du corps technique de la faculté de biologie, techniciens et ingénieurs de laboratoire particulièrement M^{me} KHERBACHI, M^{elle} BENSLIMANE S. et Mr AMROUCHE.

Je remercie également les personnes qui me sont très chères et en particulier, mon amie sœur SALIHA d'être toujours là pour moi et de trouver les mots qu'il faut quand ça ne va pas, merci pour ton soutien permanent mais surtout pour ta pure amitié. Comme Je remercie mes amis d'enfance HALIM et KAHINA pour leurs soutiens et encouragements malgré la distance qui nous sépare, sans oublier SAMIRA, DJOUDI et YUBA pour leurs aides et encouragements.

Mes sincères remerciements vont également à mes ex-collègues de travail du laboratoire d'analyse médical de Tmezrit: Mr CHERIFI S. chef de service, pour ses encouragements et les facilités mises à ma disposition qui m'ont vraiment aidé dans mes études, M^{elle} MOUSSI S. pour son soutien et son aide précieuse.

Je ne saurais oublier d'exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à la famille RABHI, à la famille BOUCHEFFA pour l'aide multiforme qu'ils m'ont apporté toutes ces années, sans oublier Mme BELKACEMI F. et son mari qui sans eux je ne serais ce que je suis aujourd'hui.

Enfin, mes pensées vont à mes très chers parents, la lumière de ma vie, à qui je dois tous, mon éducation, ma réussite dans la vie et dans mes études, merci pour votre amour, sacrifices et votre confiance en moi. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon grand respect, amour et de toute ma reconnaissance.

À tous ceux qui, directement ou indirectement ont contribué à ce travail, j'adresse mes plus sincères remerciements.





Dédicaces

Grâce à la bonne volonté, l'acharnement, Dieu tout puissant m'a donné la force et le courage pour la réalisation de ce travail que je dédie :

*À Mes très chers parents
À Mes très chers grands parents
À mon adorable chère petite sœur
« SABRINA »
À mes chers frères
« DALIL, NOURDINE et CHABANE »
À toute la famille CHERAFT, SALHI et BENALI
À tous mes ami(e)s.
Et
À tous ceux qui me sont chers*

Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.





Sommaire



Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les plantes médicinales	03
I. 1.1. Utilisation des plantes médicinales à travers les temps et les continents	03
I. 1. 2. La place de la médecine traditionnelle dans les sociétés contemporaines.....	04
I. 1. 2.1. Dans le monde	04
I. 1. 2.2. En Afrique	04
I. 1. 3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales	05
I. 1. 3. 1. Avantages de la phytothérapie	05
I. 1. 3. 2. Les risques d'utilisation des plantes	06
I. 2. Généralités sur <i>Pistacia lentiscus</i>	07
I. 2. 1. Historique	07
I. 2. 2. Systématique	08
I. 2. 3. Habitat et répartition géographique.....	08
I. 2. 4. Les noms vernaculaires de <i>Pistacia lentiscus</i>	09
I. 2. 5. Description morphologique	09
I. 2. 6. Métabolites secondaires de <i>Pistacia lentiscus</i>	12
I. 2. 7. Les intérêts de l'exploitation de <i>Pistacia lentiscus</i>	13
I. 2. 7. 1. Intérêts écologiques	13
I. 2. 7. 2. Intérêts industriels	13
I. 2. 7. 3. Intérêts Thérapeutiques	14
I. 2. 8. Activités biologiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	15
I.3. Les radicaux libres	16
I.3.1. Généralités	16
I.3.1.1. Les espèces réactives oxygénées (ERO).....	17
I.3.1.2. Les espèces réactives nitrogénées (ERN)	18
I.3.1.3. Interactions entre ERO et ERN	20

I. 3. 2. Sources des espèces réactives	20
I. 3. 2. 1. Sources endogènes	21
I. 3. 2. 2. Sources exogènes	23
I. 3. 3. Rôle physiopathologique des radicaux libres	24
I. 3. 3.1. Rôle physiologique	24
I. 3. 3.2. Rôle pathologique	24
I. 3. 3. 2. 1. Stress oxydant et nitrosant	25
I. 3. 4. Le contrôle des radicaux libres par la cellule.....	28
I. 3. 4. 1. Antioxydants enzymatiques	28
I. 3. 4. 1. Antioxydants non enzymatiques	28
1.4. Composés phénoliques	31
1.4.1. Biosynthèse des composés phénoliques	31
I. 4 .2. Classification des composés phénoliques	33
I. 4 .2. 1. Les phénols simples	33
I. 4 .2. 1. 2. Flavonoïdes	34
I. 4 .2. 1. 3. Les tannins	35
I. 4. 3. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques.....	37
I. 4. 4. Propriétés biologiques	37
I. 4. 4. 1.Chez la plante.....	37
I. 4. 4. 2. Chez l'Homme	38

Chapitre II. Matériel et Méthodes

II- 1. Préparation des extraits	40
II-1-1- Cueillette du matériel végétal	40
II-1-2- Séchage, broyage et tamisage	40
II-1-3- Extraction des composés phénoliques	41
II-2- Dosage des composés phénoliques	41
II-2-1- Dosage des phénols totaux	41
II-2-2- Dosage des flavonoïdes	43
II-2-3- Dosage des tannins	44
II.3. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	44

II.3.1. Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (analyse FRAP)	44
II.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	45
II.3.2.1. Activité scavenging des extraits de <i>P.lentiscus</i> contre le radical (ABTS ^{•+})	45
II.3.2.2. Activité scavenging des extraits de <i>P.lentiscus</i> contre le radical anion superoxyde (O ₂ ⁻).....	47
II.3.2.3. Activité scavenging des extraits de <i>P.lentiscus</i> contre le radical monoxyde d'azote (NO).....	49
II.4. Détermination des concentrations inhibitrices (IC ₅₀)	50
II.5. L'analyse statistique	50
II.6. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	50
II.6.1. Fractionnement des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	50
II.6.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	50
II.6.2. Evaluation des activités antioxydant des fractions	51
II.7. Caractérisation des fractions actives de <i>Pistacia lentiscus</i> par chromatographie sur couche mince (CCM)	51

III. Résultats et discussion

III.1. Préparation des extraits	53
III.2. Dosage des composés phénoliques	55
III.2.1. Phénols totaux	55
III-2-2- Dosage des flavonoïdes	56
III-2-3- Dosage des tannins	58
III.3. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	60
III.3.1. Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (test FRAP).....	60
III.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	63
III.3.2.1. Le test de décoloration du radical cationique ABTS ^{•+}	63
III II.3.2.1.1. Activité anti-radicalaire contre le radical ABTS ^{•+} à 100 µg/ml	63

III.3.2.1.1. Activité anti-radicalaire contre le radical ABTS ^{•+} à différentes concentrations.....	69
III.3.2.2. Activité scavenging des extraits de <i>P.lentiscus</i> contre le radical anion superoxyde (O ₂ ^{•-})	74
III.3.2.2.1. Activité anti-radicalaire contre le radical anion superoxyde à 100 µg/ml	74
III.3.2.2.2. Activité anti-radicalaire contre l'anion superoxyde à différentes concentrations	78
III.3.2.3. Activité scavenging des extraits de <i>P.lentiscus</i> contre le radical monoxyde d'azote (NO).....	80
III.3.2.3.1. Activité anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote à 100µg/ml.....	80
III.3.2.3.1.1. Activité anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote à différentes concentrations.....	82
III. 4. Les corrélations	87
III. 4. 1. Corrélation des activités avec le contenu phénolique des extraits	87
III. 4. 1.1. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur (méthode FRAP)	88
III. 4. 1.2. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging du cation ABTS ^{•+}	88
III. 4. 1.3. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging de l'anion superoxyde	88
III.4.1.4. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging de monoxyde d'azote.....	89
III. 4. 2. Corrélation entre les activités antioxydants	89
III.5. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	90
III.5.1. Mesure du pouvoir antioxydant (FRAP) des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	91
III.5.2. Activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100µg/ml.....	95
III.5.2.1. Activité scavenging du radical cationique ABTS ^{•+}	95
III.5.2.1.1. La cinétique de l'activité antiradicalaire	95
III.5.2.1.2. l'activité anti- ABTS ^{•+} en terme de pourcentage et TEAC	97
.....	

III.5.2.2. Activité scavenging des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i> contre l'anion superoxyde	101
III.5.2.3. Activité scavenging des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i> contre le monoxyde d'azote	103
III.6. Caractérisation des fractions actives des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	108
III.6. 1. Caractérisation des fractions actives des extraits des feuilles	109
III.6. 1. 1. La caractérisation de l'extrait éthanolique et de ses fractions actives.....	109
III.6. 1. 2. La caractérisation des extraits aqueux et de leurs fractions actives	114
III.6. 1. 3. La caractérisation des extraits organiques (acétate d'éthyle, chloroforme) et leurs fractions actives	114
III.6. 1. 3.1. Extrait organique acétate d'éthyle et ses fractions actives.....	114
III.6. 1. 3.2. Extrait organique chloroforme et ses fractions actives	115
III.6. 2. Caractérisation des fractions actives des extraits des graines	116
III.6. 2. 1. La caractérisation de l'extrait éthanolique et de ses fractions actives.....	116
III.6. 2. 2. La caractérisation de l'extrait aqueux acétate d'éthyle et de ses fractions actives.....	119
III.5. 2. 3. La caractérisation de l'extrait organique du chloroforme et de ses fractions actives.....	120
IV. Conclusion	122
V. Références bibliographiques	125
Annexes	

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxy-ribo-nucléique
ABTS	Acide 2 ;2' -azinobis -(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ATP:	Adénosyl-triphosphate
ARN	Acide ribo-nucléique
BH4	Tétrahydrobioptérine
BSA	Bovine sérum albumine
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couche mince
DMPD	N,N dimethyl -p- phenylenedianin
DPPH	Radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine adénine dinucléotide oxydé
FADH2	Flavine adénine dinucléotide réduit
TPTZ	2,4,3-tripyridyltriazine
FMN	Flavine monoadénine Nucléotide
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GMPc	Guanosine monophosphate 3,5 cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	High performance liquid chromatography
MDA	Malonaldialdéhyde
NADH	Nicotinamide Adénine dinucléotide
NADPH:	Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobleu tétrazolium
NFkB	Nuclear factor-kB
NO	Monoxyde d'azote
ONOOH	Nitroperoxyde
NOS	Oxyde nitrique synthase

NOS ₁ , nNOS	NOS neuronales
NOS ₂ , iNOS	NOS inductible
NOS ₃ , eNOS	NOS endothéliales
¹ O ₂	Oxygène singulet
O ₂ ⁻	Anion superoxide
·OH	Radical hydroxyle
OMS	Organisation mondiale de la santé
PMS	Phenazine Methosulfate
R _f :	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sGC	Guanylate cycase
SOD	Superoxyde dismutase
SNP	Sodium nitroprusside
TEA	Triethanolamine
TEAC	Trolox equivalent antioxydant capacity
TNF α	Facteur de nécrose des tumeurs α
XOR	Xanthine oxydoréductase

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Distribution de <i>P. lentiscus</i> dans le monde.	09
2	Photographies des :A) fleurs mâles ; B) fleurs femelles; C) résine; D) feuilles ; E) graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	11
3	Réaction de synthèse de l'oxyde nitrique	19
4	Sources endogènes et exogènes des radicaux libres	20
5	Activation de la NADPH oxydase du polynucléaire neutrophile	21
6	Biosynthèse de •NO à partir de L-arginine par les NOS	22
7	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	26
8	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	26
9	Action du radical libre •OH sur la base guanine	27
10	Résumé du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active	28
11	Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène/ nitrogène	29
12	Effet pro-oxydant de (a) la vitamine C, (b) la vitamine E, (c) les flavonoïdes	30
13	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	32
14	Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique	34
15	Exemple de structure d'un tannin hydrolysable	36
16	Exemple de structures des tannins condensés	37
17	Mécanisme de neutralisation des radicaux libres (a) Par transfert d'un atome d'hydrogène ; (b) par transfert d'un électron	38
18	Photographies du matériel végétal de <i>Pistacia lentiscus</i> A) pâte des graines. B) poudre des feuilles	40
19	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	42
20	Principe de la méthode FRAP	45
21	Formation du cation ABTS ⁺	46
22	Réaction du cation ABTS ⁺ avec un antioxydant	46
23	Teneurs en phénols totaux des différents extraits des feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .	55
24	Teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	57
25	Teneurs en tannins des différents extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> .	59
26	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> en équivalent d'acide ascorbique.	61
27	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> en équivalent d'acide caféique.	61
28	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des extraits de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps	64
29	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des extraits de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps.	64
30	Effet scavenger contre l'ABTS ^{•+} des extraits de feuilles et graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml.	66
31	Réaction du cation ABTS ⁺ avec un antioxydant (Catéchine)	67
32	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} de tous les extraits de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations.	69
33	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} de tous les extraits de graines de <i>P. lentiscus</i> à différentes concentrations.	71
34	Classement croissant des extraits (A) de feuilles, (B) de certaines molécules de référence et (C) de graines, selon leurs IC ₅₀ .	72

35	Effet scavenger contre le radical anion superoxyde des différents extraits de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et des molécules de référence à 100µg/ml.	74
36	Position des groupements OH des composés phénoliques intervenant dans la réaction avec l'anion superoxyde.	77
37	Effet scavenger contre l'anion superoxyde de quelque extrait de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et l'acide caféique à différentes concentrations	78
38	Classement croissant des extraits de feuilles et l'acide caféique, selon leurs IC ₅₀ .	79
39	Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml.	81
40	Effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote de tous les extraits de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations.	83
41	Effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote de tous les extraits de graines de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations.	85
42	Classement croissant des extraits (A) de feuilles, (B) de graines et (C) de certaines molécules de référence, selon leurs IC ₅₀ .	86
43	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des fractions des extraits ; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> en équivalent d'acide ascorbique/d'acide caféique.	91
44	Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des fractions des extraits ; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> en équivalent d'acide ascorbique/d'acide caféique.	93
45	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps	95
46	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps.	96
47	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml	98
48	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml.	100
49	Effet scavenger contre l'anion superoxyde des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et quelques molécules de référence à 100µg/ml.	102
50	Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs; (A) éthanolique, (B) : acétate d'éthyle, (C) :chloroforme, des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de références à 100 µg/ml.	104
51	Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certaines molécules de référence à 100 µg/ml.	106
52	Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA -Hex - AF) .	109
53	Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA-AF- AAc- H ₂ O	111
54	Chromatogrammes des fractions des extraits aqueux de feuilles de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA-AF- AAc- H ₂ O).	112
55	Chromatogrammes des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de feuilles de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF).	114
56	Chromatogrammes des fractions de l'extrait organique du chloroforme de feuilles de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF).	116

57	Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de graines de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF).	117
58	Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de graines de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H ₂ O).	118
59	Chromatogrammes des fractions de l'extrait aqueux acétate d'éthyle de graines de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H ₂ O).	119
60	Chromatogrammes des fractions de l'extrait organique du chloroforme de graines de <i>P. lentiscus</i> (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF).	120

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Noms vernaculaires de <i>Pistacia lentiscus</i>	09
II	Activités biologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> .	15
III	Classification des acides phénoliques	33
IV	Classification des flavonoïdes	35
V	Taux d'extraction des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	53
VI	Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l'ABTS ^{•+} en (TEAC) (mmol eq trolox/g d'extrait) à 100µg/ml des extraits de feuilles et de graines de <i>P. lentiscus</i> .	68
VII	Exemples d'études réalisées sur l'activité scavenging de radical cationique ABTS ^{•+}	73
VIII	Corrélation entre les activités anti-radicalaire et les teneurs des extraits en composés phénoliques.	87
IX	Corrélation entre les activités antioxydants des extraits des feuilles et des graines	90
X	Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l'ABTS ^{•+} en (TEAC) (mmol eq trolox/g de fraction) à 100µg/ml des fractions des extraits actifs de feuilles de <i>P. lentiscus</i> .	99
XI	Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l' ABTS ^{•+} en (TEAC) (mmol eq trolox/g de fraction) à 100µg/ml des fractions des extraits actifs de graines de <i>P. lentiscus</i>	101



Introduction



Dès son apparition, l'*Homo sapiens* s'est intéressé aux plantes qui l'entourent, il en a fait sa nourriture, tiré des éléments de construction, d'habillement, de décoration et il en a utilisé pour prévenir ou soigner diverses maladies.

Bien que leur emploi a souvent été en relation avec des pratiques magiques basées essentiellement sur des croyances, la phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, a connu un essor important ces dernières années à travers le monde, car non seulement les composés synthétisés par la plante sont infiniment plus variés que ceux retrouvés dans les médicaments qui présentent plusieurs effets secondaires, mais sont aussi mieux tolérés par notre organisme.

L'oxygène que nous respirons, indispensable à la vie, est le grand pourvoyeur des radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et le monoxyde d'azote ($\cdot NO$) dont l'excès en cas de déficience en antioxydants favoriserait le stress oxydatif qui, directement ou indirectement, va entraîner des dommages oxydatifs des molécules biologiques à savoir, les protéines, les lipides, les glucides et l'ADN induisant, par conséquent l'émergence de différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le cancer, le diabète, le vieillissement.....etc (Massion et *al.*, 2002; Favier, 2003; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Afin de limiter les effets délétères de ces espèces réactives, diverses stratégies antioxydants ont été mises en évidence, pour renforcer le système antioxydant, incluant les molécules antioxydants des plantes médicinales principalement les huiles essentielles, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Heim et *al.*, 2002; Rietjens et *al.*, 2002; Cillard et Cillard, 2006).

Ainsi les plantes médicinales sont considérées comme une source majeure inépuisable des substances aux propriétés thérapeutiques. Elles ont montré à travers plusieurs études diverses activités biologiques importantes pour l'organisme. Ces avantages offerts par ces composés, ne cessent d'attirer l'intérêt de plusieurs projets de recherche pour découvrir encore d'autres principes, notamment à partir des plantes endémiques peu ou pas étudiées.

L'Algérie, bénéficie d'un climat favorable, très diversifié avec une hétérogénéité des conditions écologiques qui ont permis le développement d'une flore très riche et hautement variée ; ainsi, elle est l'habitat d'un grand nombre d'espèces de plantes aromatiques et médicinales, où beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% endémiques restent très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressé dans notre travail à l'étude d'une plante à usage très fréquent par les populations rurales qui pousse à l'état spontané dans la région de Bejaia, appelée *Pistacia lentiscus* (Amadhagh). Cette plante est largement utilisée par la population locale dans le traitement de plusieurs pathologies y compris le traitement de l'eczéma, les infections de la gorge, les douleurs d'estomac, les diarrhées et les calculs rénaux ainsi que certaines pathologies d'origine inflammatoire (Kordali *et al.*, 2003; Ljubuncic *et al.*, 2005 ; Longo *et al.*, 2007; Cortina *et al.*, 2008; Amhamdi *et al.*, 2009).

L'objectif de ce travail consiste en premier lieu à l'évaluation du pouvoir réducteur, l'effet scavenger contre les radicaux libres (ABTS^{•+}, anion superoxyde et le monoxyde d'azote) des extraits des feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus* en parallèle avec l'estimation de leurs contenus en phénols totaux, flavonoïdes et en tannins par des dosages colorimétriques. Par la suite les fractions issues de la chromatographie sur colonne des extraits actifs des feuilles et des graines de cette plante ont été testées pour leur pouvoir antioxydant par ces mêmes tests. En fin, les fractions actives ont été séparées par la chromatographie sur couche mince (CCM) afin de mieux caractériser la composition de ces dernières.

A decorative horizontal bar with a light gray background and black wavy borders on both sides. The text is centered within this bar.

I- Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les plantes médicinales

Au fil des siècles, apprenant à distinguer le comestible du mortel, à se servir des substances toxiques, à reconnaître les vertus curatives cachées dans leur environnement naturel, nos ancêtres nous ont légué une longue chaîne de savoirs traditionnels dont l'ensemble constitue la médecine traditionnelle actuelle, y compris la médecine chinoise, l'Ayurveda indien, la médecine arabe et les diverses formes de médecine indigène (OMS, 2003; Eddouks et *al.*, 2007; De Vos, 2010).

L'expression «médecine traditionnelle» se rapporte aux pratiques, méthodes, savoirs et croyances en matière de santé qui impliquent l'usage à des fins médicales, de plantes entières ou parties de plantes (feuilles, fleurs, racines, fruits...) séparément ou en association, pour soigner, diagnostiquer et prévenir des maladies (OMS, 2003; Fintelmann et Weiss, 2004 ; Eddouks et *al.*, 2007; De Vos, 2010).

I. 1.1. Utilisation des plantes médicinales à travers les temps et les continents

Les plantes médicinales font partie de l'histoire de tous les continents à travers les siècles, dont les traces de leur utilisation sont souvent révélées. Les premières pratiques de la médecine à base des plantes remontent, en effet, à l'époque grecque, habituellement à Hippocrate (300ans av.J.-C.), à Dioscoride (I^{er} siècle apr.J.-C.), ou à Galien (II^{eme} siècle de notre ère). Depuis, le savoir concernant les plantes s'est organisé, documenté et a été transmis de génération en génération, par l'oralité ou par les écrits dans différents groupes ethniques, pour donner naissance à différents types de médecines traditionnelles, telles que la médecine traditionnelle chinoise, indienne, africaine et américaine (Baba-Aissa, 1999; Quetin-Leclercq, 2002).

En Algérie comme au Maroc, carrefour culturel et transition naturelle entre l'Afrique noire au sud et l'Europe au nord et le Moyen-Orient, la phytothérapie constitue une partie intégrante de la culture locale, la population est dépositaire depuis de longues dates d'un savoir endogène qu'elle a acquis de façon empirique à travers les générations (Eddouks et *al.*, 2007).

Certains de ces usages anciens sont aujourd'hui vérifiés par des études scientifiques et ont conduit à l'isolement de nouveaux principes actifs et/ou à la mise sur le marché de médicaments à base de plantes ou d'extraits standardisés. De la plante entière ou partie de plante utilisée au départ, on a ensuite utilisé des extraits totaux (obtenus par décoction, macération, infusion ou percolation avec différents solvants) liquides ou secs pour faciliter la prise et standardiser les traitements (Quetin-Leclercq, 2002; De Vos, 2010).

I. 1. 2. La place de la médecine traditionnelle dans les sociétés contemporaines

I. 1. 2.1. Dans le monde

A l'heure actuelle, la majeure partie de la population mondiale dépend encore de la médecine traditionnelle et donc de l'utilisation de plantes et des extraits végétaux (Kasperek et al-Janabi, 2008; De Vos, 2010).

Selon l'OMS « mars 2003 », le recours à la médecine traditionnelle a connu un regain d'attention et d'intérêt dans le monde. En Chine, 40 % environ de l'ensemble des soins de santé relèvent de la médecine traditionnelle. Au Chili et en Colombie, 71 % et 40 % de la population, respectivement, ont recours à la médecine traditionnelle et, en Inde, 65 % de la population rurale utilisent les plantes médicinales au niveau des soins de santé primaires. Dans les pays développés, la médecine traditionnelle connaît un succès croissant. Ainsi, le pourcentage de la population ayant eu recours à ces médecines au moins une fois est de 48 % en Australie, 31% en Belgique, 70% au Canada, 49% en France et 42% aux États-Unis d'Amérique (OMS, 2003; De Vos, 2010).

I. 1. 2.2. En Afrique

Dans plusieurs pays africains, on assiste à la création et à la production de spécialités simples à partir de certaines plantes utilisées traditionnellement et susceptibles de remplacer dans certains cas des médicaments importés.

Au Mali, sept médicaments traditionnels améliorés ont obtenus une autorisation de mise sur le marché et sont inscrits dans le formulaire national des médicaments. Ils sont proposés à la vente dans les officines pharmaceutiques du Mali et au niveau des centres de santé communautaires [un antipaludique, Malarial-5, association de 3 plantes *Lippia chevalieri* (32%), *Cassia occidentalis* (62%) et *Spilanthes oleracea* (6%)].

En Guinée, un sirop antitussif à base de feuilles de *Dissotis rotundifolia*, le sirop de Dissotis a été mis au point par un pharmacien et commercialisé.

Au Cameroun, un sirop préparé à partir des racines de *Pentadiplandra brazzeana*, le sirop Gamma agit efficacement dans les crises hémorroïdaires.

Au Nigeria un extrait lyophilisé à partir des graines de *Piper guineense*, des tiges de *Pterocarpus osun*, de fruits d'*Eugenia caryophyllum* et de feuilles de *Sorghum bicolor* a été commercialisé sous le nom de Niprisan pour diminuer l'apparition de crises dues à la drépanocytose (Pousset, 2006).

A cet effet, une enquête ethnobotanique, révèle que malgré les progrès fulgurants de la médecine moderne, beaucoup de personnes, privilégient pour diverses raisons toujours la médecine traditionnelle pour soulager leurs maux. Ainsi, l'investigation menée dans les wilayas de Tébessa, Guelma, Souk Ahras, El Tarf, Skikda et Annaba, révèle que 25,58% des habitants utilisent, de préférence, des plantes médicinales pour traiter leurs désordres gastriques, 25,96 % d'entre eux pour soulager leurs problèmes respiratoires, 12,93% pour traiter les maladies urologiques, 11,20% en appellent aux vertus thérapeutiques des plantes usitées, le plus souvent, sous forme de cataplasmes contre les atteintes dermatologiques, 4% y ont recours pour combattre les maladies neurologiques, 2,5% vont chez l'herboriste dans l'espoir de soulager leurs problèmes cardiologiques, et seulement 1,72% des accros aux plantes médicinales font appel aux teintures, sirops et distillations. Ajoutés aux conclusions des autres investigations, faites dans d'autres régions de l'Algérie, les résultats obtenus, confortent une fois de plus la thèse, selon laquelle les traditions et les croyances séculaires continuent d'influer sur les décisions de citoyens convaincus que ces pratiques transmises, de génération en génération, représentent toujours la meilleure des médications (El Watan, 2008).

I. 1. 3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales

Les plantes constituent un immense réservoir de structures nouvelles et originales. Or seuls environ 10% des 400 à 500.000 espèces végétales que compte notre planète ont fait l'objet d'investigations scientifiques plus ou moins poussées. Gageons que les 90% restants réservent encore de nombreuses découvertes très intéressantes. On considère qu'environ 50 à 60% de notre arsenal thérapeutique moderne est constitué de molécules naturelles ou dérivées de molécules naturelles (Quetin-Leclercq, 2002).

Aujourd'hui, la mode du « naturel » et des « médecines douces » a donné un souffle nouveau à trois secteurs distincts : la médecine allopathique, l'industrie pharmaceutique et la cosmétique. Par ailleurs, ces plantes sont de plus en plus utilisées dans les industries alimentaires.

I. 1. 3. 1. Avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie connaît de nos jours un renouveau exceptionnel et offre de multiples avantages. L'Homme a eu recours aux plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou maladies chroniques, telles que l'asthme, l'arthrite, la tuberculose ou la malaria mais aussi dans le traitement du cancer et l'HIV.

Aujourd'hui, il est difficile d'imaginer le monde sans la quinine, qui est employée contre la malaria, sans la digoxine, qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine, que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes. (Chevallier, 1997; De Vos 2010).

De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, une estimation de 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques c'est pourquoi ils se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (Chevallier, 1997).

En général, le corps humain est bien mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapeutique exclusivement chimique. Cette meilleure tolérance par notre organisme peut être illustrée par le fait que la chlorophylle, l'essence verte des végétaux, et l'hémoglobine, de nos propres globules rouges, ont une structure moléculaire presque identique, le magnésium étant au noyau de la chlorophylle et le fer est au cœur de l'hémoglobine (Yves Requena et Dan Kenner, 1996; Chevallier, 1997).

I. 1. 3. 2. Les risques d'utilisation des plantes

Cette médecine dite douce n'est pas sans risque car si les plantes sont faciles à utiliser, certaines d'entre elles provoquent également des effets secondaires. Comme tous les médicaments, les plantes médicinales doivent être employées avec précaution. L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes en principes actifs et bien évidemment leurs doses. Mal dosée, *Ephedra sinica* (l'éphédra) est très toxique et *Symphytum officinale* (la consoude), qui peut avoir des effets fatals dans certaines circonstances. Ces exemples démontrent que l'expérience du praticien combinée à celle du patient est souvent le guide le plus sûr pour connaître l'effet thérapeutique des plantes (Chevallier, 1997; Iserin et al., 2001).

I. 2. Généralités sur *Pistacia lentiscus*

L'Algérie bénéficie d'un climat très diversifié avec une hétérogénéité des conditions écologiques qui ont permis le développement d'une flore très riche et hautement variée. La flore algérienne comporte environ 3164 espèces de plantes vasculaire dont 7,9% sont endémiques appartenant à la quasi-totalité des familles botaniques. L'une de ces espèces à usage très fréquent par les populations rurales en Algérie est *Pistacia lentiscus* (Krishnaiah et al., 2010).

Le genre *Pistacia* L. appartient à une famille assez nombreuse qui comporte 875 espèces distribuées dans 70 genres, il s'agit de la famille des Anacardiaceae (Alvarez et al., 2008). Ce genre apparu il ya plus de 80 millions d'années au centre d'Asie est l'un des genres le plus important dans le règne végétal de point de vue horticulture, économique et commercial (Ahmadi Afzadi et al., 2007; Al Saghir et al., 2010). Les principaux centres de diversité se situeraient maintenant d'une part dans les régions méditerranéennes du sud del'Europe, le nord de l'Afrique et le moyen orient et d'une autre part entre l'est et le centre d'Asie. Il contient neuf espèces et cinq sous-espèces, et deux groupes monophylétiques découlent d'une étude menée par Al Saghir en se basant sur la morphologie de ce genre. Le premier groupe (section *Pistacia*) contient *P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. eurycarpa*, *P. falca*, *P. integerrime*, *P. khinjuk*, *P. mutica*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* et *P. vera*, tandis que l'autre groupe (section *Lentiscella*) contient *P. aethiopica*, *P. lentiscu*, *P. mexicana*, *P. texana* et *P. weinmanifolia* (Al Saghir et al., 2010).

I. 2. 1. Historique

Le nom *Pistacia lentiscus* donné à cette plante lui vient des mots latin car *Pistacia* et le nom grec "*pistakia*" constituent une altération du mot "*foustak*", nom arab de l'espèce principale, et *Lentiscus*, vient du mot latin "*lentiscus*", nom de l'arbre au mastic (Garnier et al., 1961).

I. 2. 2. Systématique

La systématique du lentisque est décrite ci-dessous:

Règne :	Plantae, (végétal)
Sous-règne :	Tracheobionta
Embranchement :	Spermaphyte
Sous-embranchement :	Angiosperme
Division :	Magnoliophyta.
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Sapindales.
Famille :	Anacardiaceae.
Genre :	Pistacia.
Espèce :	<i>Pistacia lentiscus</i>

I. 2. 3. Habitat et répartition géographique

Pistacia lentiscus est largement distribuée dans les écosystèmes extrêmes du bassin méditerranéen, notamment dans les régions ensoleillées à basse altitude, et constitue, avec les myrtes et les cistes, d'immenses broussailles appelées maquis. C'est une espèce thermophile très vigoureuse prospérant dans tous les terrains secs et arides et sur les sols en friches où sa souche repousse abondamment et drageonne facilement (Garnier et *al.*, 1961; Baba-Aissa, 1999; Palacio et *al.*, 2005; Abdelwahed et *al.*, 2007; Bhourri et *al.*, 2010).

Le lentisque se rencontre dans toutes les parties chaudes de la méditerranée de l'Europe, de l'Asie, de l'Afrique jusqu'au Canaries (Al-Saghir, 2006; Book 2008). En Algérie, *P. lentiscus* est très répandue dans tout le littoral et le bassin de la soummam, les régions sublittorales et jusqu'au Sahara (Belhadj, 2002; Hamlat et Hassani, 2008).

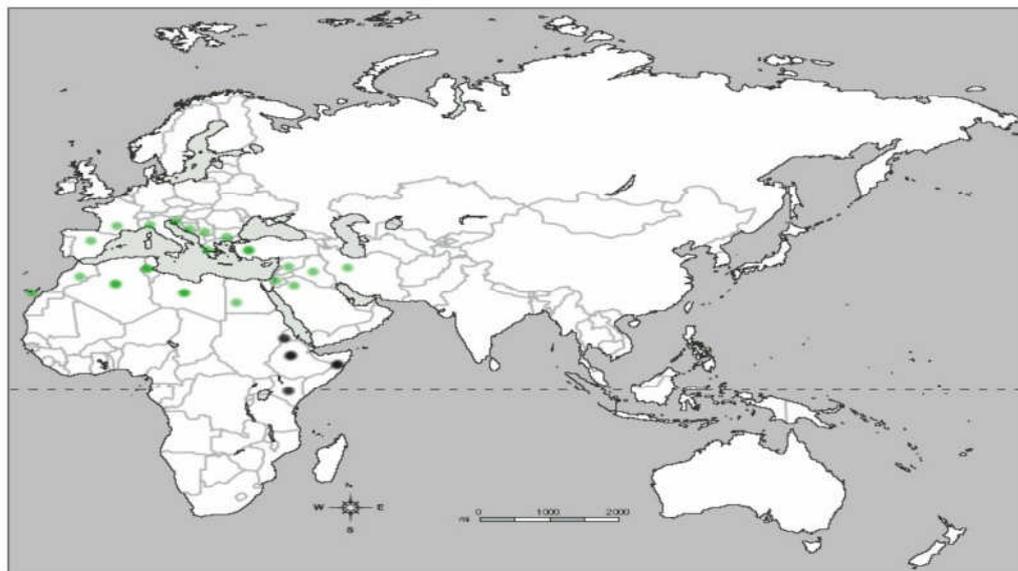


Figure N° 1: Distribution de *P. lentiscus* dans le monde.

- Noire = *Pistacia lentiscus* subsp. *emarginata*.
- Vert = *Pistacia lentiscus* subsp. *Lentiscus* (Al-Saghir, 2006).

I. 2. 4. Les noms vernaculaires de *Pistacia lentiscus*

Le tableau suivant énumère les différentes appellations de la plante *Pistacia lentiscus* :

Tableau N°I: Noms vernaculaires de *Pistacia lentiscus*

Langue	Noms	Références
Berbère	Tidekth Amadagh	(Baba-Aissa, 1999)
Arabe	Edharw, Sareys	(Baba-Aissa, 1999) (El beyrouthy, 1999)
Français	Arbre au mastic Pistachier lentisque Restringe Lentisque d'Espagne	(Garnier et al., 1961)
Anglais	Mastic ou Mastick tree	(Garnier et al., 1961)
Espagnol	Lentisco, Charneca comun	(Garnier et al., 1961)
Allemand	Mastix Baum	(Garnier et al., 1961)
Italien	Lentischio, Sondrio.	(Garnier et al., 1961)

I. 2. 5. Description morphologique

Mêlé à toutes les autres plantes qui foisonnent les longs des champs et des routes dont beaucoup sont aussi imposantes qu'elles, le lentisque se reconnaît à sa belle couleur mais particulièrement à sa très bonne odeur prononcée et unique.

Pistacia lentiscus ou l'arbre au mastic est décrite comme l'une des espèces ligneuses les plus importantes dans le bassin méditerranéen (Cortina *et al.*, 2008). C'est un arbuste ou arbrisseau résineux à odeur très prononcée buissonnant et touffu de quelques mètres de hauteurs (1 à 6 mètres) (Garnier *et al.*, 1961; Bayer *et al.*, 1987; Baba-Aïssa, 1999) et de nombre chromosomique de $2n = 24$ (Al Saghir *et al.*, 2010). Elle est caractérisée par ses feuilles persistantes paripennées, avec 4 à 10 paires de folioles elliptiques et lancéolées, alternées, coriaces, composées, entières et sessiles ; le rachi est ailé entre les paires de folioles . elles sont vertes foncées lavées de pourpre, luisantes en dessus mates et pâles en dessous (Garnier *et al.*, 1961; Baba-Aïssa, 1999). (Figure N°2 (d))

Les fleurs sont toutes très petites, de 2-3 mm de large, vertes ou rougeâtres, denses, unisexuées, elles sont disposées en épis cylindriques courts, serrés, latéraux à l'aisselle des feuilles. La période de floraison s'étale d'avril jusqu'à juin. Les fleurs mâles (Figure N° 2(a)) sont à calice et à 5 pointes, de 8 à 10 petites étamines rouge foncé, qui produisent de 47000 à 60000 grains de pollens par fleurs. Quant aux fleurs femelles (Figure 2(b)), elles sont vertes jaunâtres, à calice, à 3-4 pointes, parfois un peu velues, style à 5 stigmates tricarpel et ovaire uniloculaire fourré par un seul anatrope ovule et regroupées dans une inflorescence de 4 à 21 fleurs. Les fleurs femelles ont des ovaires uni et tri-carpelles (Garnier *et al.*, 1961; Bayer *et al.*, 1987, Verdu et Garcia-Fayos, 1998; Baba-Aïssa, 1999).

Le fruit de lentisque (Figure 2(e)) est une petite drupe sèche de 4mm de long, globuleuse et légèrement comprimée, de la taille d'un pois, d'abord rouge puis noir à maturité, le noyau renferme une seule graine (Garnier *et al.*, 1961; Bayer *et al.*, 1987), son écorce grisâtre devenant avec le temps noirâtre et crevassée peut atteindre 5 à 6 m de hauteur et 1,80m de circonférence (Garnier *et al.*, 1961).



Figure N°2: Photographies des A) fleurs mâles; B) fleurs femelles; C) résine; D) feuilles ; E) fruits de *Pistacia lentiscus*

I. 2. 6. Métabolites secondaires de *Pistacia lentiscus*

Comme d'autres plantes du genre *Pistacia*, le lentisque contient des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives, l'analyse phytochimique des différentes parties a fait l'objet de nombreuses études via la composition des feuilles en composés phénoliques à savoir les acides phénoliques notamment l'acide gallique et ses dérivés glycosylés, les flavonoïdes dont les flavones (luteoline) (Djeridane et al., 2007; López-Lázaro, 2009), (le tricéline et chrysoérol), les flavonols (le myricétine, la quercétine et le kaempférol), des hétérosides (l'orientine, l'isorientine, la vitexine et la rutine) et des anthocyanins (delphinidin 3-O-glycoside et cyaniding 3-O-glucoside) (Benhammou et al., 2008; Hamlat et Hassani, 2008), mais aussi en tannins (Wei et al., 2002; Addelwahed et al., 2007; Rogosic et al., 2008). En outre, il a été rapporté que les parties aériennes sont extrêmement riches en monoterpènes, en huiles essentielles, citons myrcène, α -pinène, Terpinen-4-ol, limonène, longifolène, β -caryophellène, D-germacrène, δ -caryophyllène, δ -cadinène, α -cadinol, β -bisabolène, β -bourbonène et oxide de caryophyllène (Castola et al., 2000; Amhamdi et al., 2009) mais aussi β -pinène, α -phellandrène, sabinène, para-cymène et γ -terpinène (Castola et al., 2000; Fernandez et al., 2000; Dogan et al., 2003; Duru et al., 2003; Benhammou et al., 2008; Gardeli et al., 2008).

De même, les fruits sont riches en tannins, en monoterpènes (myrcène, α -pinène et limonène) (Baba-Aissa, 1999; Castola et al., 2000), en flavonoïdes et les dérivés de galloyl incluant galloyl-glucosides, ellagitannins et acide galloyl-quinic (Bhourri et al., 2010), en acides phénoliques, notamment l'acide gallique (Addelwahed et al., 2007). On trouve aussi les acides gras insaturés comme l'acide oléique et linoléique (Charaf et al., 2008).

La résine d'odeur forte, en forme jaune qui est obtenue par incision du tronc (Bayer et al., 1987; Castola et al., 2000; Kordali et al., 2003) est formée de 80 à 90% d'acide mastic et de 10 à 20% de masticine (Garnier et al., 1961). L'huile essentielle de mastic est un liquide incolore, d'odeur balsamique très prononcée, cette essence est formée principalement de α -pinène, β -cymène (Castola et al., 2000; Dafrera et al., 2002) et triterpénoïdes (Assimopoulou et al., 2005).

I. 2. 7. Les intérêts de l'exploitation de *Pistacia lentiscus*

Le lentisque est une plante exsude qui se spécifie par l'utilité de toutes ses parties (feuilles, écorces, graines et résines), elle est utilisée, soit par voie interne, en transcutanée soit en diffusion (Dogan et *al.*, 2003; Ljubuncic et *al.*, 2005; Delille 2007). A intérêts écologiques, industriels agroalimentaires mais aussi thérapeutiques, Cette dernière est l'une des espèces les plus importante économiquement (Ahmadi Afzadi et *al.*, 2007; Ozden-Takatli et *al.*, 2010).

I. 2. 7. 1. Intérêts écologiques

Sous les conditions climatiques méditerranéennes, *Pistacia lentiscus* a la capacité de pousser après les incendies et de protéger le sol de l'érosion dans les régions semi arides, cela est dû à son adaptation à la sécheresse et à la résistance aux perturbations. Elle a également la capacité élevée de s'enraciner et la plasticité de contraster la disponibilité des nutriments, et répond aisément à la faible disponibilité de l'eau en modifiant en surface des spécificités morpho-fonctionnelles (Cortina et *al.*, 2008), sur cet effet, cette espèce prend la première place dans la listes des programmes de reboisement. De plus, la qualité de ses bois fait d'elle un bon support en ébénisterie (Ostos et *al.*, 2008; Ozden-Tokatli et *al.*, 2010).

I. 2. 7. 2. Intérêts industriels

Cette espèce présente un intérêt particulier, d'une part, les huiles essentielles extraites à partir de ces feuilles et rameaux sont utilisées dans plusieurs applications industrielles telles que la parfumerie, l'alimentation et en pharmaceutique (Longo et *al.*, 2007 ; Amhamdi et *al.*, 2009). D'autres part, sa résine connue sous le nom de *mastic résine Chio* utilisée par les anciens égyptiens pour embaumer les morts (Baba-Aissa, 1999). De nos jours, la gomme mastic est aussi employée en pâtisserie, en confiserie, comme arôme en technologie alimentaire, dans les industries cosmétologiques et pharmaceutiques, mais aussi dans l'industrie photographique et dans la fabrication de liqueurs (Barazani et *al.*, 2003; Kivçak et Akay, 2005). Elle entre aussi dans la fabrication des pates ou des gommages à mâcher parfumées, car elle possède, entre autre, la propriété de purifier l'haleine, blanchir les dents et traiter les problèmes de gingivites (Dogan et *al.*, 2003).

I. 2. 7. 3. Intérêts Thérapeutiques

I. 2. 7. 3.1. Les utilisations en médecine vétérinaire

Pistacia lentiscus est une plante utilisée, aussi bien en médecine traditionnelle humaine que vétérinaire, sa consommation par les moutons et chèvres diminue le risque des infections par les larves contagieuses (Rogosic et al., 2006; Landau et al., 2010), à cet effet, l'huile du fruit qui est riche en acides gras insaturés est utilisée comme constituant des aliments du bétail (Charef et al., 2008).

I. 2. 7. 3.2. Les utilisations en médecine humaine.

Pistacia lentiscus constitue une source importante de substances actives, en effet, plusieurs parties de cette plante (les fruits, les écorces et les feuilles) sont utilisées en médecine traditionnelle depuis la civilisation grecque (Ljubuncic et al., 2005; Benhamou et al., 2008 ; Charef et al., 2008).

A ce jour, les feuilles frottées à l'intérieur des cruches à eau servent fréquemment à les désinfecter, afin de garder l'odeur aromatique du lentisque. La décoction des parties aériennes ou la résines sont utilisées comme un stimulant diurétique et dans le traitement d'hypertension, d'eczéma, des douleurs gastriques et les calculs rénaux, mais aussi contre les infections de la gorge, la jaunisse, l'asthme, les troubles digestifs et la diarrhée (Kordali et al., 2003; Ljubuncic et al., 2005 ; Cortina et al., 2008; Gardeli et al., 2008; Amhamdi et al., 2009). De plus, la mastication soit de la résine, soit tout simplement des feuilles ou des baies de *Pistacia lentiscus* est utilisée aussi pour soigner les problèmes bucco-gingivaux et les douleurs gastriques (gastrites, dyspepsies), les ulcères gastriques bénins et des ulcères duodénaux (Chevallier, 1997; Janakat et Al-Merie, 2002; Dogan et al., 2003), comme elle est aussi efficace contre les affections bronchiques, la toux et les furoncles (Duru et al., 2003 ; Kordali et al., 2003; Ljubuncic et al., 2005; Balan et al., 2007; Benhammou et al., 2008; Amhamdi et al., 2009).

Dans certaines régions d'Espagne, l'écorce de cette plante serait indiqué dans le traitement d'un certains nombre de maladies telles l'hypertension (Kordali et al., 2003; Topçu et al., 2007). En Algérie, cette plante a servi comme vulnéraire, ses feuilles sont mâchées puis appliquées sur des blessures, ses fruits, employés contre les irritations (Baba-Aissa, 1999) et ces huiles essentielles utilisées dans le traitement des troubles respiratoires (Tounes et al., 2008).

I. 2. 8. Activités biologiques de *Pistacia lentiscus*

Récemment, les études pharmacologiques qui ont été effectuées sur *Pistacia lentiscus* ont rapporté, que les composés contenus dans cette plante ont de multiples activités biologiques (Dogan et *al.*, 2003) à savoir : antioxydants, anti-inflammatoire, antipyrétique, antibactérienne ,antivirale et anticancéreus ...etc (Duru et *al.*, 2003; Kordali et *al.*, 2003; Ljubuncic et *al.*, 2005; Balan et *al.*, 2007; Benhammou et *al.*, 2008; Amhamdi et *al.*, 2009), qui sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau N°II : Activités biologiques de *Pistacia lentiscus*

Activités biologiques	Plantes	Extraits/ composés	Parties	Références
Antioxydant	<i>P.lentiscus</i>	Acide gallique et 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose	fruits	Addelwahed et <i>al.</i> , 2007
	<i>P.lentiscus</i>	Triterpènes	résine	Assimopoulou et <i>al.</i> , 2005
	<i>P. atlantica</i> , <i>P. lentiscus</i>	Extrait éthanolique	feuilles	Benhammou et <i>al.</i> , 2008
	<i>P.lentiscus</i>	Extraits phénoliques	feuilles	Atmani et <i>al.</i> , 2009
	<i>P.lentiscus</i>	Acide Di gallique	fruits	Bhourri et <i>al.</i> , 2010
Anti-microbienne	<i>P.lentiscus</i>	-	Résine	Aksoy et <i>al.</i> , 2006
	<i>P. atlantica</i> , <i>P. lentiscus</i>	Extrait éthanolique	feuilles	Benhammou et <i>al.</i> , 2008
	<i>P.lentiscus</i> , <i>P.vera</i> , <i>P. terebinthus</i>	Ether alcool, éther de pétrole, éthyle acétate, chloroforme	feuilles	Kordali et <i>al.</i> , 2003
	<i>P.lentiscus</i> , <i>P.vera</i> , <i>P. terebinthus</i>	huiles essentielles	feuilles et résine	Duru et <i>al.</i> , 2003
Anti Apoptotique	<i>P.lentiscus</i>	polaires	résine	Dedoussis et <i>al.</i> , 2004
Anti mutagénèses Et anti cancéreuse	<i>P.lentiscus</i>	Acide gallique et 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose	fruits	Addelwahed et <i>al.</i> , 2007
Anti-cancéreuse	<i>P.lentiscus</i>	Extrait éthanolique	résine	Balan et <i>al.</i> , 2007
Anti-génotoxique	<i>P.lentiscus</i>	Acide Digallique	fruits	Bhourri et <i>al.</i> , 2010
Anti-hémolytique	<i>P.lentiscus</i>	Extraits phénoliques	feuilles	Djeridane et <i>al.</i> , 2007
Hépatoprotective	<i>P.lentiscus</i>	-	feuilles	Janakat et Al-Merie, 2002
	<i>P.lentiscus</i>	Extraits aqueux	feuilles	Ljubuncic et <i>al.</i> , 2005
	<i>P.lentiscus</i>	résine		Triantafyllou et <i>al.</i> , 2007

I.3. Les radicaux libres

Les organismes aérobies utilisent, comme source d'énergie, des réactions d'oxydoréduction qui reposent sur le transfert d'un ou plusieurs électrons entre donneurs d'électrons (réducteurs) et leurs accepteurs (oxydants). L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Le processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène (dans le cas où il y a transfert d'un nombre impair) sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) particulièrement réactionnelles (Pincemail et *al.*, 2002).

I.3.1. Généralités

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes possédants un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe (Halliwell et Gutteridge 1994 ; Ré et *al.*, 2005) qui leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, ou bien, au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les espèces actives de l'oxygène et de l'azote représentent, avec les états de transition des métaux, les principales espèces pro-oxydantes documentées actuellement (Vergely et Rochette, 2005; Mozaffarieh et *al.*, 2008; Schmitt et Dirsch, 2009).

Parmi toutes les espèces réactives susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et qui sont appelés radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) ou de l'azote tel le monoxyde d'azote ($\cdot NO$). 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 réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux (figure N°11) (Favier, 2003; Koechlin-Ramonatxo, 2006)

Ces molécules et leurs dérivés ont été classés selon leur nature chimique en deux types majeurs : les espèces réactives d'oxygène(ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN).

I.3.1.1. Les espèces réactives oxygénées (ERO)

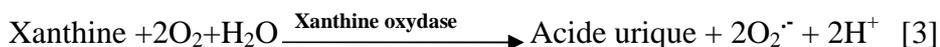
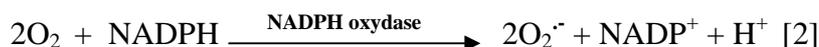
Le terme ERO réfère aux espèces oxygénées qu'elles soient radicalaires tels l'anion superoxyde et le radical hydroxyle ou non radicalaires tel l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (Pincemail et *al.*, 2002).

➤ L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire capte de manière univalente et séquentielle un électron, conduisant à la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde (réaction 1). Ce radical superoxyde conduit au cours de véritable chaîne d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (Cheeseman et Slater, 1993; Koechlin-Ramonatxo, 2006; Ardanaz et pagano, 2006; Ono et *al.*, 2009)



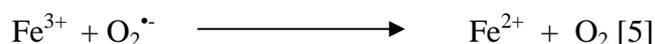
L'anion superoxyde résulte de la réduction de l'oxygène par différentes oxydases, en particulier les NADPH-oxydases microsomiales et plasmatiques (réaction [2]), la NADH-déshydrogénase mitochondriale (complexe I de la chaîne respiratoire), la xanthine oxydase (réaction [3]), la NO synthase, les eicosanoïdes et par des composés de type quinones/semiquinones naturelles et ubiquinone de la chaîne respiratoire (complexe III de la chaîne respiratoire). La poussée respiratoire (respiratory burst) des polynucléaires neutrophiles constitue également des sources cellulaires de la production d'anion superoxyde (Ardanaz et pagano, 2006; Koechlin-Ramonatxo, 2006; Huet et Duranteau, 2008).



Le radical superoxyde est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène (réaction [4]) par des superoxydes dismutases (SOD) (Ré et *al.*, 2005)



Le radical superoxyde peut réduire le Fe^{3+} et régénérer le Fe^{2+} , selon la réaction [5] (Ré et *al.*, 2005).





Le bilan de ces deux dernières réactions (ou réaction d'Haber-Weiss) est donc :



Etant donné qu'il est chargé, l'anion superoxyde est plutôt polaire, alors il ne traversera pas spontanément les membranes cytoplasmiques, mais pourra emprunter les canaux relatifs aux ions de même charge et sera dès lors moins diffusible (Vamecq et al., 2004), contrairement à son produit peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui par l'absence du charge le rend très lipophile et peu réactif en milieu aqueux, ce qui lui confère la capacité d'être retrouvé loin de sa source (Delattre et al., 2003).

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est principalement produit par la réaction de Fenton ou celle de Haber-Weiss (réaction 6,7) et il est beaucoup plus réactif que l'anion superoxyde. À l'inverse de ce dernier, le radical hydroxyle ne peut pas être détruit enzymatiquement (Vamecq et al., 2004; Gardés-Albert et al., 2003).

Une autre espèce active de l'oxygène est l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), de forme non radicalaire mais très instable, correspond à une forme activée de l'oxygène moléculaire, résultant d'une inversion de spin d'un des électrons de l'orbitale externe (Halliwell et Gutteridge 1994; Delattre et al., 2003; Vamecq et al., 2004).

I.3.1.2. Les espèces réactives nitrogénées (ERN)

La production d'espèces réactives de l'azote commence avec les réactions catalysées par les NO synthases (Vergely et Rochette, 2002; Valko et al., 2007) ;

➤ Monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$)

Le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) représente une espèce oxydante biatomique de type radicalaire ayant un électron non apparié sur l'une de ses orbitales externes, cette petite molécule détient une réactivité comparée à celle de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$. Toutefois, à l'inverse de ce dernier, le $\cdot\text{NO}$ n'est pas chargé, et peut donc plus facilement diffuser de façon isotrope à travers des membranes cellulaires ou subcellulaires (Vamecq et al., 2004; Valko et al., 2007). Sa courte durée de vie *in vivo* (de l'ordre de 6 à 10 secondes), lui permet néanmoins de diffuser d'une cellule à l'autre et de transmettre ainsi des informations assurant sa principale fonction dans la transmission du signal (Pirot, 2001).

L'oxyde nitrique est synthétisé lors de l'oxydation de l'arginine en citrulline, réaction catalysée par les oxydes nitrites synthétases en présence du NADPH et d'oxygène (figure N°3) (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998; Valko *et al.*, 2007; Mouchabac, 2009).

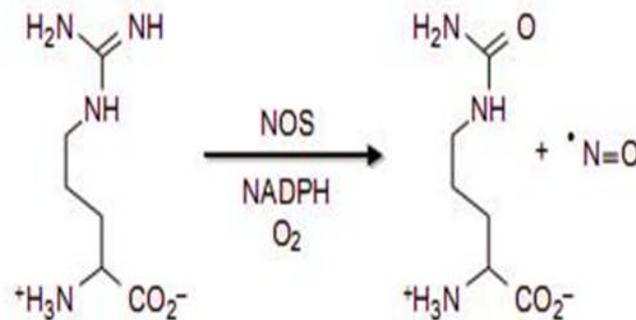
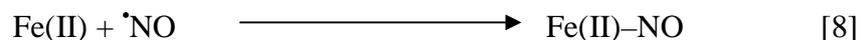


Figure N°3 : Réaction de synthèse de l'oxyde nitrique (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998)

Le monoxyde d'azote interagit fortement avec les métaux de transition (principalement le fer) (réaction[8]), il se produit une réaction de M-nitrosylation qui aboutit à la formation de complexes métal-nitrosyl (M-NO) au niveau de différentes métalloenzymes dont les hémoprotéines, mais aussi avec les protéines héminiques, ce qui régit une grande partie de ses actions biologiques et de son métabolisme. Il peut ainsi activer la guanylate cycase (sGC) (réaction [9]) soluble dans les cellules cibles où il diffuse, conduisant ainsi à la formation de guanosine monophosphate 3,5 cyclique (GMPc) à partir de GTP, responsable de nombreux processus de : vasodilatation, inhibition de l'agrégation plaquettaire, prolifération cellulaire... (Vergely et Rochette, 2002; Valko *et al.*, 2006; Valko *et al.*, 2007).



En outre, le monoxyde d'azote peut être converti en plusieurs ERN dont : le cation (NO⁺) et l'anion nitroxyde (NO⁻) (Dröge, 2002). En effet, par addition sur les doubles liaisons ou par arrachement d'H allylique, il amorce indirectement la peroxydation. Il est relativement inerte, et oxydé en dioxyde d'azote NO₂[•], plus réactif, du stress nitrosant, selon la réaction suivante (Fossey, 1993; Massion *et al.*, 2002) :



I.3.1.3. Interactions entre ERO et ERN

En présence de l'anion superoxyde, le monoxyde d'azote produit dans une interaction radical-radical, une molécule cytotoxique extrêmement réactive : le peroxynitrite (ONOO⁻) (Pincemail et *al.*, 2002; Vamecq et *al.*, 2004), selon la réaction :



Le peroxynitrite est donc très toxique, d'autant plus que, comme dans le cas du radical hydroxyle, il n'existe aucun système enzymatique spécifique capable de le dégrader (à l'exception peut-être des séléno-protéines (Vergely et Rochette, 2002).

I. 3. 2. Sources des espèces réactives

La production de radicaux libres est largement physiologique dont l'importance varie selon les tissus (figure N° 4). Elle est déterminée et dirigée par un grand nombre de mécanismes et sources tant endogènes qu'exogènes. Bien que physiologique, cette production peut être accidentelle et potentiellement délétère. Elle est dommageable si elle est prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation de l'organisme (Berger, 2006).

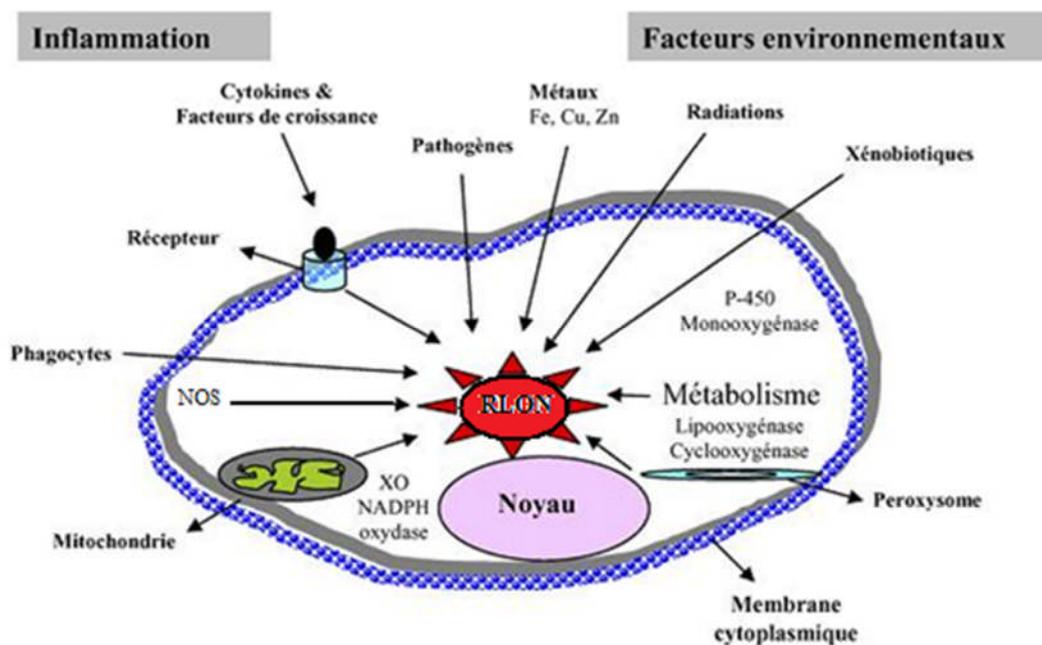


Figure N°4: Sources endogènes et exogènes des radicaux libres (Afonso et *al.*, 2007)

I. 3. 2. 1. Sources endogènes

✓ La mitochondrie est la source majeure de production des radicaux libres; en effet, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, environ 2 à 3 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique, conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ (réaction 12), au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) (Fontaine et *al.*, 2002; Gardès-Albert et *al.*, 2003; Mozaffarieh et *al.*, 2008).



Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (Gardès-Albert et *al.*, 2003; Leon et *al.*, 2004).

✓ L'inflammation est par ailleurs une autre source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé : explosion oxydative, consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes (figure N°5). Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. De même, la NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux superoxydes (Favier, 2003; Ushio-Fukai et Wayne Alexander, 2004).

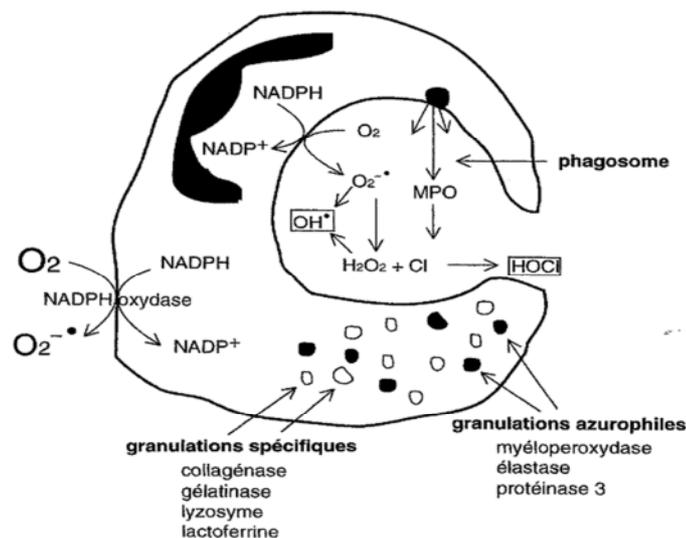


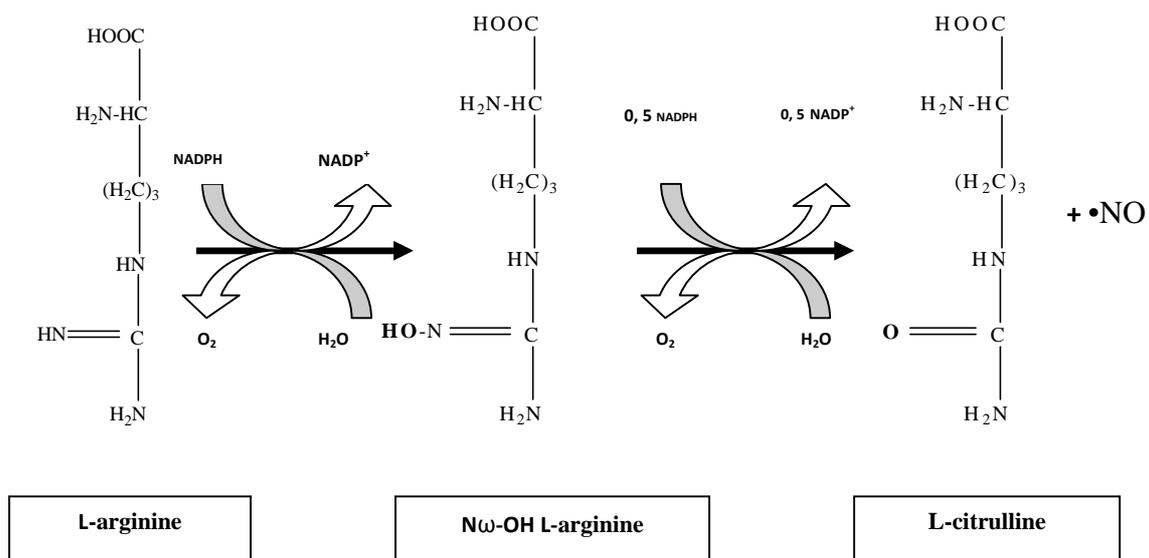
Figure N° 5 : Activation de la NADPH oxydase du polynucléaire neutrophile (Pasquier, 1995).

✓ La xanthine oxydoréductase (XOR) des mammifères existe sous deux formes interconvertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH ; E.C.1.1.1.204) qui prédomine *in vivo*, très réactive avec le NAD et la xanthine oxydase (XO ; E.C.1.1.3.22) oxygène dépendante. La conversion de la XOD en XO se fait soit d'une façon irréversible par protéolyse ou réversible par l'oxydation des groupes thiols (Berry et Hare, 2003 ; Hesberg et al., 2004).

Le rôle principal de la XOR est le catabolisme des purines, elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique, cette oxydation est accompagnée d'une libération d'anion superoxyde et ses dérivés notamment H₂O₂ (Cos et al., 1998 ; Li et al., 2002 ; Valentao et al., 2002).

✓ L'oxyde nitrique synthétases (NOS), enzyme hémique, constitue par sa structure à deux domaines réductase et oxygénase, un cas unique d'oxygénases à hème-thiolate autosuffisantes chez les mammifères (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998 ; Massion et al., 2002).

La NOS est une famille de trois isoenzymes : neuronale (nNOS, NOS₁), endothéliale (eNOS, NOS₃) qui s'expriment de façon constitutive, tandis que la troisième espèce de NOS localisée dans les macrophages, les astrocytes et microglie, est inductible (iNOS, NOS₂) (Pirrot, 2001 ; Stewart et Heales, 2003). Les NOS sont actives sous leur forme homodimérique en utilisant un ensemble de co-facteurs : tels le NADPH, la tétrahydrobioptérine (BH₄), le FAD, le FMN et la calmoduline (Sennequier et Valon-le Goff, 1998; Massion et al., 2002).



FigureN° 6: Biosynthèse de NO à partir de L-arginine par les NOS (Vergely et Rochette, 2002).

Les NOS sont également considérées comme source potentielle d'ERO lorsqu'elles fonctionnent en mode appelé 'découplé'. En effet, la NOS₃, tout comme les NOS₁ et NOS₂, est capable de générer l'anion superoxyde dans des situations de déficit de son substrat, la L-arginine, ou de ces cofacteurs d'activation, en particulier la tétrahydrobioptérine (BH₄). Lorsque la NOS₃ fonctionne en mode partiellement découplé, la production locale d'anions superoxydes et de *NO pourrait conduire à une production significative de peroxynitrite (Massion et *al.*, 2002; Beaudoux et *al.*, 2006; Schmitt et Dirsch, 2009).

✓ Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxyde peut résulter de l'auto-oxydation de composés tels que les neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), les thiols (cystéine), les coenzymes réduits (FMNH₂, FADH₂), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique (Favier, 2003 ; Gardès-Albert et *al.*, 2003).

I. 3. 2. 2. Sources exogènes

D'autres productions sont anormales, pathologiques, toujours dommageables, et sans objectif physiologique, comme par exemple celles résultant de la fumée de cigarettes, celles provenant des composés qui se trouvent dans les médicaments ou celle survenant lors d'exposition prolongée au soleil, pollution atmosphérique, ozone, radiations, pesticides (Pincemail et *al.*, 1998 b; Favier, 2003; Berger, 2006). Aussi, l'augmentation de la consommation de l'oxygène durant l'effort physique, entraîne une formation accrue d'ERO au niveau des mitochondries des cellules musculaire (Pincemail et *al.*, 2001).

Les métaux de transition sont également considérés comme des espèces pro-oxydantes source des radicaux par le biais de leur forme oxydée, mais aussi par celui de leur forme réduite, qui peut réduire une espèce oxydante en une espèce beaucoup plus réactive, notamment la réaction de Fenton dans le cas du Fer, chrome, cuivre, etc) (Fontaine, 2003; Vamecq et *al.*, 2004).

I. 3. 3. Rôle physiopathologique des radicaux libres

I. 3. 3.1. Rôle physiologique

Les espèces radicalaires possèdent des propriétés bénéfiques indispensables à l'homéostasie cellulaire, Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le monoxyde d'azote ($\bullet NO$) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques en particulier dans les cascades de signalisation (Favier, 2003).

Le $\bullet NO$ en est un exemple classique, puisqu'en activant la guanylate cyclase cytosolique, il exerce des fonctions physiologiques dans le système vasculaire, immunitaire, neuronal et métabolique. Il en est de même pour l'anion superoxyde et de l'eau oxygénée qui activent plusieurs voies de signalisation comme la voie NFkB, P53...etc. En effet, au niveau musculaire, l'exposition de fibres musculaires au H_2O_2 augmente toutes les caractéristiques de la contraction musculaire. Ces composés jouent un rôle crucial au cours de l'inflammation et de l'équilibre entre la croissance, l'apoptose et le vieillissement cellulaire (Barouki, 2006; Koechlin-Ramonatxo, 2006; Huet et Duranteau, 2008).

I. 3. 3.2. Rôle pathologique

En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Ainsi, les espèces réactives oxygénées/nitrogénées, qui sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme et dont la production est permanente et physiologique (Koechlin-Ramonatxo, 2006), ne restent pas sans conséquence. Ils réagissent avec les tissus voisins causant des lésions oxydatives par extension de proche en proche, lésant les structures biologiques des cellules (protéines, lipides, ADN et glucides) (Ré et *al.*, 2005; Berger, 2006).

De nombreuses pathologies parmi les quelles l'athérosclérose, l'arthrite, l'asthme, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le cancer, le diabète sont, en partie, liées à l'action de ces formes réactives de l'oxygène et de l'azote (Favier, 2003).

I. 3. 3 .2.1. Stress oxydant et nitrosant

L'homéostasie de la cellule normale est un équilibre fragile entre la formation de pro-oxydants et leur élimination (antioxydant). Si cet équilibre est rompu en faveur de la formation des pro-oxydants, l'organisme endure ce qui s'appelle le stress oxydant et/ou nitrosant. Il y a donc une surproduction de pro-oxydants que la cellule ne peut plus éliminer, ce déséquilibre conduit à une situation nouvelle de l'environnement cellulaire capable d'induire des dégâts au niveau de la cellule qui peuvent être réversibles mais qui peuvent également altérer de manière irréversible les fonctions cellulaires (Vergely et Rochette, 2005). Contrairement au stress oxydant, le stress nitrosant est réversible, confiné spatialement, responsable de dommages collatéraux mineurs et donc moins toxique. Il existe d'ailleurs une balance entre le stress oxydant et le stress nitrosant : les nitrosations sont stoppées par le $O_2^{\bullet-}$, tandis que le $\bullet NO$ freine les effets oxydants du ONOO. Ainsi, lorsqu'il est en excès, le $\bullet NO$ est capable de transformer le stress oxydant en stress nitrosant, par diverses réactions et donc de prolonger le stress cellulaire sous une autre forme (Massion et al., 2002).

A. Effets sur les lipides

Les lipides, principalement leurs acides gras polyinsaturés, sont facilement oxydables et constituent la cible privilégiée de l'attaque radicalaire notamment par le radical hydroxyle et peroxy-nitrite. Ces derniers sont capables d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane et peut aussi altérer le fonctionnement des protéines membranaires (Favier, 2003; Ré et al., 2005).

B. Effets sur les protéines

La toxicité des ERO/ERN s'exerce également sur les protéines, en particulier celles qui comportent les acides aminés soufrés, basiques et aromatiques (figure N°7) (Favier, 2003 ; Devasagayam et al., 2004 ; Baudin, 2006). Ainsi l'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique, c'est le cas des deux radicaux $\bullet OH$, mais aussi $O_2^{\bullet-}$, qui s'attaquent aux protéines des tissus de soutien comme le collagène du tissu conjonctif, induisant leur perte de capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant de ce fait la signalisation cellulaire (Favier, 2003 ; Heyne et al., 2005; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Par ailleurs, l'anion peroxyxynitrite peut réagir avec une protéine contenant des résidus tyrosine formant ainsi la 3-nitrotyrosine impliqué dans la génération et le développement de l'athérosclérose (Tsuda et *al.*, 2000; Vergely et Rochette, 2002). Cependant, les processus réversibles d'oxydation et de réduction, notamment des groupements thiols des résidus cystéines des protéines, sont impliqués dans un bon nombre de processus de signalisation et de régulation de l'expression des gènes (Ré et *al.*, 2005).

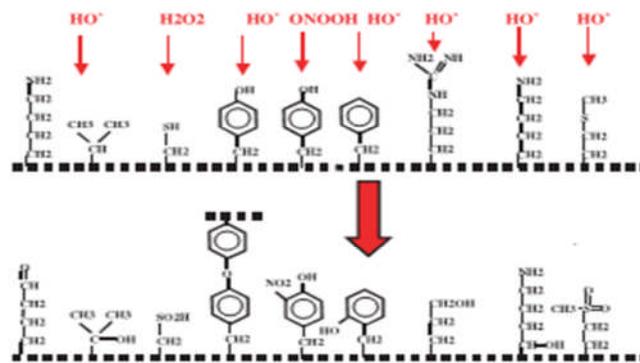
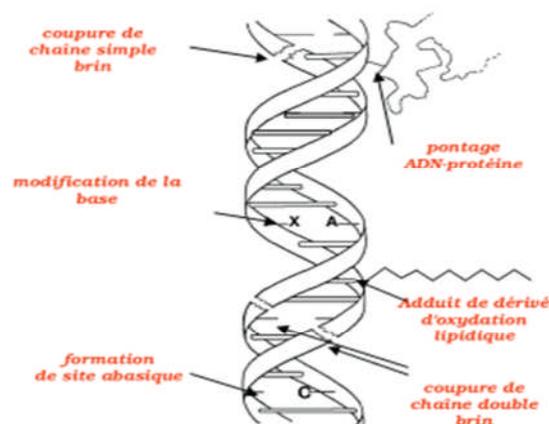


Figure N°7 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

C. Effets sur les acides nucléiques

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN,ADN) sont aussi des cibles privilégiées pour les radicaux libres que ce soit oxygénés, azotés ou des composés pro-oxydants. Toutefois, la haute réactivité de $\cdot\text{OH}$ est à la base d'un grand nombre de produits d'oxydation puisque il réagit facilement avec les bases puriques et pyrimidiques et avec tous les atomes de carbones des sucres ribose et désoxyribose (Delattre et *al.*, 2003).



FigureN° 8: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas réparées, entraînent à long terme des altérations géniques: cassures chromosomiques, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique susceptible de favoriser la cancérogenèse et le vieillissement tissulaire (figure N° 8) (Koechlin -Ramonatxo, 2006).

A titre d'exemple, l'une des mutations les plus fréquentes est due à l'interaction du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) avec le carbone 8 de la guanine formant ainsi le 8-hydroxy-guanosine (figure N°9). De même, les atomes de carbone 4 et 5 sont particulièrement sensibles à l'interaction de ce radical. En outre, des attaques semblables ont été retrouvées sur les mêmes atomes de l'adénine ainsi que sur les C du noyau ou du groupement méthyle de la thymine pour former du thymidine-glycol (Delattre et *al.*, 2003; Devasagayam et *al.*, 2004; Baudin, 2006).

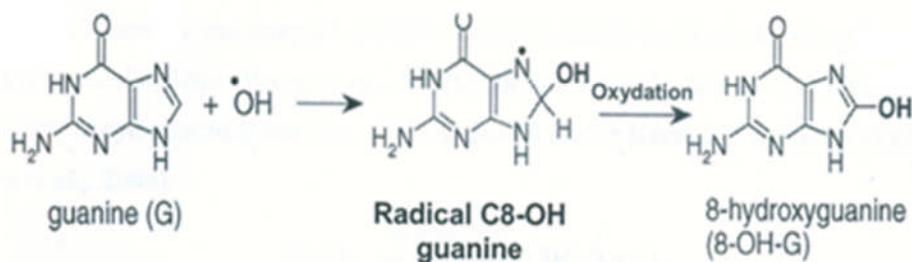


Figure N°9 : Action du radical libre $\cdot\text{OH}$ sur la base guanine (Pincemail et *al.*, 1999).

D. Effets sur les glucides

Les radicaux libres peuvent aussi avoir comme cible les glucides. En effet, le glucose mais aussi le mannose peuvent s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $\cdot\text{OH}$, qui entraînent la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Pasquier, 1995; Favier, 2003).

Ainsi, les radicaux libres de l'oxygène générés par les neutrophiles *in vivo*, provoquent une dépolymérisation des glucides comme l'acide hyaluronique qui maintient la viscosité élevée du liquide synovial. Cette dépolymérisation conduit donc au développement de la polyarthrite rhumatoïde (Martfnez-Cayuela, 1995; Pasquier, 1995; Devasagayam et *al.*, 2004).

I. 3. 4 . Le contrôle des radicaux libres par la cellule

Les effets potentiellement délétères des espèces radicalaires sont contrôlés dans l'organisme par la présence de systèmes de défense appelés antioxydants, localisés dans les compartiments intra-et extracellulaires. Par définition, Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, que ce soit de type antioxydant enzymatiques ou non enzymatiques (Vergely et Rochette, 2005; Berger, 2006).

I. 3. 4. 1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont la première ligne de défense de la cellule contre les radicaux libres ; il s'agit d'une série d'enzymes spécifiques (superoxyde dismutases (SOD), catalases (CAT), glutathion peroxydase (GPx), glutathion réductase (GR)), capables d'éliminer de façon catalytique des radicaux libres et d'autres espèces réactives (figure N°10) (Goudable et Favier 1997; Delattre et *al.*, 2003; Vergely et Rochette, 2005; Koehlin -Ramonatxo, 2006).

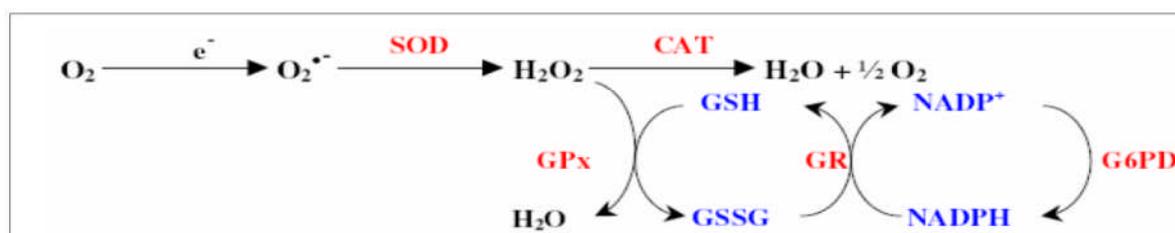


Figure N°10: Résumé du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active (Marfak, 2003).

I. 3. 4. 1. Antioxydants non enzymatiques

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydants et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler le niveau d'espèces réactives de l'oxygène/nitrogène. Certains composés antioxydants synthétisés *in vivo* de nature protéique non enzymatique tel que la céruléoplasmine, l'albumine, la transferrine et la métallothionéine, par fixation des ions Fe^{2+} / Fe^{3+} , Cu^{2+} / Cu^+ , diminuent la disponibilité de ces pro-oxydants mais aussi empêchent leur interaction avec les hydroperoxydes et la formation du radical $\bullet OH$ (Delattre et *al.*, 2003).

D'autres molécules de faible poids moléculaire synthétisées aussi par la cellule notamment la bilirubine, l'acide urique et le glutathion sont capables non seulement de piéger les radicaux oxygénés, mais aussi les radicaux azotés ($\bullet NO$) (Delattre et *al.*, 2003; Favier, 2003; Koehlin-Ramonatxo, 2006).

D'autre part, l'apport alimentaire fournit aux cellules une autre gamme d'antioxydants à savoir les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone) qui agissent en piégeant les radicaux en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement notamment: les polyphénols et les alcaloïdes (Curtay et Robin, 2000; Favier, 2003).

A cela s'ajoute un certain nombre d'oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium indispensables pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, MnSOD, SeGPx) (Pincemail et al., 2002).

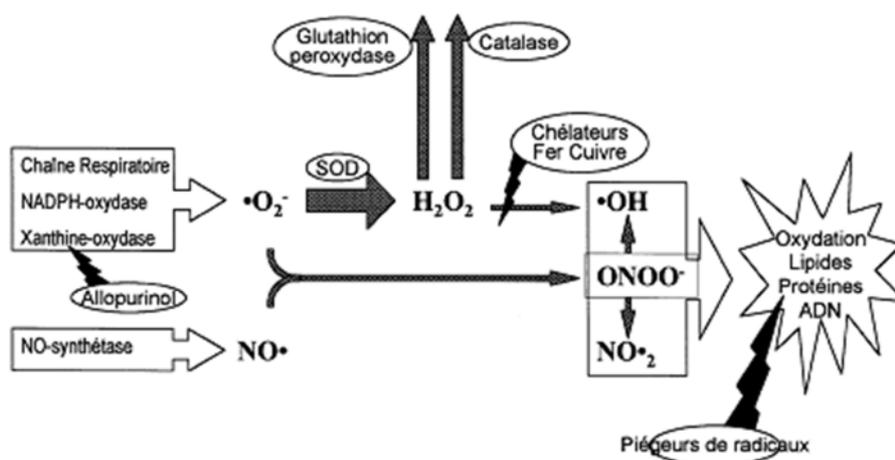


Figure N°11: Action des antioxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène/nitrogène (Fontaine et al., 2002)

Même si les mécanismes de défense mis en jeu sont différents, l'ensemble du dispositif permet d'assurer une protection antiradicalaire sur l'ensemble de l'espace cellulaire et tous les acteurs de cette lutte ne sont pas seulement complémentaires, mais ils sont synergiques (Fontaine et al., 2002). Cependant dans certaines conditions physiologiques s'applique la théorie « tout antioxydant peut devenir pro-oxydant », comme en présence de fer, l'acide ascorbique a un effet pro-oxydant, De même pour l'alpha tocophérol à fortes concentrations et les flavonoïdes (figure N°12) comme la quercétine et la myricétine qui peuvent également présenter des propriétés pro-oxydantes (Heim et al., 2002; Rietjens et al., 2002; Cillard et Cillard, 2006)

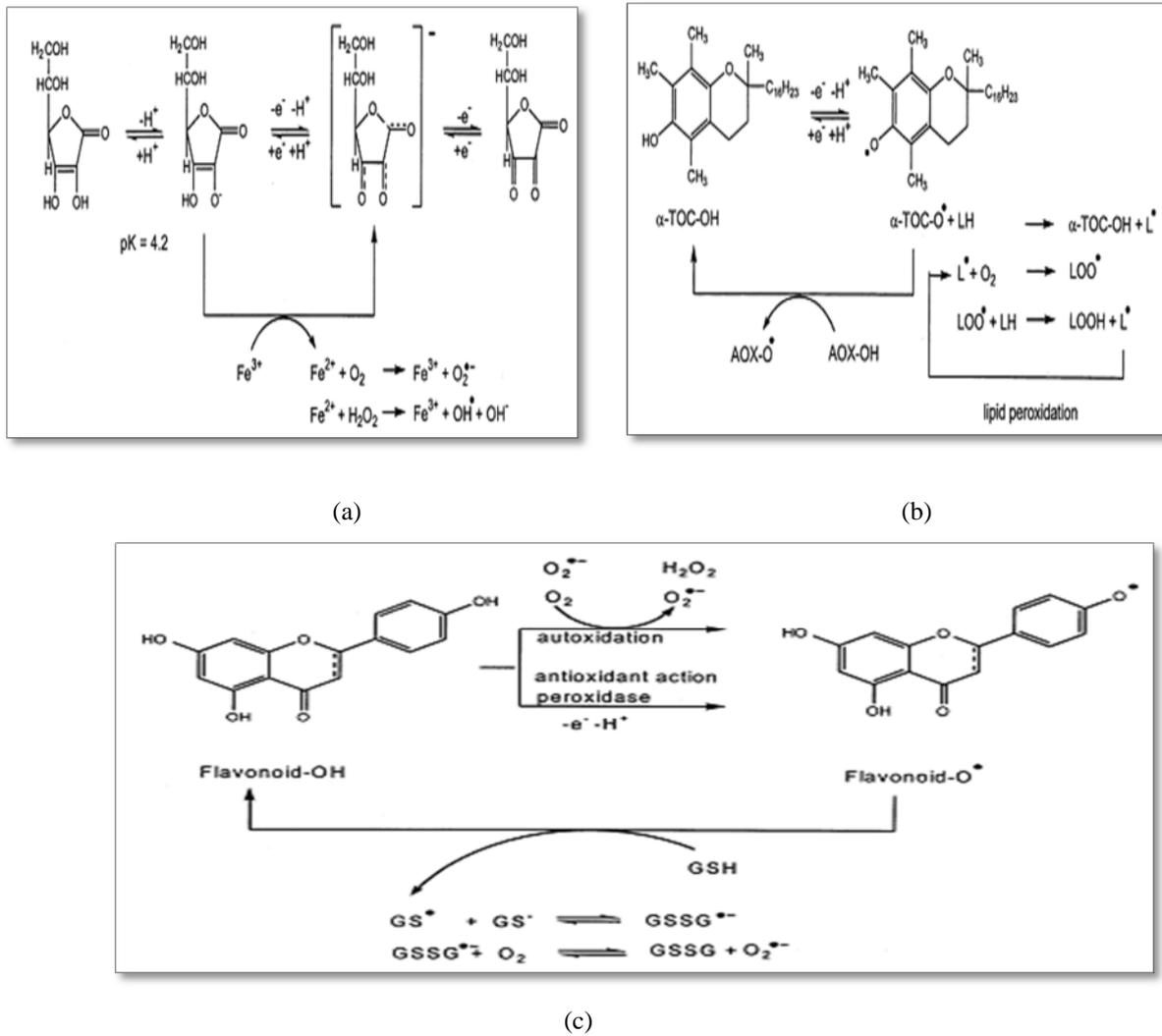


Figure N°12 : Effet pro-oxydant de (a) la vitamine C, (b) la vitamine E, (c) les flavonoïdes (Rietjens et al., 2002).

Il conviendra alors de réserver le terme d'antioxydant à des composés dont la teneur dans les tissus diminue lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques (Favier, 2003).

1.4. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires très répandus dans le règne végétal ; ils sont présents dans les différentes parties de la plante : les racines et les feuilles, dans les fruits et l'écorce et surtout dans les fleurs (Richter, 1993). Ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structurel fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 1999; Macheix et al., 2005).

1. 4. 1. Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromatisation :

✓ Voie du shikimate :

La voie la plus courante est celle du shikimate, elle débute par la condensation d'un phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate (voie des pentoses) pour former un composé hétérocycle à sept carbones C₇, le 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP), lequel après déphosphorylation et réduction donne du shikimate. Une série de réactions assure ensuite l'accrochage d'une chaîne latérale et la création d'une double liaison sur le cycle, d'où la formation de l'acide chorismique qui se transforme en acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine), conduisant par la suite à l'acide cinnamique et ses dérivés : acide benzoïque, acétophénone, lignines et lignanes, coumarines...etc.) (Figure N°13) (Richter, 1993 ; Bruneton, 1999)

✓ Voie de polyacétate

Cette voie commence de l'acétate et conduit à des poly β -cétosters de longueur variable (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : quinones, xanthones, chromones, isocoumarines, ...etc (Richter, 1993; Bruneton, 1999). De plus, la diversité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composé d'origine mixte des deux voies, tels que les flavonoïdes (Bruneton, 1999; Martin et Anriantsitoraino, 2002).

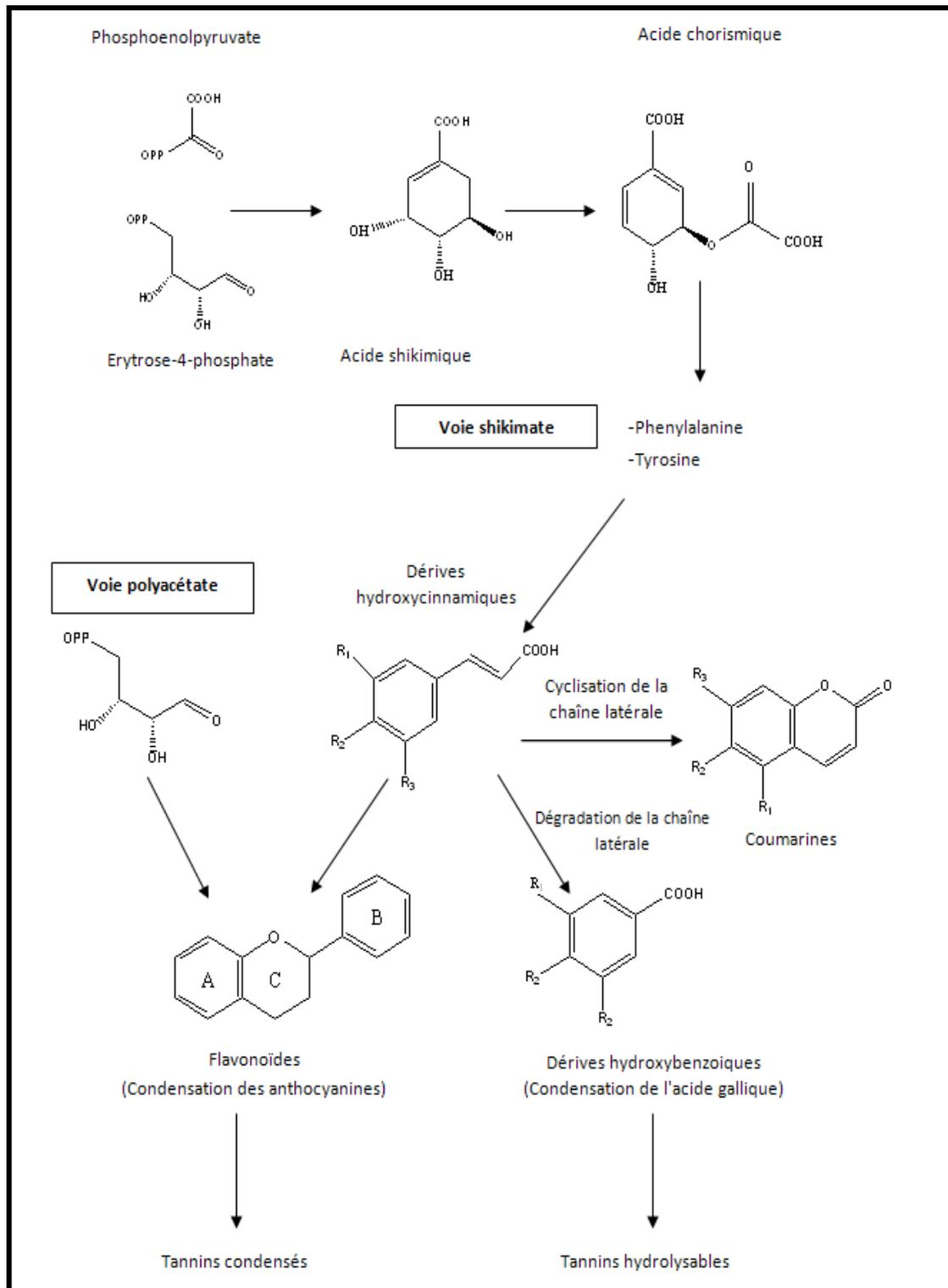


Figure N°13: Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

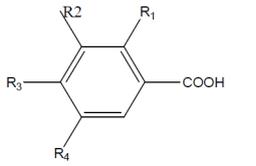
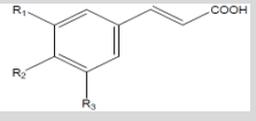
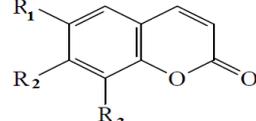
I. 4.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent se regrouper en de nombreuses classes qui se différencient par la complexité, le degré de modification du squelette de base (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation.....) ainsi que les liaisons possibles avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines....) (Cheynier et al., 1998; Macheix et al., 2005). Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins constituent trois grandes classes regroupant la majorité des structures (Bruneton, 1999; Martin et Anriantsitoraino, 2002; Wollgast, 2004 ; Macheix et al., 2005).

I. 4.2.1. Les phénols simples

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique (Chirac et al., 2008), ils sont divisés en acides benzoïques à sept atomes de carbones (C6-C1), en acides cinnamiques à neuf atomes de carbone (C6-C3) et enfin en coumarines qui possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes, accolés à un noyau benzoïque et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation de leur chaîne latérale (Ribereau-Gayon, 1968; Bruneton, 1999; Macheix et al., 2005). Ainsi les principaux acides simples sont représentés dans le Tableau N°III

Tableau N°III: Classification des acides phénoliques

Les classes	Structure générale	Exemples de composés	Substituants	Références	
Acides phénoliques		Acide phénylhydroxybenzoïque	R1=R2=R4=H, R3=OH	Manach et al., 2004).	
		Acide vanillique	R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH		
		Acide gallique	R1=H, R2=R3=R4=OH		
		Acide salicylique	R1=OH, R2=R3=R4=H		
	Acides hydroxycinnamiques		Acide <i>p</i> -coumarique	R1=R3=H, R2=OH	Manach et al., 2004
			Acide caféique	R1=R2=OH, R3=H	
			Acide sinapique	R1=R3=OCH3, R2=OH	
	Coumarines		Ombelliférone	R1= R3= H ; R2= OH	Bruneton, 1999
			Esculitol	R1= R2= OH ; R3= H	
Scopolétole			R1= OCH3 ; R2= OH ; R3= H		

I. 4 .2. 1. 2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration jaune, orange et rouge des fleurs, des fruits et des feuilles, ils constituent une énorme classe de composés phénoliques naturels de plus de 6 000 composés. (Ghedira, 2005).

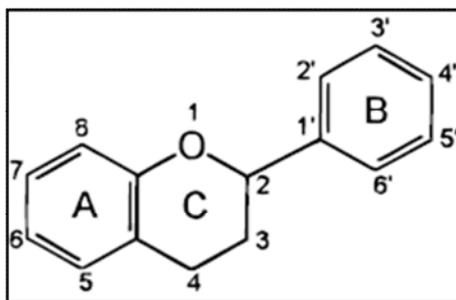


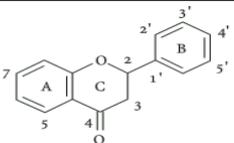
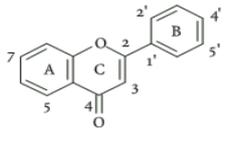
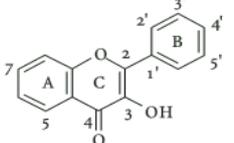
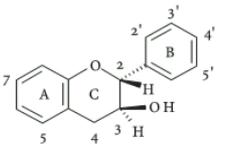
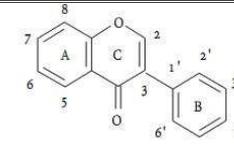
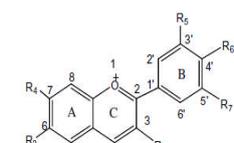
Figure N°14 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Pietta, 2000 ; Balasundram et *al.*, 2006).

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et sont synthétisés dans la plante à partir des acides aminés aromatiques, et leurs structures de base (figure N°14) est un noyau flavane constitué de 15 atomes de carbone arrangés en 3 cycles C6-C3-C6 : A, B et C avec un ou plusieurs substituant hydroxyl (Pietta, 2000; Vermerris et Nicholson, 2006).

Cette structure de base est le produit des deux voies de synthèse des composés phénoliques ; le noyau B et le pont carbone constituant une unité phénylpronanoïde synthétisée à partir de la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique, alors que le noyau A vient de la condensation de 3 motifs acétate via la voie de l'acide malonique. La fusion de ces deux parties implique la condensation d'un phénylpronanoïde, le 4-coumaryl, avec 3 malonyl CoA donnant chacun 2 atomes de carbone, donnant ainsi le tétrahydroxychalcone, qui va à son tour donner tous les flavonoïdes (figure N° 14) (Martens et Mithofer, 2005; Balasundram et *al.*, 2006; Chira et *al.*, 2008)

On distingue un grand nombre de flavonoïdes, selon le degré d'oxydation de la chaîne à trois carbones ainsi qu'à leur degré d'insaturation. La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permet de distinguer les différentes classes des flavonoïdes. Différents groupes ont été identifiés dont six sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les anthocyanidines qui sont représentés dans le tableau(IV) (Heim et *al.*, 2002; Chira et *al.*, 2008).

Tableau N° IV. Classification des flavonoïdes

Classes de flavonoïdes	Structure générale	Exemples de composés	Substituants	Références
Flavonoïdes		Hespéridine	5=7=3'=OH ; 4' = OCH ₃	Heim et <i>al.</i> , 2002 ; Pietta, 2000
		Naringénine	5=7=4' = OH ; 3' = H	
		Lutéoline	5=7=3'=4' = OH	Pietta, 2000
		Apigénine	5=7=4' = OH ; 3'=H	
		Chrysin	5=7=OH ; 4' = 3'=H	
		Quercétine	5=7=3'=4' = OH ; 5'=H	Pietta, 2000
		Kaempferol	5=7=4' = OH ; 5'=3'=H	
		Myricétine	5=7=3'=4' = 5'=OH	
		Catéchine	3= β OH ; 5=7=3'=4' = OH	Havsteen, 2002 ; Pietta, 2000
		Epicatéchine	3= α OH ; 5=7=3'=4' = OH	
		Génesteine	5=7 =4' = OH	Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005
		génistine	5=4' = OH ; 7= Oglc	
		Delphinidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₅ = R ₆ = R ₇ =OH ; R ₃ = H	Cheynier, 2005 ; Castaneda-Ovando et <i>al.</i> , 2009
		Cyanidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₅ = R ₆ =OH ; R ₃ = R ₇ =H	
		Malvidine	R ₁ = R ₂ = R ₄ = R ₆ =OH ; R ₃ =H ; R ₇ =R ₅ = OMe	

I. 4 .2. 1. 3. Les tannins

Ce sont des composés phénoliques complexes largement distribués chez les plantes supérieures, obtenus à partir de la condensation des phénols simples et se caractérisent par des propriétés astringentes prononcées (Macheix et *al.*, 2005; D'Archivio et *al.*, 2007). Ils s'intègrent dans la défense des végétaux contre les herbivores, en particulier pour les plantes se développant dans les zones difficiles (Zimmer et Cordesse, 1996).

Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da, et leur propriété importante réside dans la combinaison de leur nombreux hydroxyles avec les fonctions amides des protéines aux quelles ils se lient par différentes liaisons : hydrogènes, ioniques ou par des interactions hydrophobes (Makkar, 2003; Vermerris et Nicholson, 2006). Deux groupes de tannins se diffèrent aussi bien par leur structure que par leur origine biosynthétique : tannins hydrolysables et tannins condensés (Ribéreau-Gayon, 1968; Bruneton, 1999).

✓ Tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucides et d'acides phénoliques, la molécule glucidique est en général du glucose (Ribéreau-Gayon, 1968). Ils sont facilement hydrolysables par les acides ou les enzymes (tannases) en ose et en acide phénolique, selon la nature de celui-ci, on distingue les gallotannins (figure N°15) et les ellagitannins (Bennick, 2002; Oszmianski et al., 2007).

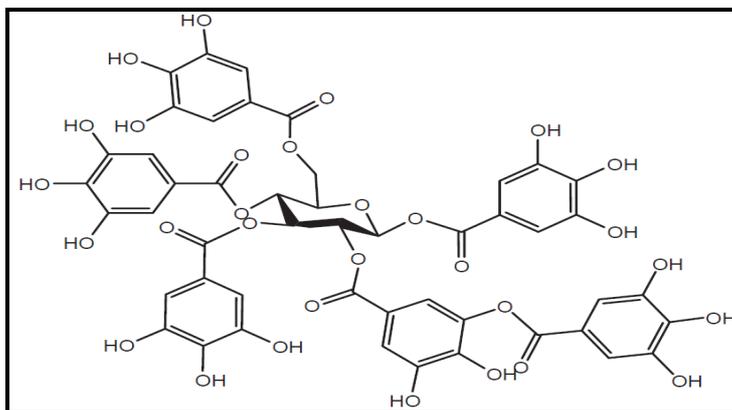
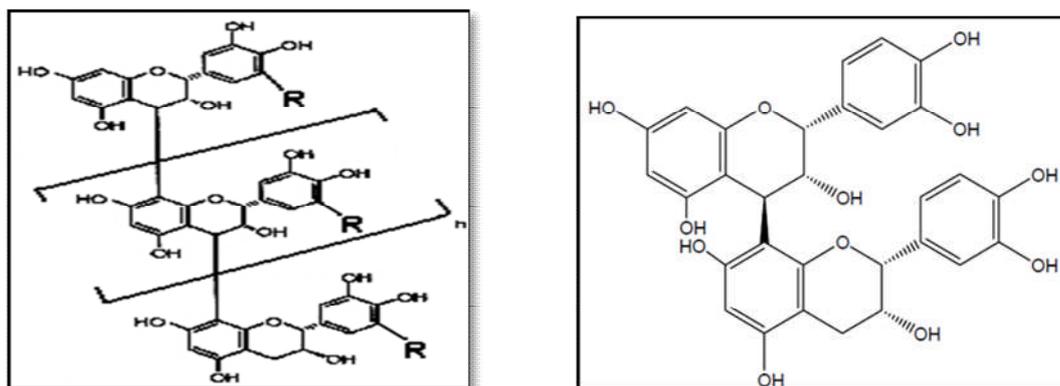


Figure N°15 : Exemple de structure d'un tannin hydrolysable (Gallotannin) (Macheix et al., 2005)

✓ Tannins condensés

Les tannins condensés (ou proanthocyanidines) sont des dimères ou polymères de flavane-3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanes-3,4-diols (leucoanthocyanes ou pro-anthocyanidols) (Zimmer et Cordesse., 1996; Bruneton, 1999). L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C, ou par ramification grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (figure N° 16) (Macheix et al., 2005).



R=H : unité procyanidine, dérivée de la catéchine.
épicatechine

Procyanidine B2 : épicatechine-(4 β →8')-

R=OH : unité prodelphinidine, dérivée de la catéchine.

Figure 16 N°: Exemple de structures des tannins condensés (Macheix *et al.*, 2005; Vermerris et Nicholson, 2006).

I. 4. 3. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont des composés aromatiques solubles dans les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Les polyphénols les moins polaires à savoir, les isoflavonoïdes, les flavonoïdes, sont solubles dans d'autres solvants, tels que l'éther, le chloroforme et l'hexane, néanmoins, les formes hétérosides des flavonoïdes sont solubles dans l'eau ainsi que dans l'eau chaude mélangée avec de l'alcool (Bruneton, 1999; Macheix *et al.*, 2005). Ces métabolites secondaires sont connus par leurs propriétés à former des complexes avec certaines molécules organiques et aussi avec certaines macromolécules. Ce phénomène d'association peut être covalent ou non covalent, c'est le cas de l'association des tannins avec les protéines pour former des complexes insolubles (Bruneton, 1999; Martin et Andriantsitohaina, 2002; Macheix *et al.*, 2005).

I. 4. 4. Propriétés biologiques

I. 4. 4. 1. Chez la plante

Les progrès des techniques analytiques et des approches moléculaires ont permis de confirmer et de préciser la diversité et l'importance des composés phénoliques. Ils sont impliqués dans de nombreuses facettes des systèmes biologiques des plantes : pigmentation, mécanismes de croissance et de reproduction comme ils constituent des éléments essentiels dans les interactions de ces dernières avec leur milieu environnant (Ribereau-Gayon, 1968; Bruneton, 1999; Cheynier, 2005; Macheix *et al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont impliqués aussi dans les mécanismes de réponse des plantes aux blessures mécaniques. En effet, la capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes pathogènes est souvent corrélée à la teneur en composés phénoliques. Il a été démontré que de nombreux phénols ou les quinones qui en dérivent par oxydation sont des inhibiteurs du développement de certains microorganismes saprophytes ou parasites champignons. A titre d'exemple, les phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation, au niveau de la blessure, d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (Bruneton, 1999; Macheix *et al.*, 2005; Vermerris et Nicholson, 2006). De même, les lignines, dont le rôle essentiel est l'épaississement des parois cellulaires, améliorent le transport de la sève brute à l'intérieur de la plante (Vermerris et Nicholson, 2006).

Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV et certains d'entre eux (anthocyanes, flavonols, auronés...) absorbent également dans le visible, cette caractéristique rend ces métabolites des excellents protecteurs des plantes contre les rayonnements nocifs (Macheix *et al.*, 2005; Terrier *et al.*, 2009).

I. 4. 4. 2. Chez l'Homme

Les polyphénols, groupe de molécules de structures variées, trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie. Ils suscitent de plus en plus beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en terme de variété d'activités biologiques qui leur sont attribuée, incluant des activités anti-microbiennes, anti-virales, anti-inflammatoires, anti-diabétiques et anti-tumorales (Rice-Evans *et al.*, 1996; Martin et Andriantsitohaina, 2002; Hennebelle *et al.*, 2004). Ces propriétés pharmacologiques sont attribuées entre autre, à leur habilité à inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des cellules telles que les phosphodiéstrases, les kinases, les topoisomérases, lipooxygénase, la phospholipase A2, les cyclooxygénases ainsi que les enzymes impliquées dans le stress oxydatif telles que la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthétase (Pietta, 2000; Da Silva *et al.*, 2004; Santangelo *et al.*, 2007; Leopoldini *et al.*, 2011). C'est pourquoi des études, tant pharmacologiques que cliniques tentent d'expliquer le réel impact de leur action sur la santé humaine, notamment l'activité antioxydant.

✓ Propriétés antioxydants

L'activité antioxydant des composés phénoliques et leurs métabolites est due à leurs capacité à neutraliser les radicaux libres, soit par transfert d'un atome d'hydrogène par rupture homolytique de la liaison O–H ou par transfert d'un électron (figure N°17), chélater les ions métalliques ou à inhiber les enzymes responsables de la production des ERO/ERN (Rice-Evans et al., 1996; Rolland, 2004; Balasundram et al., 2006; Leopoldini et al., 2011).

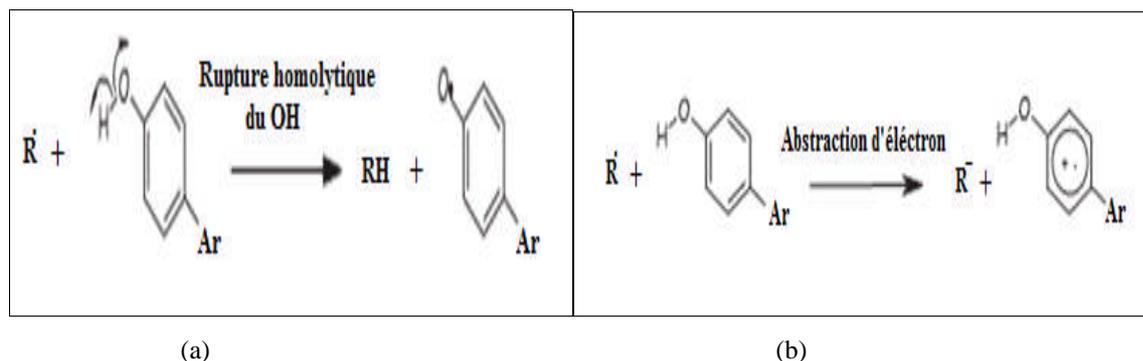


Figure N°17: Mécanisme de neutralisation des radicaux libres (a) Par transfert d'un atome d'hydrogène ; (b) par transfert d'un électron (Leopoldini et al., 2011).

La présente étude a pour objectifs

- En premier lieu, l'évaluation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus* pour leur éventuels pouvoir réducteur (méthode FRAP) et activité anti-radicalaire (ABTS^{•+}, anion superoxyde (O₂^{•-}) et monoxyde d'azote (•NO)) ;
- Puis l'évaluation de l'activité antioxydant des fractions des extraits de feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus* par les mêmes tests réalisés dans la première partie ;
- En dernier lieu, le fractionnement et la caractérisation par chromatographie sur couche mince CCM des fractions actives de chaque activité testée.

II- Matériel et méthodes

II- 1. Préparation des extraits

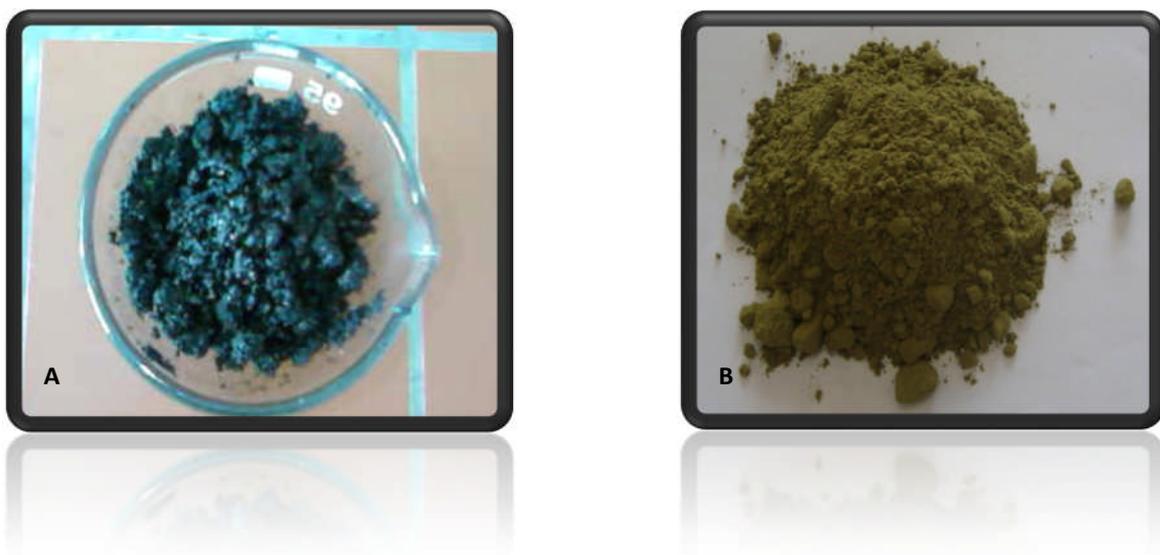
II-1-1- Cueillette du matériel végétal

Le choix de la plante, *Pistacia lentiscus*, comme sujet d'étude dans le présent travail a été guidé non seulement par les nombreuses utilisations traditionnelles qui en sont répertoriées, mais aussi par le fait qu'il s'agit d'une plante très abondante localement et relativement peu étudiée en Algérie. Sur cette base, nous avons utilisé les feuilles et les fruits qui ont été récoltés en juillet et en novembre 2009, respectivement, dans la forêt d'Azru n'Bechar, daïra d'Amizour, située à l'Est de Béjaïa, un endroit naturel et peu fréquenté. Figure (N°1) (Annexe 1).

II-1-2- Séchage, broyage et tamisage

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été séchées à une température ambiante à l'abri de la lumière vive jusqu'à son épuisement en eau pendant la période de Juillet-Août 2009. Cependant, le séchage des graines a été réalisé dans une étuve aérée à 37 C°. La matière sèche des deux parties (feuilles et graines) obtenue est ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique en poudre fine pour les feuilles et en pâte visqueuse homogène pour les fruits. Le broyat des feuilles a été ensuite passé par des tamis de différents diamètres afin d'obtenir une poudre fine à granulométrie homogène inférieure à 63µm (Atmani et al., 2009).

La poudre des feuilles et la pâte des fruits ainsi obtenues sont ensuite conservées dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement et stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations.



FigureN°18 : Photographies du matériel végétal de *Pistacia lentiscus* A) Pâte des graines. B) Poudre des feuilles.

II-1-3- Extraction des composés phénoliques

Dans la présente étude, nous avons adopté la méthodologie d'extraction des polyphénols décrite par Chiang et ses collaborateurs (1994), avec quelques modifications (Atmani et *al.*, 2009) dont le protocole d'extraction est détaillé dans la figure N°19.

Au total cinq extraits sont obtenus pour les feuilles (extrait ethanologique, extrait acétate d'éthyle, extrait aqueux acétate d'éthyle, extrait du chloroforme et extrait aqueux du chloroforme) et quatre extraits pour les graines de la plante étudiée (extrait ethanologique, extrait acétate d'éthyle, extrait aqueux acétate d'éthyle, extrait du chloroforme).

Le taux d'extraction est calculé, à chaque étape, par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] 100$$

P_1 : poids d'extrait après évaporation (g).

P_0 : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

E : poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1- Dosage des phénols totaux

- **Principe de la méthode**

Le dosage des phénols totaux des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*, a été réalisé selon le protocole décrit par Lister et Wilson, 2001 in Djeridane et *al.* (2006) adapté par Singleton et Ross (1965). Ces auteurs ont utilisé la méthode de Folin-ciocalteu; un réactif acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Ces derniers sont réduits lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), dans une solution alcaline. Cette réaction, reflète ainsi une couleur bleue qui est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968; Boizot et Charpentier, 2006).

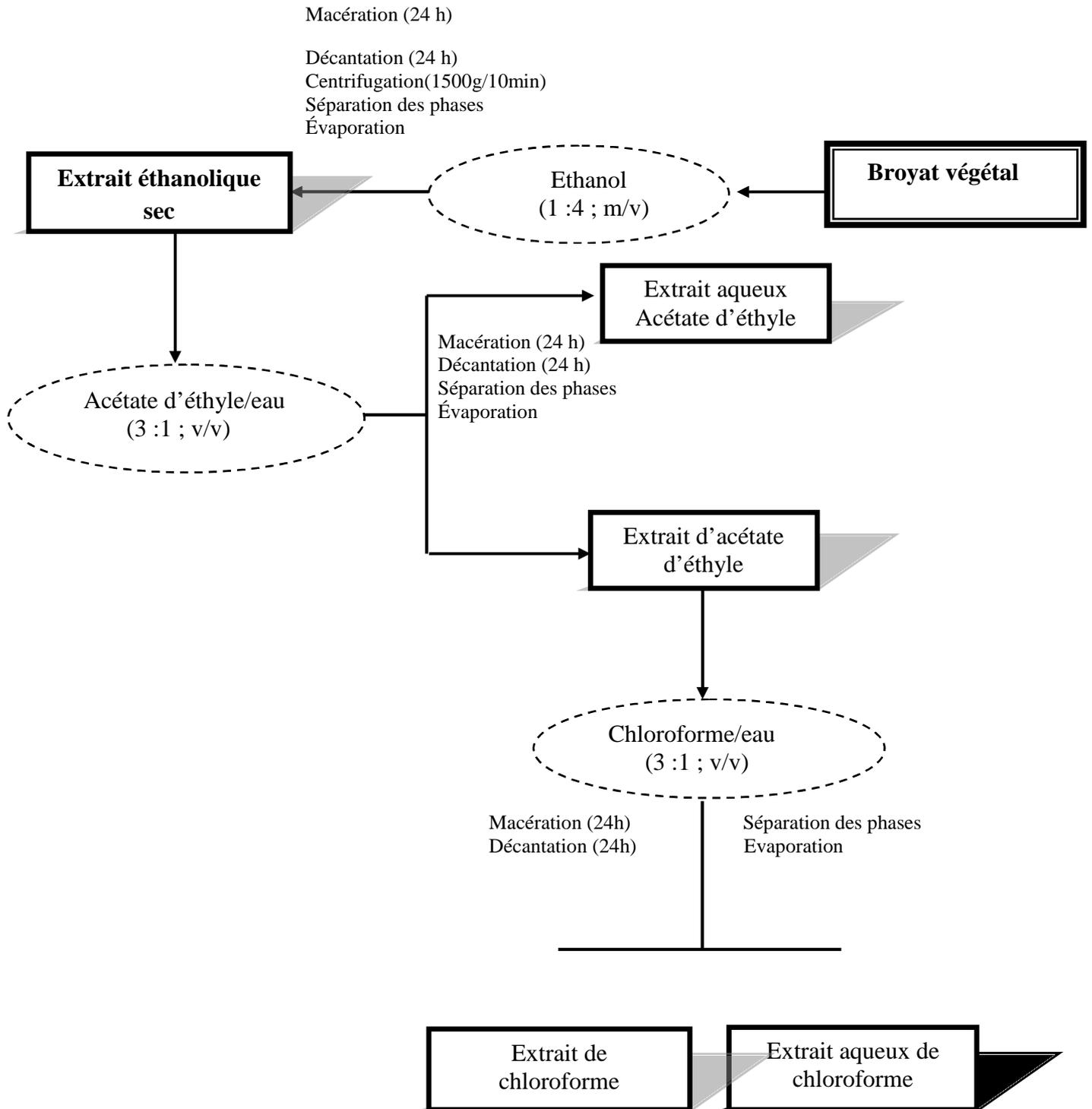


Figure N°19 : Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang et al., 1994).

- **Procédure expérimentale**

Un volume de 100µl de chaque échantillon d'extraits (100µg/ml) a été mélangé avec 500µl du réactif de folin –Ciocalteu et 1ml d'eau distillée. Après une minute d'incubation à température ambiante, un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3), à 20% a été additionné. Le mélange final a été incubé, pendant 2heures, à l'obscurité et à température ambiante et l'absorbance mesurée à une longueur d'onde de 760nm, contre un blanc. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent catéchine par rapport à un gramme d'extrait sec (mg ECat/g d'extrait), à partir d'une courbe d'étalonnage, réalisée dans les mêmes conditions en utilisant le catéchine comme standard (Annexe 2).

II-2-2- Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium est couramment utilisée pour le dosage des flavonoïdes; elle est basée sur la capacité de ces composés à former des complexes de couleur jaunâtre, acides et stables avec les chlorures d'aluminium (Ribereau-Gayon, 1968).

- **Procédure expérimentale**

Pour l'estimation de la teneur en flavonoïdes des différents extraits étudiés, nous avons appliqué la méthode des chlorures d'aluminium rapportée par Mimica Dukié (1992) in Makisimovic et *al.* (2005).

Un volume de 10ml d'extrait dissout dans du méthanol (100µg/ml) a été additionné à 5ml de chlorure d'aluminium (133mg du chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100ml d'eau distillée). Après incubation du mélange réactionnel pendant 10 minutes, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 430 nm, contre un blanc contenant 10ml de l'échantillon et 5ml d'eau distillée. L'intensité de la coloration du complexe produit est proportionnelle à la quantité en flavonoïdes contenue dans l'extrait végétal. Ainsi, les taux en flavonoïdes des extraits sont exprimés en milligramme d'équivalent rutine par rapport à un gramme d'extrait sec (mgER/g d'extrait) à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits (annexe 2).

II-2-3- Dosage des tannins

- **Principe de la méthode**

Pour le dosage des tannins, une protéine standard BSA (Bovine Sérum Albumine) a été utilisée comme modèle de protéine dans le but de séparer ces derniers des autres phénols présents dans l'extrait, étant donné que les tannins sont connus par leur propriété principale qui est la précipitation des protéines en fonction des facteurs liés au milieu réactionnel (pH, température et temps) (Hagerman et Butler, 1978).

Cette méthode repose sur la formation d'un complexe tannin-BSA de coloration violette quantifiable par spectrophotométrie à 510 nm (Hagerman et Butler, 1978).

- **Procédure expérimentale**

L'estimation quantitative des tannins contenus dans les extraits des deux parties de *Pistacia lentiscus* a été réalisée selon la méthode de Hagerman et Butler (1978). Il s'agit d'introduire dans un tube à essais 2ml de la solution de BSA (solubilisée dans le tampon A: 200mM d'acide acétique, 170Mm NaCl ajusté à pH 4,9) et 1 ml d'extrait (100µg/ml).

Après une incubation de 24heures à 4°C, une centrifugation à 3000g/15 minutes a été réalisée et le précipité récupéré a été dissout dans 4 ml de la solution SDS/TEA (5% de TEA et 1% de SDS). Après agitation, un volume de 1 ml du réactif de chlorure de fer (0.01M de FeCl₃ dans 0.01 M de HCl) a été ajouté suivi d'une agitation rigoureuse du mélange. Après 15 min d'incubation à température ambiante, la lecture d'absorbance a été effectuée à 510 nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec l'acide tannique suivant les mêmes étapes décrites par la méthode, et les teneurs en tannins des extraits sont déterminées en mg équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait sec (mg EAT/g d'extrait) (Annexe 2)

II.3. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*

II.3.1. Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (analyse FRAP)

- **Principe de la méthode**

La méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) a été développée à l'origine pour la mesure du pouvoir réducteur du plasma, par Benzie et Strain en 1996. Plus tard, elle a été adaptée et utilisée pour la mesure de l'activité antioxydant des plantes (Antolovich et al., 2002 ; Prior et al., 2005).

La méthode FRAP mesure l'aptitude des composés antioxydants à réduire, en milieu acide, le complexe incolore du 2,4,3-tripyridyltriazine-ferrique (Fe^{3+} -TPTZ), à la forme tripyridyltriazine-ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleu intense, qui absorbe à 593 nm (Antolovich et *al.*, 2001 ; Prior et *al.*, 2005), selon la réaction suivante

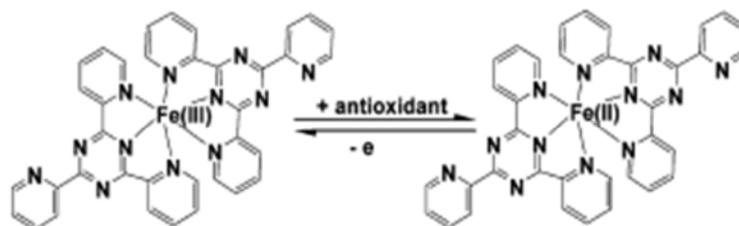


Figure N° 20 : Principe de la méthode FRAP (Prior et *al.*, 2005)

- **Procédure expérimentale**

Le pouvoir réducteur des extraits des deux parties étudiées de *Pistacia lentiscus* a été déterminé selon la méthode de Szollosi et Varga-Szolosi (2002) in Maksimovic et *al.* (2005). Le protocole expérimental de cette méthode nécessite la préparation préalable de la solution FRAP qui consiste en un mélange des solutions tampon d'acétate (300mM, (pH 3,6) avec TPTZ (10 mM préparé dans du HCl 40mM) et $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) avec un rapport de 10 :1 :1, respectivement. Un volume de 3 ml de cette solution FRAP a été mélangé avec 100 μl d'extrait, puis incubé dans un bain marie à 37°C/5 minutes et l'absorbance a été mesurée à 593 nm .Tous les tests ont été effectués en trois répliques.

Le même procédé a été réalisé sur des molécules de référence, notamment l'acide caféique et l'acide ascorbique, afin de réaliser des courbes d'étalonnage pour calculer l'équivalence en milligramme d'acide ascorbique et/ou acide caféique par gramme d'extrait (mg d'Ac ou d'AAsc/ g d'extrait) (Annexe 2).

II.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Pistacia lentiscus*

II.3.2.1. Activité scavenging des extraits de *P.lentiscus* contre le radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$)

- **Principe de la méthode**

Le test de décoloration du radical cationique $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est le plus utilisé parmi les tests indirectes. C'est une méthode spectrophotométrique qui a été suggérée par Miller et *al.* (1993) pour tester des échantillons biologiques. Par la suite elle a été largement utilisée pour tester l'activité antioxydant des aliments et les composés phénoliques (Roginsky et *al.*, 2005 ; R; Kavak et *al.*, 2010).

Le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ dont le spectre d'absorption maximal est à 734nm, résulte du contact de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine ou horseradish peroxydase), en présence du H_2O_2 ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse ,persulfate de potassium). Cette réaction se déroule à l'obscurité et à une température ambiante pendant 12 à 16h, suivant la réaction chimique schématisée dans la figure N°21 (Re et *al.*, 1999; Marc, 2004; Osman et *al.*, 2006).

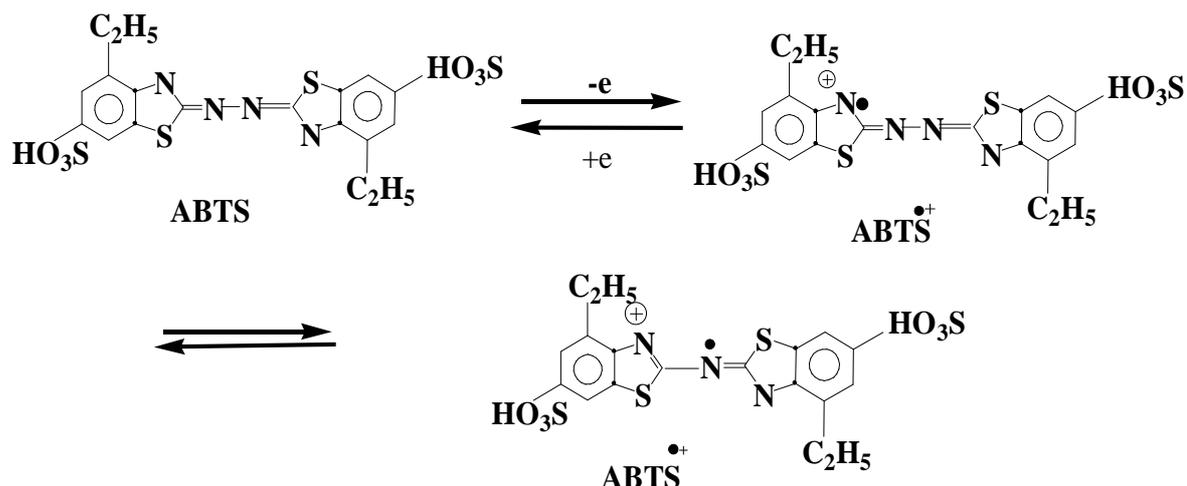


Figure N° 21 : Formation du cation $ABTS^{\bullet+}$ (Osman et *al.*, 2006).

La diminution de l'intensité de la couleur bleu verte de la solution du radical cationique ($ABTS^{\bullet+}$), traduit son interaction avec un antioxydant lipophile ou hydrophile suit au transfert d'un proton ou d'un électron (Figure N°22) (Marc, 2004; Osman et *al.*, 2006)

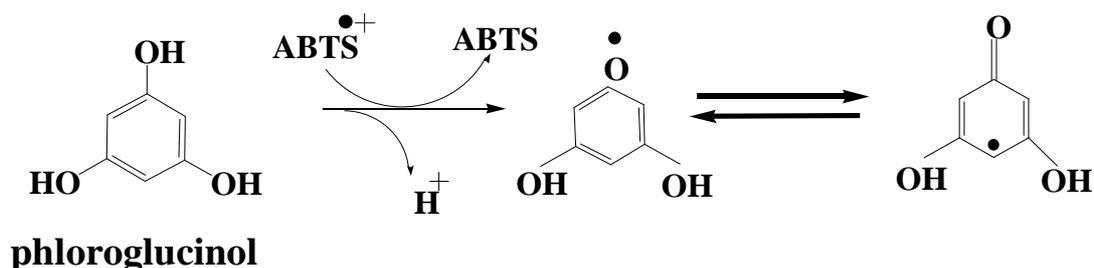


Figure N°22 : Réaction du cation $ABTS^{\bullet+}$ avec un antioxydant (Osman et *al.*, 2006).

• Procédure expérimentale

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des extraits de feuilles et de graines de *P. lentiscus* contre le cation $ABTS^{*+}$ est celle décrite par Re et *al.* (1999). Au préalable, une quantité bien déterminée de poudre ABTS (2,45 mM) est mélangée avec une solution de persulfate de potassium (7 mM). Après incubation de ce mélange à l'obscurité pendant 16 h et à température ambiante, la solution d' $ABTS^{*+}$ obtenue est ensuite diluée avec de l'éthanol jusqu'à obtention d'une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. Par la suite un volume de 10 μ l de chaque extrait ou standards à une concentration de 100 μ g/ml est additionné à 1 ml de la solution d' $ABTS^{*+}$.

L'absorbance est suivie par spectrophotomètre à 734 nm pendant 6 mn. Ainsi un pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du cation } ABTS^{*+} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Tel que : A_0 : Absorbance de la solution contrôle de l' $ABTS^{*+}$ sans extrait/standard (0,07).

A : Absorbance de la solution $ABTS^{*+}$ avec extrait/standard (à 6min).

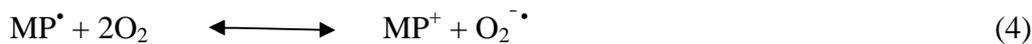
L'intensité optique obtenue sera aussi comparée avec une courbe d'étalonnage réalisée avec un antioxydant de référence (annexe 2), le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. Par conséquent, les résultats sont exprimés en termes de Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC).

II.3.2.2. Activité scavenging des extraits de *P.lentiscus* contre le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

• Principe de la méthode

Cette méthode spectrophotométrique est basée sur le suivi de la diminution de la réduction de NBT (nitrobleu tétrazolium) en formazane qui absorbe à 560 nm, en présence du radical anion superoxyde (Meunier et *al.*, 1989 ; Parejo et *al.*, 2003; Abreu et *al.*, 2006 ; Nagulendran et *al.*, 2007 ; Topçu et *al.*, 2007). Ce dernier est produit par le système du PMS/NADH suite à l'oxydation de NADH et en présence de l'oxygène moléculaire et du PMS selon le mécanisme décrit par Carloni et *al* (1993) comme suit :

Le cation 5-méthylphénozonium (MP⁺) de PMS, qui est le catalyseur dans la réduction de tetrazolium par NADH, est réduit en 5,10-dihydro-5- méthylphénaeïne(MPH). Ce dernier est oxydé par l'oxygène moléculaire en MP⁺ formant ainsi l'anion superoxyde O₂^{-•} qui de sa part réduit l'ion tetrazolium (T⁺) en formazane (FH).



- **Procédure expérimentale**

L'activité des extraits de feuilles et des graines de *P. lentiscus* contre le radical anion superoxyde (O₂^{-•}) a été évaluée par un test non enzymatique, il s'agit d'une méthode purement chimique dite PMS-NADH (Phenazine Methosulfate-Nicotinamide Adenine dinucleotide) suivant le protocole décrit par Liu et ses collaborateurs (1997) in Nagulendran et *al.*(2007).

Le radical O₂^{-•} est généré dans un mélange réactionnel dans un volume final de 3 ml, contenant le tampon tris HCl (100 mM, pH=7,4), 0,75 ml de la solution NBT (300µM), 0,75 ml de la solution NADH (936µM) et 0,3ml des différents extraits de *Pistacia lentiscus*. La réaction est initiée par l'addition d'un volume de 0,75 ml de PMS (120µM). Après 5min d'incubation du mélange réactionnel, l'absorbance est mesurée à 560 nm (Nagulendran et *al.*, 2007), ensuite l'activité scavenging du radical O₂^{-•} est calculée en appliquant l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical O}_2^{-\bullet} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où : A₀: Absorbance du contrôle.

A₁: Absorbance de l'échantillon (molécule de référence ou l'extrait).

II.3.2.3. Activité scavenging des extraits de *P.lentiscus* contre le radical monoxyde d'azote ($\dot{\text{NO}}$)

- **Principe de la méthode**

Dans une solution aqueuse à pH physiologique, le sodium nitroprusside (SNP) par décomposition spontanée génère le monoxyde d'azote ($\dot{\text{NO}}$), qui réagit avec l'oxygène moléculaire produisant des ions nitrites. Ces derniers convertissent l'acide sulphanilique dans le réactif de Griess en sel diazonium, qui est couplé à N-(1-naphthyl) ethylenediamine, produisant un complexe de coloration rose (Marcocci et *al.*, 1994; Alisi et Onyeze, 2008).

L'antioxydant par un mécanisme de compétition avec l'oxygène moléculaire réduit le $\dot{\text{NO}}$ par un transfert d'électron ou de proton empêchant par conséquent la formation du nitrite dans le milieu réactionnel. Le taux de la diminution d'absorbance est proportionnel à la capacité antioxydant de l'échantillon en terme de leurs capacités à céder un électron ou un hydrogène (Marcocci et *al.*, 1994; Razali et *al.*, 2008; Visavadiya et *al.*, 2009; Gouthamchandra et *al.*, 2010; Lee et *al.*, 2011).

- **Procédure expérimentale**

La mise en évidence de l'activité antiradicalaire des extraits contre monoxyde d'azote, a été réalisée par une méthode chimique en utilisant le réactif de Griess qui permet la révélation quantitative de nitrite ou nitrate, un produit stable formé par la réaction de l'oxyde nitrique avec l'oxygène moléculaire, dans une solution aqueuse (Kumari et Kakkar 2008), selon le protocole de Marcocci et *al.*, (1994) in Alisi et Onyeze (2008), avec quelques modifications.

Ce test consiste à mélanger 1ml d'extrait de plante (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans un tube à essai avec 1ml de la solution sodium nitroprusside (10mM) préparée dans un tampon (pH 7,2). Après incubation de 2h à 25°C, un volume de 1 ml de réactif de Griess a été additionné. Ensuite, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 550 nm. L'inhibition de la formation des nitrites par l'extrait de plante ou molécules de référence est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical } \dot{\text{NO}} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Tel que : A_0 : L'absorbance de la solution contrôle

A : L'absorbance en présence du standard ou d'extrait

II.4. Détermination des concentrations inhibitrices (IC₅₀)

Après avoir testé tous les extraits des feuilles et des graines à une concentration de 100µg/ml pour chaque activité anti-radicalaire à savoir (anti- ABTS⁺, anti-monooxyde d'azote, anti-anion superoxyde), les extraits qui ont donné les deux meilleurs taux d'inhibition ainsi que l'extrait brut (ethanolique) ont été testés à différentes concentrations pour déterminer les concentrations inhibitrices à 50% nécessaires pour diminuer 50% du taux initial des radicaux libres (IC₅₀). Cette dernière appelée la concentration inhibitrices a été calculée à partir des courbes à régression linéaire, à l'aide du logiciel «Origine». Les IC₅₀ des différents standards utilisés ont été déterminées de la même procédure afin de comparer avec celles des extraits testés.

II.5. L'analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application «ANOVA» (STATISTICA) et la comparaison des données est considérée significative à la probabilité P<0,05.

II.6. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

II.6.1. Fractionnement des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

II.6.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne

- **Définition et principe de la méthode**

La chromatographie en phase liquide sur colonne repose sur l'utilisation d'une colonne de verre remplie d'une phase stationnaire (gel d'alumine, silicate de magnésium, gel de silice ...etc.), à travers laquelle une phase mobile (éluant) s'écoule par gravité ou sous l'action d'une différence de pression, entraînant ainsi vers le bas de la colonne à des vitesses variables, des molécules sous forme de bandes les unes après les autres en fonction de leurs affinités pour l'adsorbant et leurs solubilités dans l'éluant (Skoog et *al.*, 1997 ; Cseke et *al.*, 2006 ; Mendham et *al.*, 2006).

- **Mode opératoire**

Avant la confection de la colonne, une quantité du support chromatographique (la silice ,0.063mm-0.2mm) a été préparée dans un volume de solvant le plus apolaire des systèmes d'élutions utilisés (chloroforme) sous agitation afin d'homogénéiser la bouille formée qui sera versé dans la colonne et l'excès du solvant sera éliminé.

Par la suite, une concentration de 20mg/ml de chaque extrait à fractionner a été injectée soigneusement à l'aide d'une micropipette sur les parois de la colonne en haut de la phase stationnaire. Cette dernière est traversée, par percolation, par une quantité suffisante de la phase mobile, qui dicte des changements de la polarité croissante du mélange éluant d'un gradient à un autre et qui entraîne avec elle et individualise les différentes fractions, qui seront recueillies chacune dans une boîte selon le mélange de solvant utilisé: chloroforme / acétate d'éthyle, acétate d'éthyle / méthanol, méthanol / eau (deux rapport) et enfin eau/acide acétique (deux rapport) successivement.

II.6.2. Evaluation des activités antioxydant des fractions

Cinq à six fractions ont été collectées, séchées sous la hotte et pesées, une fois terminer le fractionnement sur colonne des extraits ayant exhibé une grande activité antioxydant. Ces dernières ont été testées à une concentration de 100µg/ml pour les activités étudiées, à savoir anti- $\cdot\text{NO}$, anti- $\text{ABTS}^{+\cdot}$, anti- $\text{O}_2^{\cdot-}$ et le pouvoir réducteur FRAP, afin de déceler les fractions les plus actives.

II.6. Caractérisation des fractions actives de *Pistacia lentiscus* par chromatographie sur couche mince (CCM)

La séparation des composés chromatographie sur couche mince (CCM) en CCM repose sur les mécanismes d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions ou sur une combinaison de ces mécanismes, et elle s'effectue par migration (développement) de solutés à travers la couche mince (phase stationnaire) dans un solvant ou un mélange de solvants approprié (phase mobile) (Wichth et Anton, 2003).

A-Préparation des plaques

Une quantité de 40g de silice (Silica gel 60 F₂₅₄ avec indicateur fluorescent) est mélangée rigoureusement avec 100ml d'eau distillée, formant un gel qui est versé sur les plaques de chromatographie en verre à l'aide d'un étaleur manuel constituant ainsi une couche dite stationnaire d'épaisseurs de 0,5cm. Les plaques obtenues sont séchées à l'air libre et réactivées à 110°C/30 minutes avant chaque utilisation. Les extraits et les fractions sont déposés en parallèle avec les standards à 2cm du bord inférieur de la plaque sous forme de spots de volume de 10µl. La migration des molécules contenues dans chaque dépôt dépendra des interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Ainsi, les composés phénoliques seront séparés en fonction de leurs solubilités dans la phase mobile et leurs poids moléculaires respectifs.

B- Préparation de la phase mobile

Deux phases mobiles sont utilisées dans cette présente étude, qui permettent une meilleure séparation des composés des extraits et leurs différentes fractions actives testées. L'un des systèmes d'élution est constitué d'un mélange de solvants: acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique et l'eau distillée, alors que l'autre est formé d'un mélange d'acétate d'éthyle, d'hexane et d'acide formique. Chaque mélange sera versé dans une chambre de CCM en verre fermée, jusqu'à saturation par la vapeur des solvants.

C- Développement des plaques

La plaque est déposée verticalement dans la chambre de chromatographie contenant le système éluant conçu pour la séparation. Ce dernier monte par capillarité en entraînant avec lui les différents composés de l'extrait et des fractions formant ainsi des taches. A l'arrivée du solvant à la ligne limite de migration (14cm), la plaque est retirée de la chambre de CCM et elle est séchée à l'air libre, à température ambiante puis, examinée à la lumière du jour, pulvérisée avec la solution de vanilline sulfurique préparée selon la méthode de Eloff et *al.* (2005). A la fin la plaque est chauffée à 110 °C pendant quelques minutes dans le but de visualiser et caractériser les taches invisibles à la lumière du jour. Les rapports frontaux ont été calculés et comparés à ceux des molécules de références, permettant ainsi la caractérisation des constituants de différentes fractions.

$R_f = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance parcourue par le front du solvant.}$

III- Résultats et discussion

III.1 préparation des extraits

D'après le tableau (N°V) nous constatons que le taux d'extraction varie en fonction de la partie de la plante et du solvant utilisé. En effet, les résultats obtenus montrent bien que les taux d'extraction de la première étape sont relativement proches pour les deux parties de la plante (15,65 % et 12,75%).

Tableau N°V : Taux d'extraction des extraits de *Pistacia lentiscus*.

Solvants	Taux d'extraction (%*)	
	Feuilles	Graines
Ethanol	15,65	12,75
Acétate d'éthyle	22,5	77,10
Aqueux acétate d'éthyle	57,20	2,86
Chloroforme	66,52	77,33
Aqueux chloroforme	22,17	nd

)* : chaque pourcentage est calculé par rapport à l'extrait dont il est issu précédemment.
 - nd : non déterminé.

Un même taux d'extraction de l'extrait ethanologique que à celui des feuilles est obtenu par une étude menée par Chang et *al.*, 2007, à partir des plantes chinoises dont *Pseudodrynaria coronans* (Polypodiaceae) et *Davallia solida* (Davalliaceae) avec 15% et 12.7%, respectivement. Ce qui est largement supérieure aux résultats rapportés par Tian et *al.*, 2009 ayant utilisé le même solvant d'extraction d'une plante médicinale chinoise (*Galla chinesis*), qui n'est que de 5,68±0,35%. Ce résultat présume, au préalable, la richesse de notre plante en composés phénoliques.

Toutefois, nos résultats sont en concordance avec les travaux décrits par Kordali et *al.* (2003) où les rendements d'extractions de deux espèces *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlanticus* sont de 11.32 et 16.59%, respectivement. Des taux d'extractions des mêmes plantes, sont rapportés par Benhammou et *al.* (2008) avec 13.53% (*P. atlanticus*) et 12.64% (*P. lentiscus*) concernant les feuilles.

Des différences dans les taux d'extraction ont été enregistrées entre les résultats obtenus, concernant cette première étape d'extraction, et les données rapportées par des Berboucha et *al.* (2010) ayant appliqué le même protocole d'extraction sur les deux parties de la même plante. En effet, un taux de 18,7% a été exhibé par l'extrait ethanologique des feuilles, et 4,31% de celui des graines. Cette différence est tout à fait justifiée par les dimensions des particules, ainsi que l'origine des échantillons.

Concernant la deuxième étape d'extraction, on constate un taux d'extraction de la phase aqueuse largement supérieure, de celui de la phase organique des feuilles de *P. lentiscus* (57,20%, 22,5%, respectivement), nos résultats sont appuyés par des études antérieures réalisées par Goli et *al.* (2005) sur une espèce appartenant à la même famille: *Pistacia vera* collectée en Iran qui ont démontré que les taux d'extractions des composés phénoliques augmentent avec la polarité du solvant. Alors que Razali et *al.* (2008) et Tian et *al.* (2009) ont rapporté des taux plus élevés des extraits de *Anacardium occidentale* (40%) et *Galla chineusis* (72,69%), respectivement.

Contrairement aux extraits de feuilles, les extraits de graines sont riches en composés apolaires ce qui explique le taux d'extraction élevé observé dans l'extrait d'acétate d'éthyle 77,10%, à côté de 2,86% seulement dans la phase aqueuse

La même tendance de variation est observée lors de la comparaison des rendements des différents extraits dans la dernière étape d'extraction au niveau des graines, où le taux d'extraction de la phase organique chloroforme enregistre un taux de 77,33%. Pour les feuilles aussi le taux d'extraction de la phase organique est beaucoup plus élevé (66,52 %) par rapport à celui de la phase aqueuse (22,17%). A titre comparatif, selon Velazquez et *al.* (2003), les taux d'extractions par chloroforme des composés phénoliques des deux plantes *Schinus terebinthifolia* Engler et *Schinus weinmannifolia* Engler de famille anacardiaceae sont largement faibles 3,8 et 3 % respectivement comparé à nos résultats. Ce qui laisse présumer la richesse de cette plante en différentes classes de composés phénoliques à polarité variable.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature, car le taux n'est que relatif et semble être influencé non seulement par la méthode appliquée dans l'extraction, mais aussi par la nature chimique des composés à extraire et le solvant à utiliser. Mais ce taux est lié surtout aux propriétés génétiques des plantes ainsi qu'à l'origine

géographique qui contribuent aux différences de rendement enregistrées d'une plante à une autre et même au sein de la même espèce (kordali et *al.*, 2003; kivkac et Akay 2005).

En outre, le critère de taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car ces extraits contiennent d'autres composés autres que les composés phénoliques, cette évidence est montrée dans l'étude de quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et tannins discutée ci-dessous.

III.2. Dosage des composés phénoliques

III.2.1. Phénols totaux

Les résultats de la teneur en phénols totaux des extraits exprimés en milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EqCat /g d'extrait), sont illustrés dans la figure (N° 23).

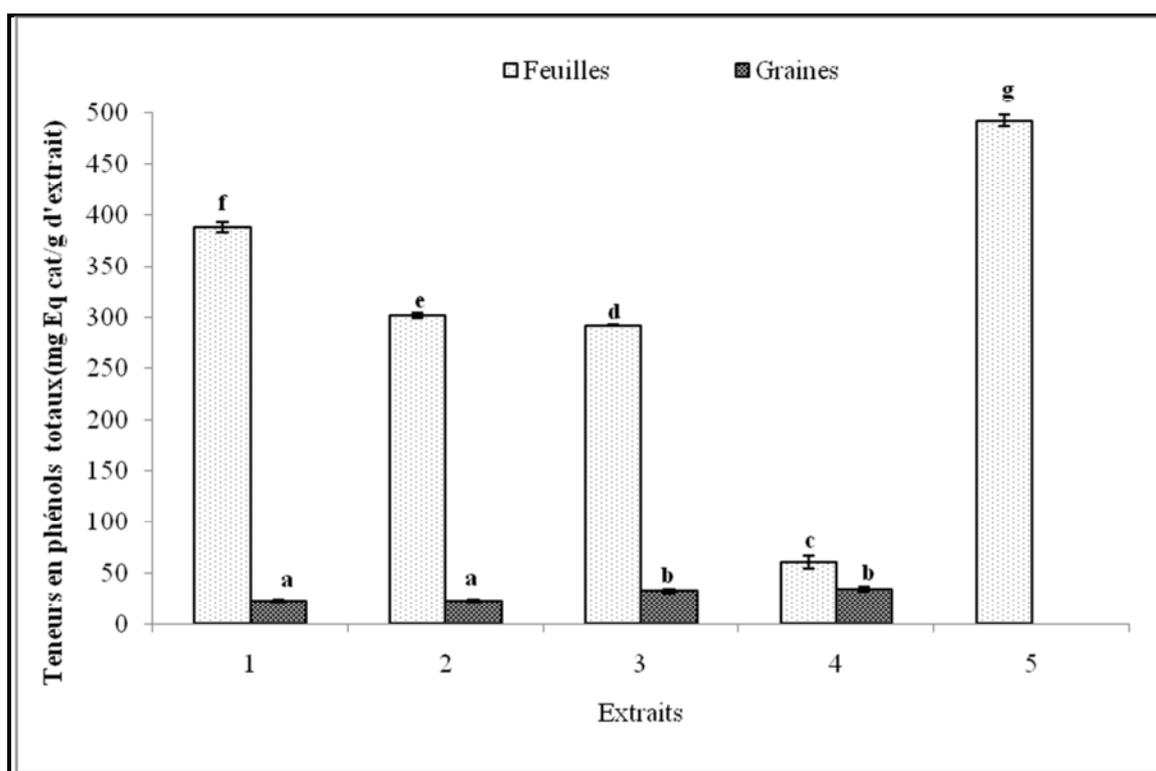


Figure N°23 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits des feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus*. **1** : Extrait éthanolique, **2** : Extrait acétate d'éthyle, **3** : Extrait aqueux acétate d'éthyle, **4** : Extrait de chloroforme, **5** : Extrait aqueux chloroforme.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Le dosage quantitatif des phénols totaux des différents extraits de *Pistacia lentiscus* a révélé que ses feuilles renferment une teneur plus notable en phénols totaux par rapport aux graines. Pour les feuilles, elle varie de $491,71 \pm 5,66$ mg Ecat/ g d'extrait aqueux de chloroforme à $60,25 \pm 6,15$ mg Ecat/ g d'extrait de chloroforme, passant par des teneurs plus au moins proches entre les extraits brut, acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle avec ($388,17 \pm 5,12$, $301,10 \pm 7,43$, $291,92 \pm 0,33$ mg Ecat/ g d'extrait, respectivement), ce qui confirme la richesse des feuilles en cette classe de composés. D'après Bruneton et al. (1999) et Macheix et al. (2005), ces composés sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires.

Quant aux extraits de graines, aucune différence significative ($P < 0,05$) n'est enregistrée au niveau des deux premiers et derniers extraits. De plus, des teneurs largement faibles ont été exhibées par ces extraits par rapport à ceux des feuilles, où l'extrait organique de chloroforme présente la meilleure teneur que par $33,83 \pm 2,54$ mg Ecat/ g d'extrait, suivi par l'aqueux acétate d'éthyle.

Ces faibles teneurs peuvent être expliquées, par un phénomène d'encombrement stérique entre ces composés qui empêchent le contact entre le solvant et certains composés qui se trouvent liés ou par la nature apolaire de ces composés.

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les résultats de dosage des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* sont illustrés dans la figure (N°24) qui sont exprimés en mg EqR /g d'extrait.

À la lumière de ces résultats, on déduit qu'il existe la même tendance de variation de la teneur en flavonoïdes pour les extraits des deux parties étudiées de la plante comme celle observée dans les résultats des dosages des phénols totaux. En effet, les feuilles de *P. lentiscu* L. présentent des teneurs en flavonoïdes nettement plus élevées ($P < 0,05$) comparativement aux graines, cette différence significative ($p < 0,05$) est notée également même au sein des différents extraits de feuilles, néanmoins aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est notée entre les extraits de graines.

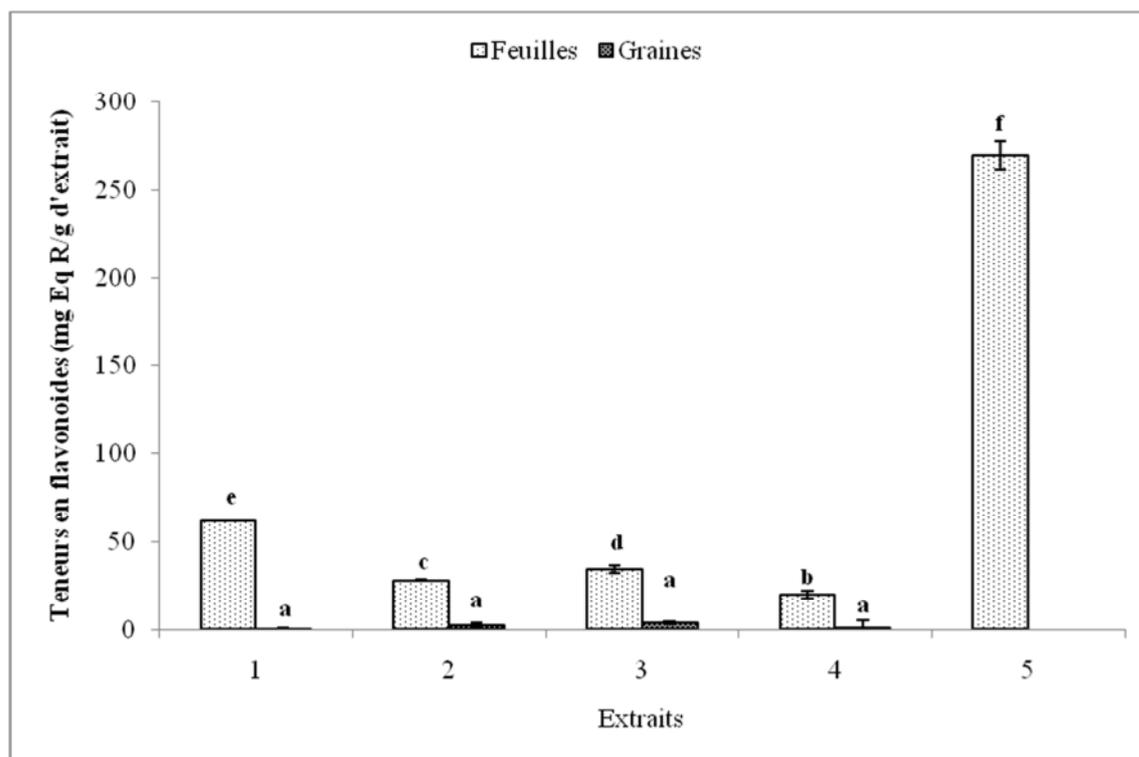


Figure N° 24 : Teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*. 1 : Extrait ethanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : extrait aqueux chloroforme.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3)+l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Comme le montre la figure (N°24), les flavonoïdes des extraits des feuilles de *P. lentiscus* sont concentrés principalement au niveau de la phase aqueuse du chloroforme avec $270,10 \pm 8,00$ mg eq rutine/g d'extract. Ceci est peut être dû à la présence d'une fraction osidique qui rend ces flavonoïdes très solubles dans l'eau (Havsteen, 2002). Cela s'accorde bien avec plusieurs travaux réalisés sur cette plante affirmant sa richesse en flavonoïdes dont les flavones (Lutéoline) (Djeridane et al., 2007; López-Lázaro, 2010), (le tricine et chysoérol), les flavonols (le myricitine, la quercétine et le kaempférol), des hétérosides (l'orientine, l'isoorientine, la vitexine et la rutine) et des anthocyanins (delphinidin 3-O-glycoside et cyaniding 3-O-glucoside) (Benhammou et al., 2008; Hamlat et Hassani, 2008).

En revanches des faibles teneurs sont observées dans les autres extraits en effet, l'extrait brut note une teneur de $61,75 \pm 0,08$ mg eq R/g d'extract, suivi par celles des extraits aqueux acétate d'éthyle ($34,31 \pm 2,48$ mg eq R/g d'extract), acétate d'éthyle ($27,77 \pm 0,38$ mg eq R/g d'extract), et de l'extrait de chloroforme ($19,65 \pm 2,03$ mg eq R/g d'extract). Ceci indique la richesse des feuilles de *Pistacia lentiscus* en flavonoïdes de différentes polarités.

Pour les graines, des teneurs très faibles voire même presque nulles ont été notées au niveau de tous les extraits allant de 0,07 à 3,56 (mg Eq R/g d'extraits) pour l'extrait brut et l'aqueux d'acétate d'éthyle, respectivement. Cela peut être expliqué par la richesse et la variété des flavonoïdes qui ne sont pas chélatés par $AlCl_3$, par conséquent, ils ne sont pas détectés par spectrophotomètre comme les isoflavones et flavonones (Wang et al., 2008). Ces résultats sont appuyés par une étude réalisée par Topcu et al. (2007) sur les fruits de *Pistacia terebinthus* dont des teneurs faibles en flavonoïdes ont été rapportées pour les extraits brut méthanolique et acétone avec $5,49 \pm 0,78$ et $22,60 \pm 0,96$ μg EQ/mg, respectivement.

D'après les résultats du dosage des phénols totaux et flavonoïdes, on déduit que le contenu élevé des phénols n'a pas été toujours accompagné par des teneurs élevées en flavonoïdes. Cela a été observé par Lizcano et al. (2010), qui ont étudié 19 plantes d'Amazonie dont deux de la famille Anacardiaceae notamment les feuilles, les tiges de *Anacardium excelsum* et les fruits de *Anacardium occidentale*, mais aussi par Moyo et al. (2010), dans leurs études sur les extraits méthanoliques de *Sclerocarya birrea* et *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae). Cela peut être interprété par le non spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu pour les composés phénoliques (Boizot et Charpentier, 2006; Wong et al., 2006; Gardeli et al., 2008; Ba et al., 2010).

III-2-3- Dosage des tannins

A la lumière des résultats illustrés dans la figure (N°25), nous constatons que contrairement aux résultats obtenus de dosage des phénols totaux et des flavonoïdes qui ont montré que ces deux classes de composés phénoliques se concentrent plus dans les phases aqueuses, les tannins se condensent essentiellement dans les extraits organiques, ce qui présume la richesse de cette plante en tannins condensés. Selon Hagerman and Butler (1978), la BSA est significativement précipitée par les tannins condensés, à un pH 3,0–5,0 et les tannins capables de précipiter cette protéine à un pH neutre, peuvent être de type différent, probablement des gallo- ou ellagitannins (tannins hydrolysables) (Adamczyk et al., 2008; Barrajon-Catalán et al., 2010).

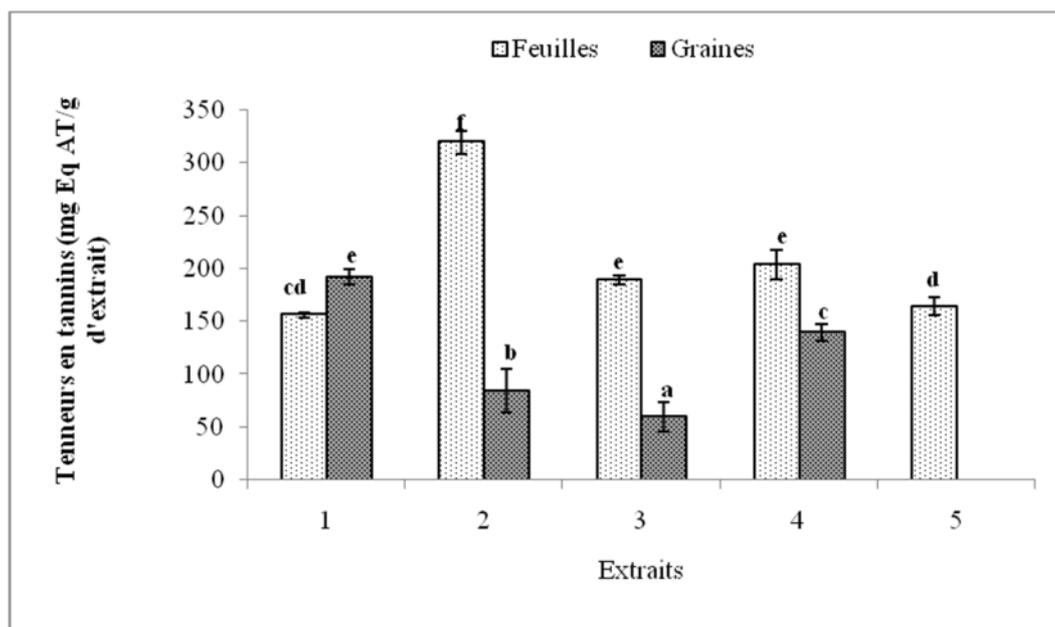


Figure N°25: Teneurs en tannins des différents extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*. 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux Acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux de chloroforme.

La fluctuation des teneurs en tannins dans les différents extraits, peut être expliquée par l'insolubilité des tannins dans la phase aqueuse, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire (Reed et *al.*, 1995 ; Cheynier, 2005). En effet, Tian et *al.* (2009), en utilisant 5 solvants de polarité différentes, n'ont rapporté que 91.5% du totale des tannins de *Galla chinensis*, une plante avec les mêmes caractéristiques chimique que *Pistacia lentiscus*, solubles dans les solvants de faible polarité ou apolaires (éther et acétate d'éthyle) et que seul (8.5%) des tannins sont solubles dans les solvants à forte polarité (éthanol et eau).

En analysant les résultats obtenus, il en ressort d'une part, seul l'extrait organique d'acétate d'éthyle affiche un taux très important estimé à $319,42 \pm 10,74$ mg Eq AT/g d'extrait, suivi par l'extrait chloroforme qui dépasse 200 mg Eq AT/g d'extrait, et qui avoisine les extraits aqueux acétate d'éthyle et l'aqueux de chloroforme. Tandis que l'extrait éthanolique enregistre la teneur la plus faible avec $156,03 \pm 2,14$ mg Eq AT/g d'extrait.

Par ailleurs, l'extrait du chloroforme vient en deuxième position avec $139,37 \pm 7,68$ mg Eq AT/g d'extrait qui dépasse largement les autres extraits à savoir l'acétate d'éthyle et l'aqueux acétate d'éthyle ($84,20 \pm 20,79$ et $59,38 \pm 13,94$ mg Eq AT/g d'extrait respectivement). Ces résultats obtenus, que ce soit pour les extraits des feuilles ou graines, affirment la richesse de cette espèce en tannins et sont en accord avec les résultats rapportés par plusieurs études (Wei et *al.*, 2002; Ammar et *al.*, 2005; Atmani et *al.*, 2009; Tian et *al.*, 2009; Landou et *al.*, 2010).

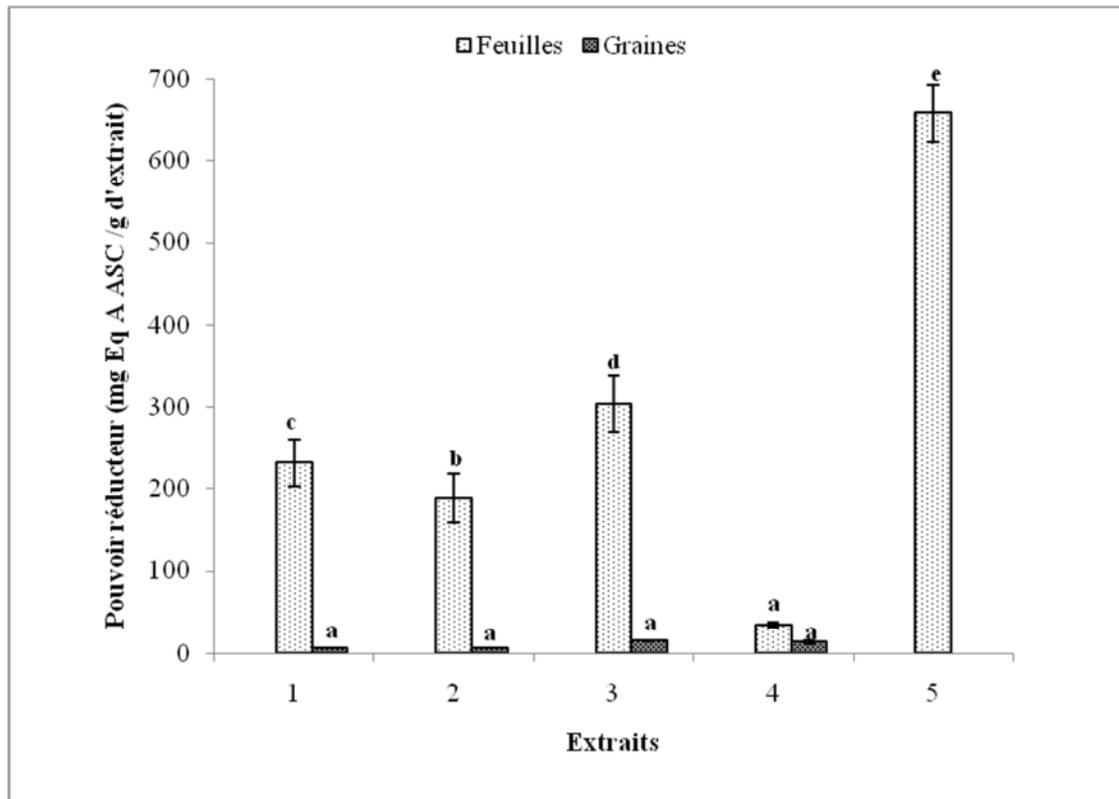
Il est à noter que des valeurs plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes de la quasi-totalité des extraits des feuilles mais aussi des teneurs plus faibles en tannins sont enregistrées par rapport à celles rapportées par Atmani et *al.* (2009). Vu que la plupart des paramètres d'investigation (matériel végétal et protocole d'extraction) sont semblables entre ces études, la seule explication dans ce cas est peut être attribuée qu'aux changements de saisons, en effet, la teneur en composés phénoliques n'est pas stable dans le temps, certaines études ont montré que la composition phénolique des végétaux peut être différente au cours des mois, voire même d'une journée (Wchitl et Anton, 2003; Gardeli et *al.*, 2008; Barrajon-Catalán et *al.*, 2010). D'autre part, Trabelsi et *al.* (2010), ont démontré la variation en teneurs des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tannins) en fonction de la polarité des solvants utilisés. Affirmant ainsi l'influence de la nature du solvant dans l'extraction des métabolites secondaires.

En conclusion, il apparaît que la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tannins n'est pas homogène, elle varie d'une partie à une autre (Robards et *al.*, 1999). En effet, les feuilles sont les plus riches en composés phénoliques comparativement aux graines, cela peut être confirmé par le fait que ces métabolites secondaires sont issus de la photosynthèse qui concerne essentiellement les feuilles de plante mais aussi par la différence dans les périodes de récolte (Macheix et *al.*, 2005; Gardeli et *al.*, 2008).

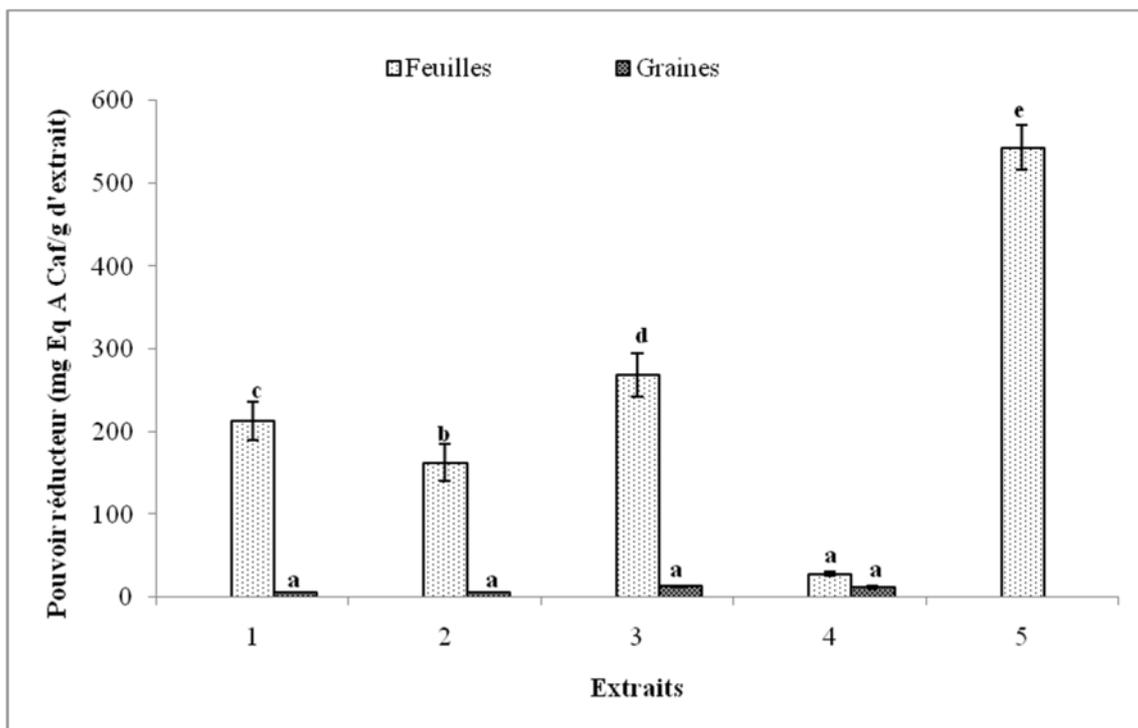
III.3. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*

III.3.1. Mesure du pouvoir antioxydant par la réduction du fer ferrique (test FRAP)

D'après les figures suivantes (N°26 et 27), nous constatons que tous les extraits de feuilles présentent une bonne activité réductrice, à l'exception de l'extrait du chloroforme et les extraits de graines en équivalent d'acide ascorbique ou d'acide caféique. ($P < 0,05$).



FigureN°26 : Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* en équivalent d'acide ascorbique. 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux Acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux du chloroforme.



FigureN°27 : Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* en équivalent d'acide caféique. 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux Acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux du chloroforme.

Pour les feuilles, les taux les plus élevés sont localisés au niveau des phases aqueuses du chloroforme et d'éthyle acétate avec $657,86 \pm 35,25$ mg Eq A Asc/g ou $543,01 \pm 27,28$ mg Eq Acaf/g d'extrait et $303,81 \pm 33,83$ mg Eq Asc /g ou $269,03 \pm 26,18$ mg EqAcaf/g d'extrait, respectivement. Alors que, l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait éthanolique montrent des taux de réduction moyennes ($231,47 \pm 29,28$ mg Eq A Asc ou $213,04 \pm 22,66$ mg Eq Acaf/ g d'extrait) et ($188,43 \pm 28,89$ mg Eq A Asc /g ou $162,78 \pm 22,36$ mg Eq Acaf/ g d'extrait), respectivement. Toutefois, l'extrait qui marque le taux le plus faible est celui du chloroforme ($33,78 \pm 3,16$ mg EqASC/g ou $28,25 \pm 2,44$ mg EqAcaf/g d'extrait).

Par ailleurs, de faibles activités réductrices du Fe^{3+} , sont remarquées au niveau des extraits de fruits, où tous les extraits marquent des activités similaires ($P < 0,05$) à celle de l'aqueux acétate d'éthyle. Ce dernier présente la même tendance d'augmentation en équivalent en acide ascorbique et en acide caféique avec $15,64 \pm$ mg Eq ASC ou $13,52 \pm$ mg Eq Acaf/ g d'extrait. Le pouvoir réducteur observé se classe ainsi dans l'ordre décroissant suivant : l'aqueux acétate d'éthyle > chloroforme > éthanolique > Acétate d'éthyle.

Pistacia lentiscus est connue pour sa richesse en gallotannin, ce dernier ayant un grand nombre de groupements hydroxyles incluant le groupe o-dihydroxyle qui lui confère une forte activité réductrice des ions ferriques en ions ferreux (Mansouri et al., 2005 ; Tian et al., 2009). Effectivement, plusieurs auteurs affirment le grand potentiel réducteur de cette plante en utilisant une méthode autre que celle appliquée dans la présente étude (Benhamou et al., 2008 ; Atmani et al., 2009). Cette constatation est maintenue en comparant nos résultats avec ceux des travaux effectués sur d'autres plantes utilisant la méthode FRAP, où Zhang et al. (2010) et Lesjak et al. (2011) rapportent des faibles activités réductrices exprimées en mg équivalent d'acide ascorbique/g d'extrait brut de *Ziziphus jujuba* et *Juniperus sibirica*, respectivement. De même, Roy et ses collaborateurs (2011) signalent des activités insignifiantes pour les extraits aqueux et méthanolique d'écorce de *Dalbergia sissoo* Roxb en équivalent d'acide ascorbique/acide caféique.

A partir des résultats obtenus, nous constatons que c'est les phases aqueuses des extraits qui ont exhibé le pouvoir réducteur le plus élevé, cela peut être expliqué non seulement par la présence des composés phénoliques hydrophiles, riches en groupements OH, mais aussi par la capacité de ces derniers à céder des électrons.

En effet, il a été démontré que la capacité réductrice est proportionnelle au nombre des groupements OH (Chvatalova et al., 2008 ; Loo et al., 2008), l'étude menée par Gardeli et al. (2008) sur *Pistacia lentiscus* a montré entre autre que la capacité réductrice augmente quand deux groupements hydroxyles sont orientés en positions *ortho* ou *Para*.

III.3.2. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Pistacia lentiscus*

Parmi les mécanismes d'actions des composés phénoliques des plantes médicinales les plus étudiés *in vitro*, est celui de l'activité scavenging des radicaux libres. Les tests se basent sur l'évaluation de la capacité de ces anti-oxydants à céder hydrogène/electrons (Soobrattee et al., 2005, Razali et al., 2008; Tomaino et al., 2010).

III.3.2.1. Le test de décoloration du radical cationique ABTS^{•+}

III II.3.2.1.1. Activité anti-radicalaire contre le radical ABTS^{•+} à 100 µg/ml

L'activité antiradicalaire des extraits de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence a été évaluée par la méthode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*). Cette méthode a donné le nom à un indice de pouvoir antioxydant, le TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity).

Il s'agit de la concentration exprimée en millimole d'une solution de Trolox ayant la même activité antioxydant qu'une solution millimolaire de la substance testée. En conséquence, la valeur du TEAC est proportionnelle à l'activité antioxydant (Djeridane et al., 2006; Zielinka et Zielinski, 2011).

Le suivi de la cinétique de l'activité antiradicalaire, pendant 6 minutes, a permis de tracer les courbes figurant la variation des absorbances de chaque extrait et molécule de référence testées en présence du radical cationique. La diminution de l'absorbance indique une bonne activité anti-radicalaire, les tracés (figure N°28) montrent clairement que tous les extraits présentent des activités anti-ABTS^{•+} très importantes.

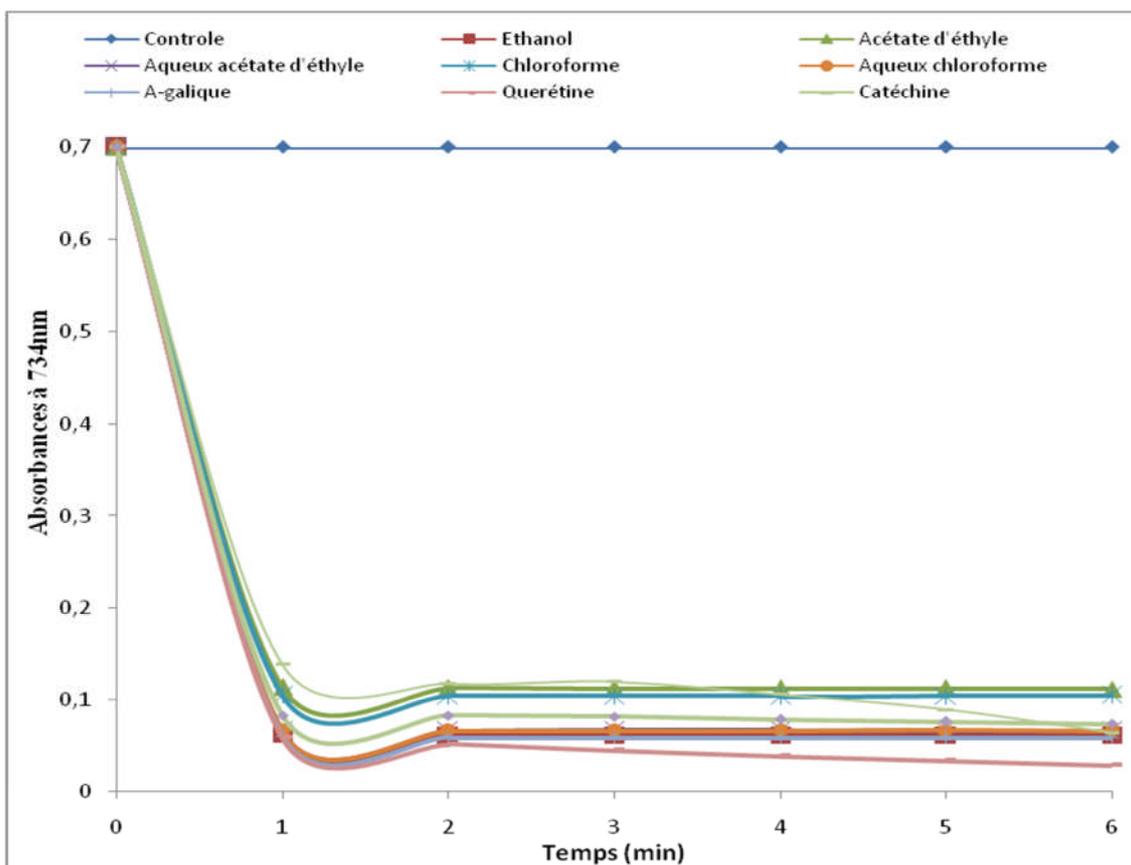


Figure N°28 : Effet scavenger contre le radical ABTS^{•+} des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps.

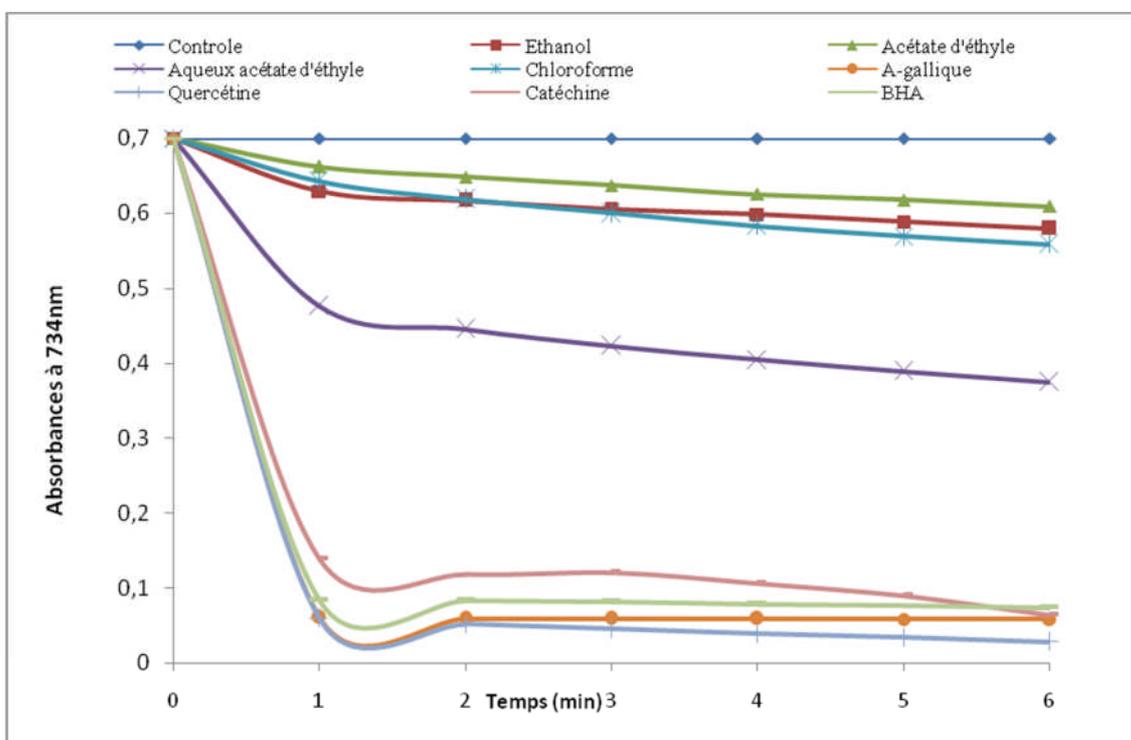


Figure N°29 : Effet scavenger contre le radical ABTS^{•+} des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps.

Comme le montrent les figures (N° 28 et 29), à l'exception de la quercétine, la catéchine et les extraits de graines, tous les autres extraits et molécules de référence montrent une stabilité de l'absorbance du radical après la première minute de la réaction. Ces absorbances (<0,7nm) enregistrées montrent la sensibilité du radical cationique aux différents extraits testés mais aussi la grande capacité des extraits à piéger ce radical.

Dans ce modèle de réaction, les composés les plus actifs des extraits testés réagissent immédiatement avec le radical pendant la première minute de la réaction, qui correspond à la phase de chute des absorbances appelée l'activité scavenging « fast », où le taux d'inhibition est maximal. Alors que les polyphénols les moins actifs réagissent avec le radical pendant la deuxième phase dite lente qui est caractérisée par la stabilisation des absorbances jusqu' à la 6^{ème} minute, ce point qui définit la totalité de l'activité scavenging exprimée en pourcentage (figure N° 30), et en terme de TEAC (Tableau N°VI) (Villaño et al., 2004; Djeridane et al., 2006; Samarth et al., 2008; Bhourri et al., 2010).

Les mêmes constatations ont été signalées par plusieurs auteurs concernant l'aspect cinétique de la réaction de piégeage du radical cationique ABTS^{•+}, qui est un marqueur de l'efficacité des antioxydants. Une étude réalisée par Ré et al. (1999) a montré que l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} par quelques composés phénoliques, dont les flavonoïdes, se stabilise à partir de la 1^{ère} minute de la réaction, alors que d'autres (cyanidines, acide coumarique) ne se stabilisent qu'après la 4^{ème} minute à l'exception de la lutéoline et la naringénine qui réagissaient même après la 6^{ème} minutes. De même Nakagawa et al. (2005) ont noté la stabilité de l'absorbance de la catéchine et ses dérivés après la 4^{ème} minute.

D'autre part, les résultats obtenus par Arumugam et ses collaborateurs (2006) ont montré encore une fois que la différence entre les activités anti- ABTS^{•+} pendant la première et la cinquième minutes sont vraiment négligeables. Par ailleurs, une autre étude menée par Miliauskas et al. (2004), a révélé que l'activité des extraits méthanoliques de quelques plantes médicinales testés se stabilise entre 0,25-0,5 minute, ce qui est confirmé par Gülçin et ses collaborateurs (2010), en expliquant ainsi la sensibilité de ce dernier vis-à-vis des substances utilisées.

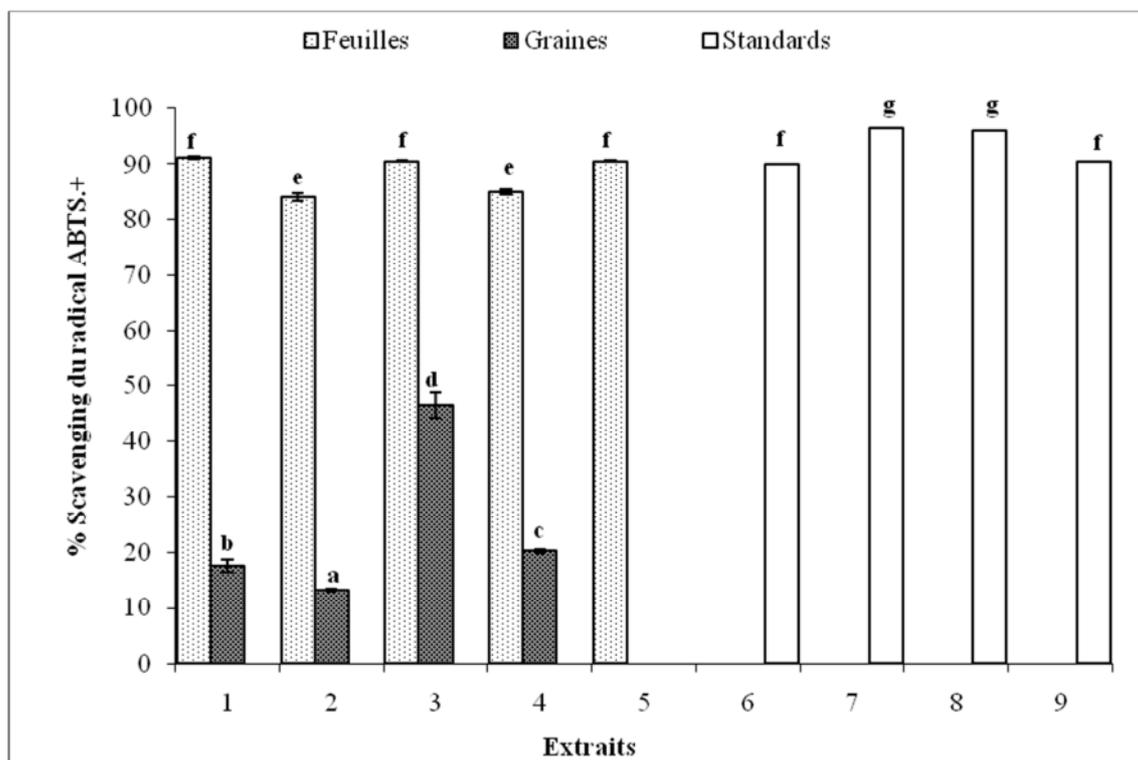


Figure N°30 : Effet scavenger contre l'ABTS^{•+} des extraits de feuilles et graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : Extrait du chloroforme, 5 : Extrait aqueux chloroforme. 6 : Acide gallique, 7 : Quercétine, 8 : Catéchine, 9 : BHA.

Les résultats de l'activité scavenging contre le radical ABTS^{•+}, exprimés en pourcentage d'inhibition et en TEAC, sont illustrés dans la figure (N°30) et tableau (N°VI). Après analyse de ces résultats, il ressort que le meilleur effet scavenger anti- ABTS^{•+} est enregistré par les standards flavonoïques testés notamment la quercétine et la catéchine qui présentent une différence significative par rapport aux extraits de *P. lentiscus* avec des valeurs de 96,50% et 95,93% respectivement. La divergence des résultats entre les antioxydants utilisés pourrait être attribuée à plusieurs facteurs. En effet, dans la littérature, beaucoup d'auteurs ont mené des recherches afin d'expliquer le mécanisme de la réduction de l'ABTS^{•+} par les composés phénoliques (Cai et al., 2006 ; Heo et al., 2007 ; Zielinska et Zielinski, 2011) dont la quercétine et la catéchine (Nakagawa et al., 2005 ; Osman et al., 2006). Ces derniers ont pu prouver que l'oxydation de la catéchine par le radical cationique ABTS^{•+} se produit au niveau du cycle aromatique A. Cela est dû au fait que la partie de phloroglucinol de ce cycle pourrait facilement former des liens d'hydrogène avec les radicaux (figure N°31).

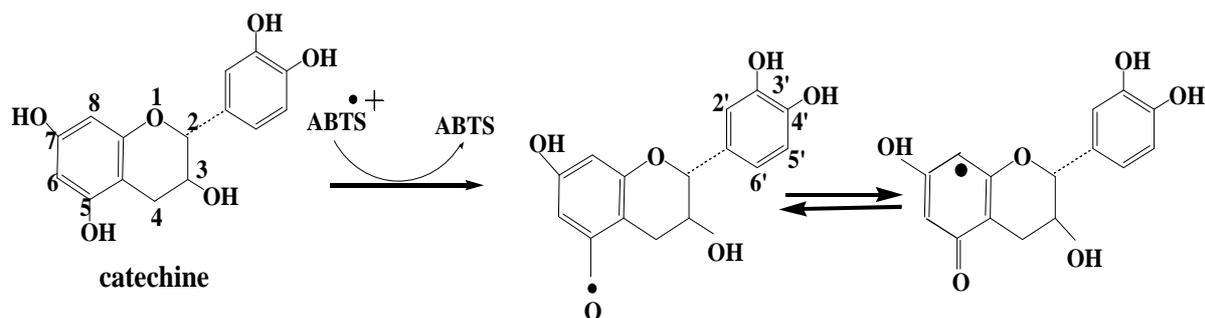


Figure N°31: Réaction du cation $ABTS^{\bullet+}$ avec un antioxydant (Catéchine) (Osman *et al.*, 2006).

En outre, Il est connu que les phénols peuvent être oxydés par les radicaux libres en radicaux phénoxyles, Rice-Evans *et al.* (1996) et Duenas *et al.* (2010), ont démontré, que la quercétine est un puissant réducteur et que malgré la similitude structurale entre la catéchine et la quercétine, les différences des acidités de leurs groupements hydroxyles et la capacité de stabiliser le radical phénoxyle, fait de la quercétine un puissant antioxydant par rapport à la catéchine, vu sa grande capacité pour la délocalisation d'électron et la stabilisation des radicaux phénoxyles, ceci est dû à sa structure chimique notamment la conjugaison entre le cycle A et B assurée par le group 4-oxo, les groupements hydroxyles C3 et l'insaturation 2,3 dans le cycle C, qui n'existe pas dans la structure de la catéchine, induisant de ce fait à des produits d'oxydation plus stables que dans le cas de la catéchine (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Duenas *et al.*, 2010),

Pour ce qui est des feuilles de *Pistacia lentiscus*, encore une fois, les résultats révèlent que l'extrait ethanologique possède une forte activité anti-radicalaire qui est de 91,16 % , notant une valeur de TEAC (194,35 mmolTrolox/g d'extrait), un très bon effet qui peut être expliqué par la présence d'un effet synergique entre tous les composés dans cet extrait brut. Cette activité est similaire à celle des extraits aqueux de chloroforme et aqueux d'acétate d'éthyle avec des valeurs de 90,55% ou 244,16 mmol trolox/g d'extrait et 90,50 % ou 181,74 mmolTrolox/g d'extrait, respectivement, semblables à celles de l'acide gallique et l'antioxydant synthétique BHA ($P < 0,05$). Une valeur de TEAC de 0,2 mmolTrolox/g d'extrait a été rapportée par Djeridane *et al.* (2007), pour l'extrait brut des feuilles de *Pistacia lentiscus*, un effet hautement inférieur à celui obtenu dans notre étude. De même, nombreuses sont les études ayant rapporté de faibles résultats comparativement aux notre, en utilisant le même protocole expérimental, sur plusieurs extraits bruts, notamment, l'extrait brut des feuilles de *Pistacia terebinthus* avec seulement 85,06 mmol Trolox/g d'extraits (Kavak *et al.*, 2010), l'extrait brut des feuilles d'une plante (*Cotinus coggygria* Scop) de la même famille que *P. lentiscus* exhibe une valeur de TEAC de $7,05 \pm 0,19$ mM (Ivanova *et al.*, 2005) .

Aucune différence significative n'est affichée entre les valeurs notées par les extraits chloroforme et acétate d'éthyle contre le radical cationique ABTS^{•+}, ces activités qui sont respectivement (85,02% ou 101,77mmolTrolox/g d'extrait) et (83,96% ou 96,02 mmol Trolox/g d'extrait), restent assez fortes en les comparant à celles rapportées par plusieurs chercheurs en utilisant la même méthode que celle appliquée dans notre étude. Ben Sghaier et ses collaborateurs (2011), ont abouti à un résultat largement inférieur avec 84% à une concentration de 500µg/ml de l'extrait du chloroforme des feuilles de *Teucrium ramosissimum*. De même, l'extrait du chloroforme des feuilles de *Chromolaena odorata* appartenant à famille Asteraceae a donné, à une concentration de 100µg/ml, un effet scavenger du radical cationique ABTS^{•+} de 18,92% malgré sa richesse en phénols totaux comparé à *P.lentiscus* (Srinivasa Rao et al. 2010). Ceci confirme que l'activité dépend non seulement de la quantité en composés phénoliques mais également de leur nature chimique.

Tableau N°VI: Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l'ABTS^{•+} en (TEAC) (mmol eq trolox/g d'extrait) à 100µg/ml des extraits de feuilles et de graines de *P. lentiscus*.

Extraits	Effet anti-radicalaire contre l'ABTS ^{•+} (TEAC)(mmol Trolox/g d'extrait)	
	Feuilles	Graines
Ethanol	194,34±26,82 ^c	3,63±0,13 ^a
Acétate d'éthyle	96,02±0,66 ^b	1,93±0,59 ^a
Aqueux acétate d'éthyle	181,74±15,07 ^c	10,74±0,78 ^a
Chloroforme	101,77±7,73 ^b	3,29±0,73 ^a
Aqueux chloroforme	244,16±79,99 ^d	nd

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.
 -Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Pour les graines nous avons constaté, une différence significative entre tous les extraits avec une activité élevée exhibée par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle avec 46,58% ou 10,74mmolTrolox/g d'extrait, résultat hautement supérieur à celui des graines de *Pistacia vera* avec 0.015± 0.001 mmol Trolox/g d'extrait (Tomaino et al., 2010). Par ailleurs, l'extrait du chloroforme enregistre une activité de 20,26% ou 3,29 mmolTrolox/g d'extrait.

Contrairement au résultat obtenu par l'extrait brut des feuilles, celui des graines exhibe une faible activité anti-ABTS^{•+} qu'avec 17,53 % ou 3,63 mmolTrolox/g d'extrait. Cette activité est largement faible par rapport à celle obtenue par l'extrait éthanolique des graines de *Sesamum indicum* Linn (Pedaliaceae) (1282µg trolox/mg d'extrait) (Visavadiya et al., 2009), cependant, il est assez satisfaisant en le comparant à celui des fruits de *Nephelium lappaceum* avec 3.07 ± 0.003 mMtrolox /mg d'extrait (Tachakittirungrod et al., 2007).

L'extrait acétate d'éthyle a donné l'activité la plus faible en enregistrant les valeurs de 13,20 % et 1,93mmolTrolox/g d'extrait. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études réalisées sur des plantes médicinales citons ; Luo et ses collaborateurs (2009) ayant obtenus un très faible effet scavenger de l'extrait acétate d'éthyle des fruits de *Phyllenthus emblica* L. avec une valeur TEAC égale à $1.56 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$.

Cette faible activité de la plus part des extraits de graines peut s'expliquer, par l'inaccessibilité des composés contenus dans ces extraits aux sites d'oxydations de ce radical à cause d'un encombrement stérique (Osmane et *al.*; 2006).

III.3.2.1. 1. Activité anti-radicalaire contre le radical ABTS^{•+} à différentes concentrations

Tous les extraits de feuilles, graines et quelques molécules de référence ont été testés à une gamme de concentrations allant de 1,562 à 100 $\mu\text{g/ml}$, dans le but d'exprimer les résultats en termes d'IC₅₀ et de confirmer si cet effet serait dû à leurs richesses en composés antioxydants ou dû à une forte concentration en ces derniers.

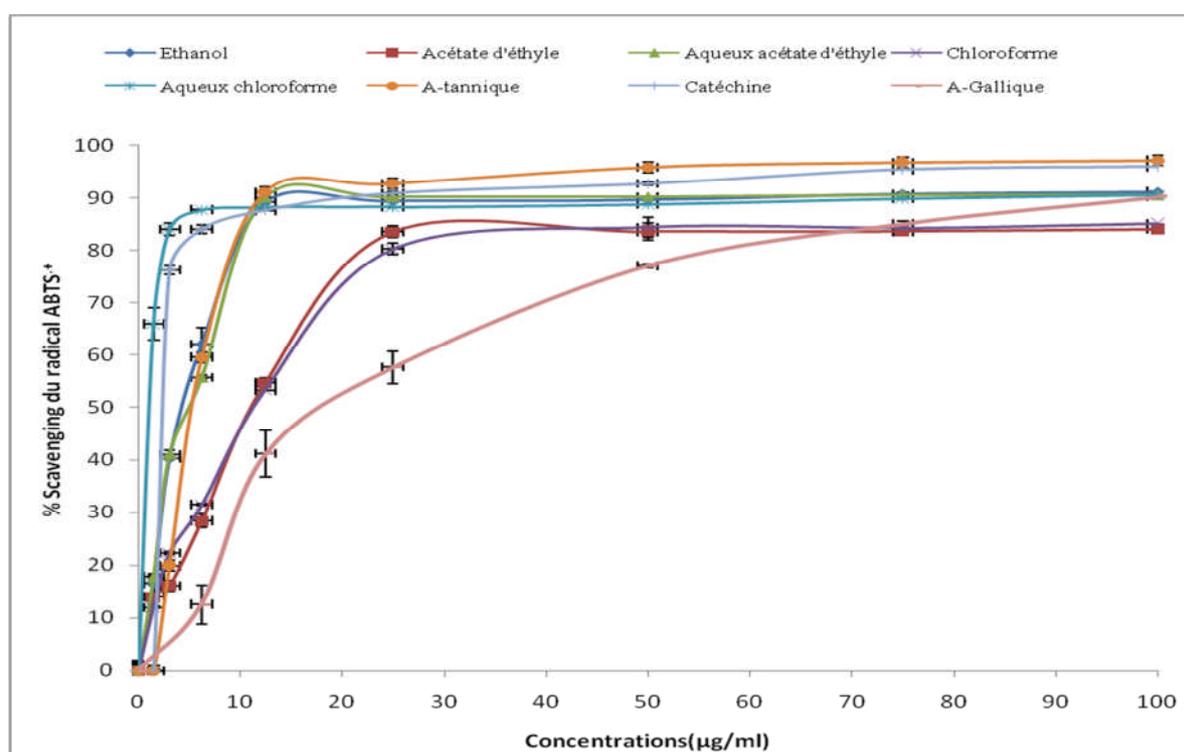


Figure N°32. Effet scavenger contre le radical ABTS^{•+} de tous les extraits de feuilles de *P. lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

D'après la figure (N°32), on remarque que toutes les courbes ont le même profil de variation, où l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} est proportionnel à la concentration d'extrait testé. Mais aussi il est à noter que ces tracés exposent deux phases le long des concentrations, l'une qui marque une évolution brutale dans l'activité scavenging de ce radical et l'autre par une stabilité de cette dernière. En effet, entre 1,562-6,25µg/ml, le taux d'inhibition du radical cationique par l'extrait aqueux de chloroforme et la catéchine atteint presque le maximum avec une valeur supérieure à 83% puis tend à se stabiliser sous forme d'un plateau jusqu'à 100µg/ml.

De même, l'activité scavenging des autres extraits notamment, l'aqueux d'acétate d'éthyle, l'extrait brut ainsi que l'acide tannique évolue de la même manière mais avec une stabilité de leurs activités (90,02% 89,15% et 91,14% respectivement) à partir d'une concentration de 12,5µg/ml.

L'acide tannique avec une activité de 95,85%, présente le taux le plus élevé de tous les extraits et standards testés à 50µg/ml, un résultat très proche de celui obtenu par Gülçin et *al.*(2010) qui ont montré une activité anti-ABTS^{•+} dose-dépendant de l'acide tannique avec un maximum de 96,9% à 45µg/ml.

Les extraits organiques montrent le même comportement avec une activité maximale de 83,54% enregistrée pour l'extrait acétate d'éthyle suivie par l'extrait chloroforme (80,27%) à une concentration de 25µg/ml, à partir de cette concentration l'activité se stabilise. Arumugam et *al.* (2006) ont signalé un effet scavenger de 95% de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Mentha spicata*, à une concentration de 20µg/ml, un taux supérieur à notre résultat, tandis que celui du chloroforme estimé à 22%, testé à la même concentration, reste largement inférieure à celui de *Pistacia lentiscus*.

Par ailleurs, seul l'acide gallique qui a montré un effet dose-activité sans aucune phase de stabilisation. Il est connu que *Pistacia lentiscus*, comme d'autres plantes de même espèce, sont riches en gallotannins. En effet, deux gallotannins à savoir le Pistafolin A et Pistafolin B ont été isolés des feuilles de *P. weinmannifolia* et ont exhibé une activité scavenging du radical cationique d'une manière dose-dépendante enregistrant ainsi des valeurs TEAC de 4.94, et 2.71, respectivement. Cette différence est due à la présence du troisième groupement galloyl dans Pistafolin A, responsable de la stabilité des radicaux phényles (Zhao et *al.*, 2005).

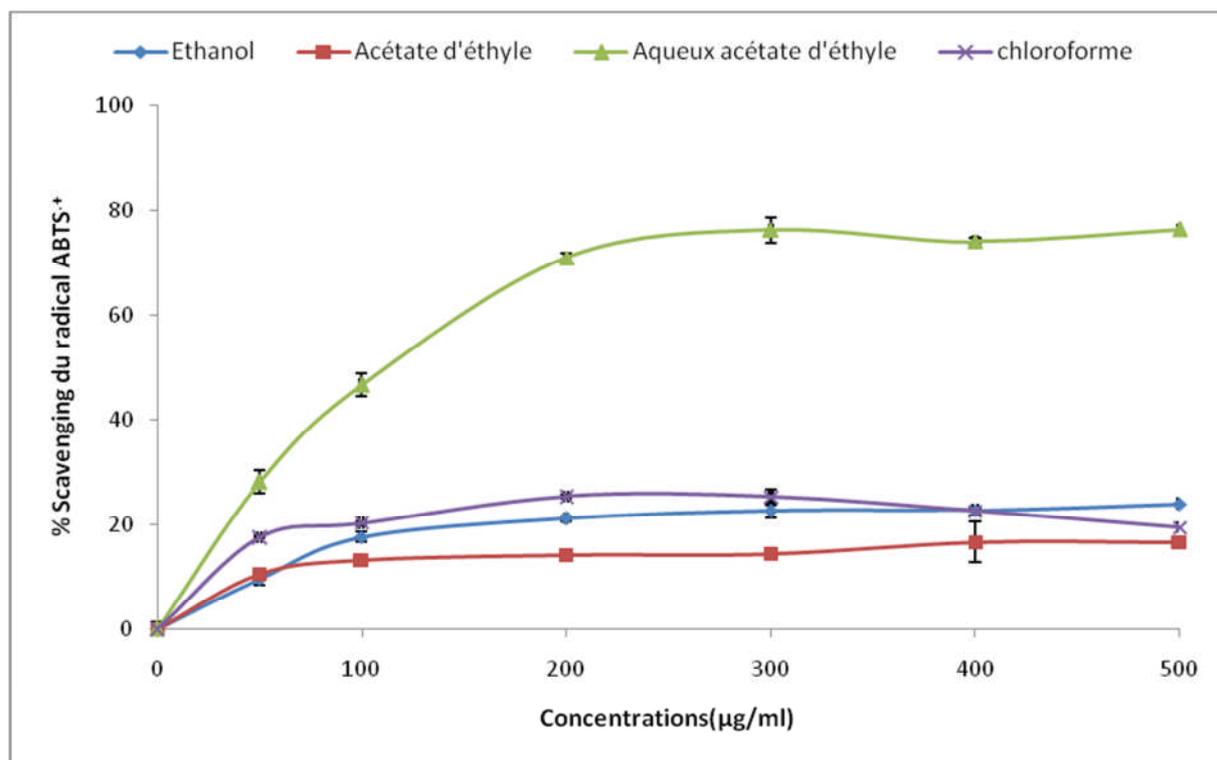


Figure N°33 : Effet scavenger contre le radical $ABTS^{*+}$ de tous les extraits de graines de *P. lentiscus* à différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus à 100µg/ml des extraits de graines, une série de concentration de 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) a été testée dans le but de confirmer si cette faible activité est due à un effet pro-oxydant ou à l'inactivité des composés contenus dans les différents extraits à scavenger le radical cationique $ABTS^{*+}$. En effet, mis à part l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui empreinte un profil d'activité dose-dépendant exhibant un taux maximal à 500µg/ml proche de 80%, tous les autres extraits ont presque enregistré le même taux que celui obtenu à 100µg/ml (figure N°33), avec de légères fluctuations à travers les concentrations jusqu'à 500µg/ml. Cette constatation n'est pas valable pour l'extrait organique de chloroforme qui avec 25,34% à 200µg/ml note une diminution de son activité jusqu'à atteindre 19,40% sous un phénomène pro-oxydant qui peut être interprété par un encombrement stérique des molécules de cet extrait (Hung et al., 2004)

Des résultats contradictoires ont été rapportés par une étude réalisée par Bhouri et son équipe (2010), sur les fruits de *P. lentiscus* en testant les mêmes concentrations, où ils ont signalé un effet scavenger dose-dépendant de l'acide digallique, à partir d'une concentration de 0.05 mg/ml, le pourcentage d'inhibition était de 35%, et atteint 99% à des concentrations de 0,15 et 0,2 mg/mL.

Cette bonne activité peut être expliquée par la richesse de ce flavonoïde en groupements hydroxyles Bhourri et al.(2010). Et la faible activité des extraits de nos graines peut être due à leurs faibles teneurs en flavonoïdes. En effet ces métabolites secondaires selon Nijveldt et al.(2001), sont connus pour leurs stabilisation des radicaux libres grâce à la haute réactivité de leur groupements hydroxyles.

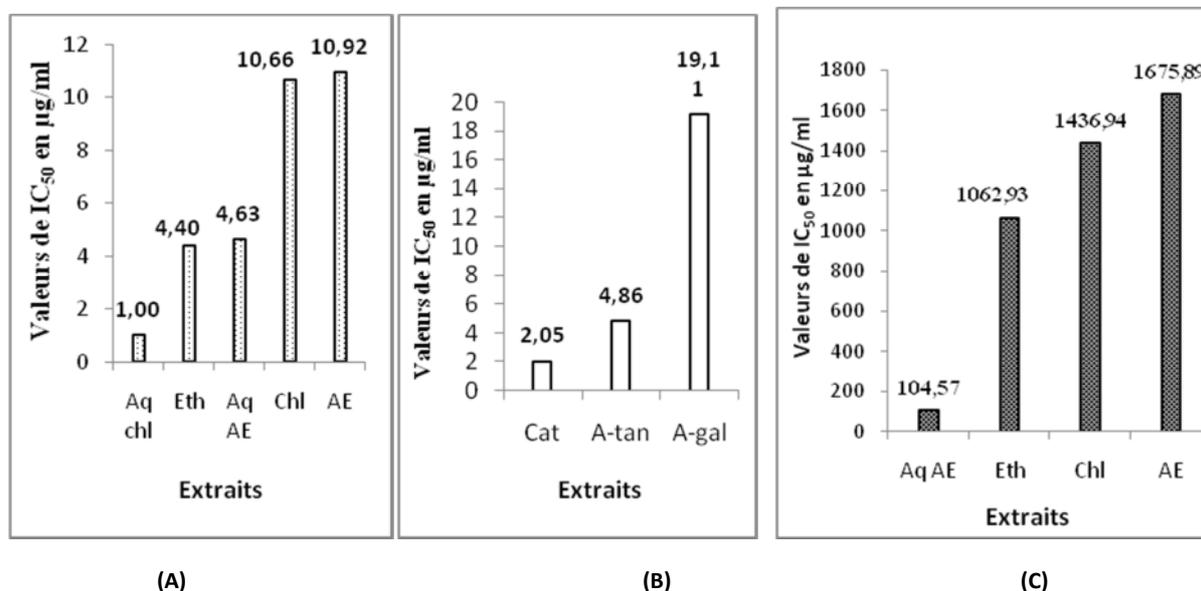


Figure N°34 : Classement croissant des extraits (A) de feuilles, (B) de certaines molécules de référence et (C) de graines, selon leurs IC₅₀. **Eth** : Extrait ethanologique, **AE**: Extrait acétate d'éthyle, **Aq AE** : Extrait aqueux acétate d'éthyle, **Chl** : Extrait de chloroforme, **Aq chl** : Extrait aqueux chloroforme, **A-gal**: Acide gallique, **A-tan** : Acide tannique, **Cat** : Catéchine.

À base des données de la littérature la valeur IC₅₀ est inversement proportionnelle à l'effet scavenger dont les valeurs faibles indiquent un potentiel anti-radicalaire important. La valeur IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%), est définie comme étant la concentration de l'échantillon exigée pour la neutralisation de 50% du radical libre (Molyneux, 2004 ; Villano et al. 2007).

D'après le classement croissant montré dans la figure (N°34), on remarque que l'ensemble des extraits de feuilles de *P. lentiscus* ont exhibé une très bonne activité anti-radicalaire manifestant ainsi de très faibles IC₅₀ inférieures à 11µg/ml, cela confirme leur comportement vis-à-vis du radical ABTS^{•+} souligné précédemment.

En effet, l'IC₅₀ de l'extrait aqueux du chloroforme est la plus faible avec 1µg/ml suivie de celle de la catéchine avec 2,05µg/ml. L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait brut ont donné des IC₅₀ similaires à celles de l'acide tannique avec 4,63 ; 4,40 et 4,86 µg/ml, respectivement. Ces valeurs sont largement inférieures non seulement à celles des extraits organiques, qui avoisinent 10µg/ml, mais aussi à celle de l'acide gallique (19,11µg/ml).

Cette grande activité localisée au niveau des extraits aqueux comparativement aux organiques peut être interprétée par la dissolution de la majeure partie des composés phénoliques des feuilles dans l'eau (Arumugam *et al.*, 2006),.

Nos résultats témoignent d'un bon pouvoir scavenger de tous les extraits, de feuilles vis-à-vis du radical cationique ABTS^{•+}, comparativement aux IC₅₀ rapportées par différents auteurs résumées dans le tableau suivant :

Tableau VII : Exemples d'études réalisées sur l'activité scavenging de radical cationique ABTS^{•+}.

Plante (famille)	Partie de plante	Extraits	Valeurs de IC ₅₀	Références
<i>Maytenus ilicifolia</i>	racine	Extrait brut (ethanolique)	0.0036± 0.0003 mg/mL	Velloso1 <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudarthria viscid</i> Fabaceae	Toute la plante	Extrait brut (ethanol)	81,00 ±3,85µg/ml	Vijayabaskaran <i>et al.</i> , 2010
<i>Amaranthus spinosus</i> (Amaranthaceae)	feuilles	Methanolic Extrait brut	147.50± 2.61) µg/mL	Kumar <i>et al.</i> , 2010
<i>Ficus microcarpa</i> L. (Moraceae)	feuilles	Methanol Extrait brut	10.2 ± 0.0 µg/mL	Ao <i>et al.</i> , 2008
<i>Chromolaena odorata</i> (Asteraceae)	feuilles	chloroforme	1,32mg/ml	Srinivasa Rao <i>et al.</i> , 2010
<i>Hermannia lavandufolia</i> L	Feuilles, tiges, fleurs	Extrait brut	22.05 ± 0.62 µg/mL	Essop <i>et al.</i> , 2008
<i>Aphanamixis polystachya</i>	Écorces	Aqueux du méthanol Extrait aqueux	6,2(µg mL ⁻¹) 6,8(µg mL ⁻¹)	Krishnaraju <i>et al.</i> , 2009
<i>Eryngium maritimum</i> <i>Crithmum maritimum</i> <i>Cakile maritima</i>	Feuilles Feuilles Feuilles	Aqueux du methanol Aqueux du méthanol Aqueux du méthanol	0.28 ± 0.020 0.11 ± 0.004 0.14 ± 0.004 (mg/ml)	Meot-Duros <i>et al.</i> , 2008

De la même façon et selon toujours la figure (N°34), nous constatons pour les graines que les concentrations requises pour la neutralisation de 50% de la concentration de ABTS^{•+} sont hautement supérieures à celles de tous les extraits de feuilles mais aussi des standards suivant l'ordre croissant (voir figureN°34) (aqueux d'acétate d'éthyle<éthanol<chloroforme<acétate d'éthyle.

Cet ordre est observé dans une étude réalisée par Sahreen et *al.* (2010) sur les fruits de *Carissa opaca*. Plusieurs auteurs ont rapporté des valeurs de IC 50 plus faibles de différents extraits de graines de plantes de mêmes ou d'autres espèces que *P. lentiscus* dont *Pistacia lentiscus* (0.075 mg/ml) (Bhourri et *al.*, 2010), *Trigonella foenum graecum* (117 µg/ml) (Kaviarasan et *al.*, 2007), *Ficus microcarpa* L. appartenant à la famille de Moraceae (9.2 ± 0.1 µg/ml) (Ao et *al.*, 2008).

De ce qui précède, il est à noter, que l'effet piègeur du radical ABTS^{•+} par les extraits de feuilles est très important comparativement à celui des graines même à de faibles concentrations, ce qui peut être dû à l'importance de la nature chimique de ses composés. La grande activité des graines ou feuilles localisées au niveau des extraits aqueux expliquerait la présence dans ces phases de la plus part des composés actifs de nature hydrosolubles riches en groupements hydroxyles qui jouent un rôle primordial dans cette activité en neutralisant ce radical par transfert d'électrons ou de protons. Cette activité qui selon Cai et *al.* (2006) peut être attribuée au degré de l'hydroxylation des noyaux aromatiques, l'arrangement des groupements hydroxyles mais aussi au nombre de groupements galloyles et ortho-hydroxyl dans le noyau benzène (Luo et *al.*, 2011).

III.3.2.2. Activité scavenging des extraits de *P.lentiscus* contre le radical anion superoxyde (O₂^{•-})

L'effet scavenger des extraits des feuilles de *Pistacia lentiscus* et des antioxydants de référence (Acide ascorbique, Acide caféique), sur l'anion superoxyde, à une concentration de 100 µg/ml, est évalué spectrophotométriquement, en suivant la diminution de la réduction du NBT en formazan, par le superoxyde généré dans le système PMS-NADH.

III.3.2.2. 1. Activité anti-radicalaire contre le radical anion superoxyde (O₂^{•-}) à 100 µg/ml

A la lumière des résultats illustrés dans la figure (N°35), on déduit que le meilleur effet scavenger est enregistré par les extraits aqueux. En effet, l'extrait aqueux acétate d'éthyle a révélé l'activité scavenging de l'anion superoxyde la plus élevée (64,86 ± 0,90%), largement supérieure à celle exhibée par les molécules de référence, à savoir l'acide caféique (50,59 ± 2,61%) et l'acide ascorbique (40,09 ± 0,87%). Suivi par l'extrait aqueux du chloroforme qui a montré une activité avoisinante celles des molécules de référence avec 44,50 ± 0,34%.

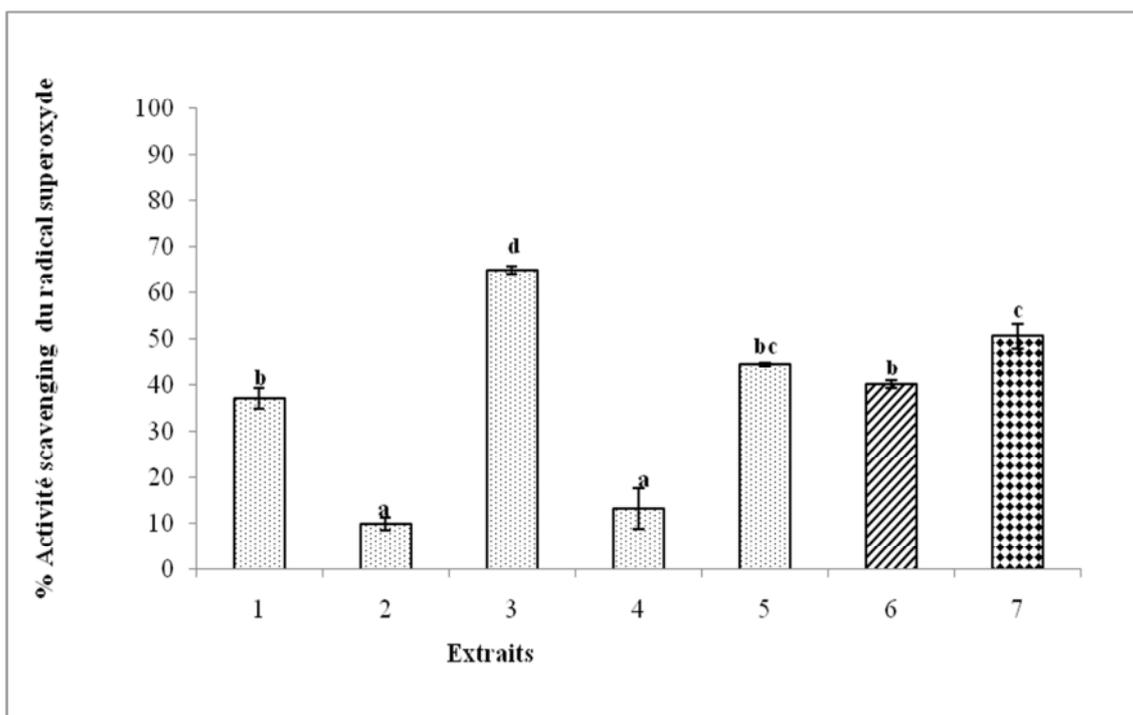


Figure N°35: Effet scavenger contre le radical anion superoxyde des différents extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et des molécules de référence à 100µg/ml. 1:extrait d'éthanol, 2 : extrait d'éthyle acétate, 3 : extrait aqueux d'éthyle acétate, 4 : extrait du chloroforme, 5 : extrait aqueux du chloroforme, 6 : Acide ascorbique, 7 : Acide caféique.

Ce cas de figure a été rapporté par Senevirathne et ses collaborateurs (2006), en testant l'activité anti-superoxyde de *Ecklonia cavaon*, où les extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux d'hexane qui ont exhibé un effet plus important que celui enregistré au niveau des extraits organiques (chloroforme, acétate d'éthyle, hexane). Cette activité peut être expliquée par la présence de composés phénoliques polaire dans ces extraits capables de neutraliser ce radical par transfert d'hydrogènes ou d'électrons (Senevirathne et *al.*, 2006).

Toutefois, aucune différence significative ($P < 0,05$) n'est enregistrée entre l'effet scavenger de l'extrait éthanolique et l'acide ascorbique ($37,09 \pm 2,13\%$). Cet effet est comparable à celui obtenu par Gouthamchandra et *al.* (2010), qui, en utilisant le même protocole expérimental, ont rapporté un taux d'inhibition de $37,68 \pm 0,64\%$ de l'extrait éthanolique des feuilles de *Clerodendrum infortunatum* (Verbenaceae). Les autres extraits notamment l'extrait du chloroforme et d'acétate d'éthyle sont marqués par un effet scavenger faibles ($13,21 \pm 4,39$ et $9,84 \pm 1,40\%$, respectivement). Un effet scavenger négligeable de l'anion superoxyde par l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *Smilax excelsa* L. est rapporté par Ozsoy et ses collaborateurs (2008). Nos résultats sont en concordance avec les travaux décrits par Srivastava et *al.* (2006), où les taux d'inhibition d'anion par les extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle des racines de *Decalepis hamiltonii* (Asclepiadiaceae) sont de 0% et $13,7 \pm 2,1\%$, respectivement, en utilisant le système PMS/NADH-NBT.

La littérature regorge de méthodes non enzymatiques qui permettent la mesure de l'activité antiradicalaire de l'anion superoxyde, les résultats obtenus, en appliquant la méthode NBT/riboflavine, par Ben Sghaier et *al.* (2011), rejoignent les nôtres, où ils ont montré un faible effet scavenger de l'extrait chloroforme avoisinant 15%, des feuilles d'une plante tunisienne caractérisée par les mêmes propriétés biologiques que *Pistacia lentiscus*, il s'agit de *Teucrium ramosissimum*.

Nombreux sont les travaux à avoir rapporté que les graines exhibent une activité antiradicalaire plus importante que celles des autres organes des végétaux dont ceux de Soong et Barlow, 2004; Maisuthisakul et *al.*, 2007; Falleh et *al.*, 2008. Cependant, l'activité scavenging de l'anion superoxyde des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*, testés à 100µg/ml, présente des résultats négatifs. Ceci est probablement dû à plusieurs facteurs, soit à la structure des composants chimiques, à l'absence des molécules ayant la capacité à piéger l'anion, soit à un effet pro-oxydant, comme il peut être dû à leur pauvreté en flavonoïdes comme rapporté par le dosage précédemment.

Une étude réalisée par Skandrani et *al.* (2009) sur les feuilles de *Moricandia arvensis* a signalé une activité négative des extraits brut, chloroforme et éther du pétrole contre l'anion superoxyde. De même, Cet effet négatif a été démontré par Chisté et *al.* (2011), sur cinq extraits dont éthanol:éthyle acétate, éthanol: eau et acétate d'éthyle des graines de *Bixa orellana* L.(Bixaceae).

Néanmoins, les résultats d'une étude réalisée par Topçu et *al.* (2007) sur les extraits acétone et méthanol des fruits of *Pistacia terebinthus* démontre une bonne activité contre l'anion superoxyde supérieure à 58 et 69%, respectivement à une concentration de 50µg/ml. De même Tomaino et *al.* (2010), ont rapporté une très bonne activité des extraits de graine et la peau des fruits de *Pistacia vera* L. (Anacardiaceae) contre ce radical (généralisé par le système PMS-NADH-NBT). Cette différence peut être attribuée à la polarité des solvants, aux conditions climatiques ou bien aux différences génétiques des espèces (Falleh et *al.*, 2008 ; Tomaino et *al.*, 2010).

Des études récentes ont montré que les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont des antioxydants importants et de bons scavengers de l'anion superoxyde. Leur efficacité scavenger dépend de la concentration du phénol, le nombre et la position des groupements hydroxyles (Yang et *al.*, 2008 ; YouGuo et *al.*, 2009; Fu et *al.*, 2010; Prasad et *al.*, 2010).

Ces résultats sont appuyés par des études antérieures réalisées sur la relation structure activité qui ont démontré que

- la partie gallate et la substitution au niveau des cycles A et C ont un faible impact sur l'activité scavenger de l'anion superoxyde ;
- la présence des motifs structuraux notamment la double liaison C2=C3, les groupements hydroxyles et la fonction 4oxo du cycle C ne sont pas indiqués nécessaires pour cette activité ;
- Alors que la substitution du groupement hydroxyle C6 du cycle A par un glucose augmente l'effet scavenger de l'anion et la glycosylation des groupements hydroxyles C8 et C3 du cycle A diminue l'activité antioxydant ;
- De même, la substitution des groupements OH dans le cycle B par des groupement méthoxyles induit une remarquable diminution dans l'activité (Taubert et *al.*, 2003 ; Milane et *al.*, 2004; Wang et *al.*, 2009; Zielinka et Zielinski, 2011).

Il semble donc, selon Taubert et *al.* (2003), que les groupements pyrogalloles et catéchols sont les sites principaux des attaques des radicaux superoxydes, formant ainsi des radicaux aroxyles, ces derniers peuvent être stabilisés par un équilibre mésomérique donnant une structure ortho-semiquinone sans la participation de l'oxygène substituants à C-3, C-4, et C-5 dans la délocalisation de charge (Taubert et *al.*, 2003)(Figure N°36)

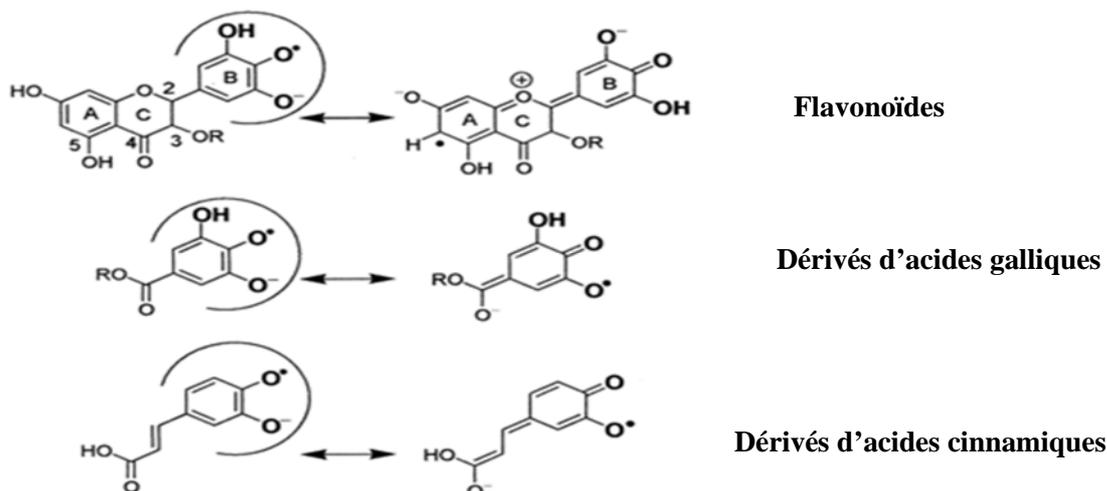


Figure N°36: Position des groupements OH des composés phénoliques intervenant dans la réaction avec l'anion superoxyde (Taubert et *al.*, 2003)

Les résultats de l'activité scavenging obtenus par les extraits de graines amènent à la question si elle est due à un effet pro-oxydant ou à la concentration des composés capables de piéger l'anion superoxyde ?

III.3.2.2.2. Activité anti-radicalaire contre l'anion superoxyde à différentes concentrations

Pour tenter de répondre à la question posée précédemment, les extraits des graines, ont été testés à une série de concentration (25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml). Les résultats obtenus démontrent encore une fois un effet scavenger négatif de tous les extraits à toutes les concentrations testées, malgré leurs teneurs notables en tannins. Ce résultat peut confirmer l'implication de flavonoïdes dans le piégeage de ce radical. Abdewahed et *a.l* (2007), ont noté que les dérivés galloyles des fruits de *Pistacia lentiscus* ont un effet pro-oxydant.

En ce qui concerne les feuilles, ce test a été refait pour les trois extraits ayant exhibé les taux d'inhibition les plus élevés, ainsi que pour l'acide caféique en fonction de la concentration. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure suivante :

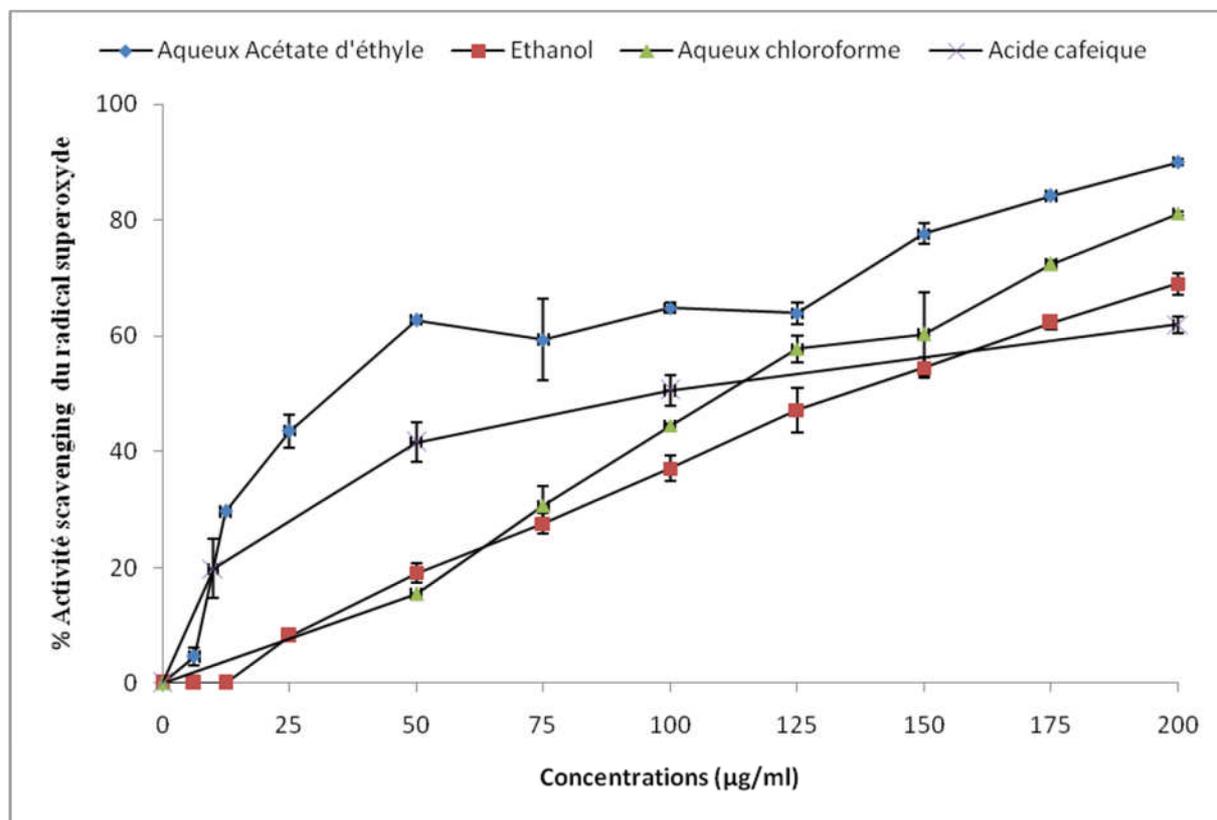


Figure N°37 . Effet scavenger contre l'anion superoxyde de quelque extrait de feuilles de *P. lentiscus* et l'acide caféique à différentes concentrations.

D'après la figure (N°37), tous les extraits de feuilles et l'acide caféique présentent le même profil de variation où le pourcentage d'activité scavenging de l'anion superoxyde est proportionnelle à la concentration. En effet, à des concentrations très faibles les extraits aqueux exhibent de bonne activité qui atteint 89,98% à une concentration de 200µg/ml pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, et 81,17% pour l'extrait aqueux du chloroforme, alors qu'elle n'est que de 62,42% pour l'acide caféique, à la même concentration. Manifestant ainsi des IC₅₀ représentées dans la figure (N°38). L'extrait aqueux acétate d'éthyle note la plus faible valeur avec 37,99µg/ml. Alors que l'extrait aqueux de chloroforme et la molécule de référence montrent des IC₅₀ presque similaire (114,84 et 116 µg/ml, respectivement).

Nos résultats témoignent un bon pouvoir scavenger de ces deux extraits aqueux, vis-à-vis de l'anion superoxyde comparativement aux résultats obtenus par Senevirathne et ses collaborateurs (2006), sur les extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme de *Ecklonia cavaon*, où les IC₅₀ obtenues sont de 367 et 1468 µg/ml, respectivement. Egalement, les résultats rapportés par plusieurs auteurs, s'avèrent plus faibles que les nôtres, tous les extraits aqueux de feuilles de *Limoniastrum monopetalum* ont exhibé des IC₅₀ supérieure à 120 mg/ml (Trabelsi et al., 2010) et ceux de *Bauhinia forficata* et *Cissus sicyoides*, ont marqué des IC₅₀ 90.0±4.4 µg/ml et 60.0±2.3µg/ml, respectivement (Khalil et al., 2008). Ces observations suggèrent que la polarité du solvant et la nature des polyphénols influent l'activité antioxydant (Trabelsi et al., 2010).

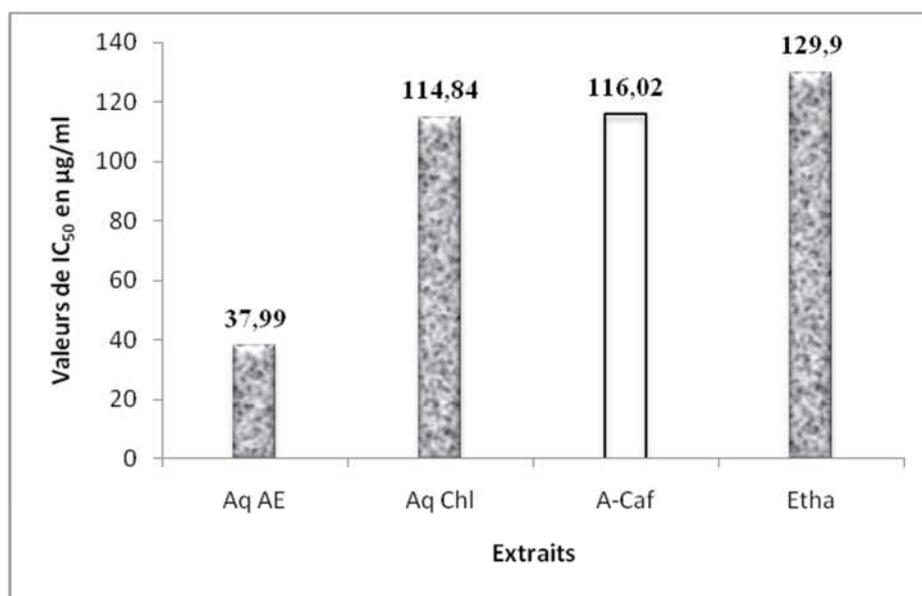


Figure N°38: Classement croissant des extraits de feuilles et l'acide caféique, selon leurs IC₅₀. **Etha** : Extrait ethanolique, **Aq EA** : Extrait aqueux acétate d'éthyle, **Aq chl** : Extrait aqueux chloroforme, **A-Caf**: Acide caféique.

Concernant l'extrait ethanologique, à des concentrations inférieures à 25µg/ml, il n'enregistre aucun effet, cela peut être expliqué par la concentration faible en composés capables de piéger ce radical. A une concentration de 200 µg/ml, cet extrait exhibe un taux de 69,04% enregistrant ainsi une IC₅₀ de 129,90 µg/ml, largement inférieure à celle rapportée par Gouthamchandra et al. (2010), de l'extrait éthanologique de feuilles de *Clerodendrum infortunatum* (IC₅₀ = 173µg/ml). Mais aussi à celle de l'extrait brut méthanolique de feuilles de *Salvia miltiorrhiza* (IC₅₀ = 1.76 mg/ml) (Zhao et al., 2006).

Une autre étude établie par Benhamou et al. (2007), sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* a montré que l'activité scavenging de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) de l'extrait ethanologique de *P. atlantica* est supérieure à celle de *P.lentiscus* avec 19,3% et 14,16% , respectivement, à une concentration de 3 mg /ml, ce qui est probablement expliqué par la concentration et la structure chimique des composés phénoliques des extraits testés particulièrement les flavonoïdes, acides galliques et ses dérivés, flavonols glycosylés (myricetin et quercetine glycosylés) et anthocyanines delphinidines3-O-glycoside et cyanidine3-O- glucoside).

La faible activité scavenging de la molécule de référence par rapport aux différents extraits testés peut être expliquée par la pureté de cette molécule mais aussi par la présence d'un effet synergique entre la gamme de composés existants dans les extraits (Shukla et al 2009). Les interactions synergiques entre les antioxydants dans le mélange font de l'activité l'antioxydant non seulement dépendante de la concentration, mais également de la structure et la nature de ces derniers (Djeridane et al.,2006; Falleh et al., 2008).

Comme conclusion des résultats obtenus dans ce test, on peut dire que la présence de l'activité scavenging dans les extraits de feuilles et son absence dans ceux des graines peut être expliquée par la localisation des composés responsables de piégeage de l'anion superoxyde seulement au niveau des feuilles.

III.3.2.3. Activité scavenging des extraits de *P.lentiscus* contre le radical monoxyde d'azote (NO)

III.3.2.3.1. Activité anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote à 100µg/ml

L'activité scavenging du radical monoxyde d'azote(NO) des différents extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml avec les standards (acide caféique, acide gallique, quercetine, catéchine et BHA), exprimée en pourcentage d'inhibition, est illustrée dans la figure suivante :

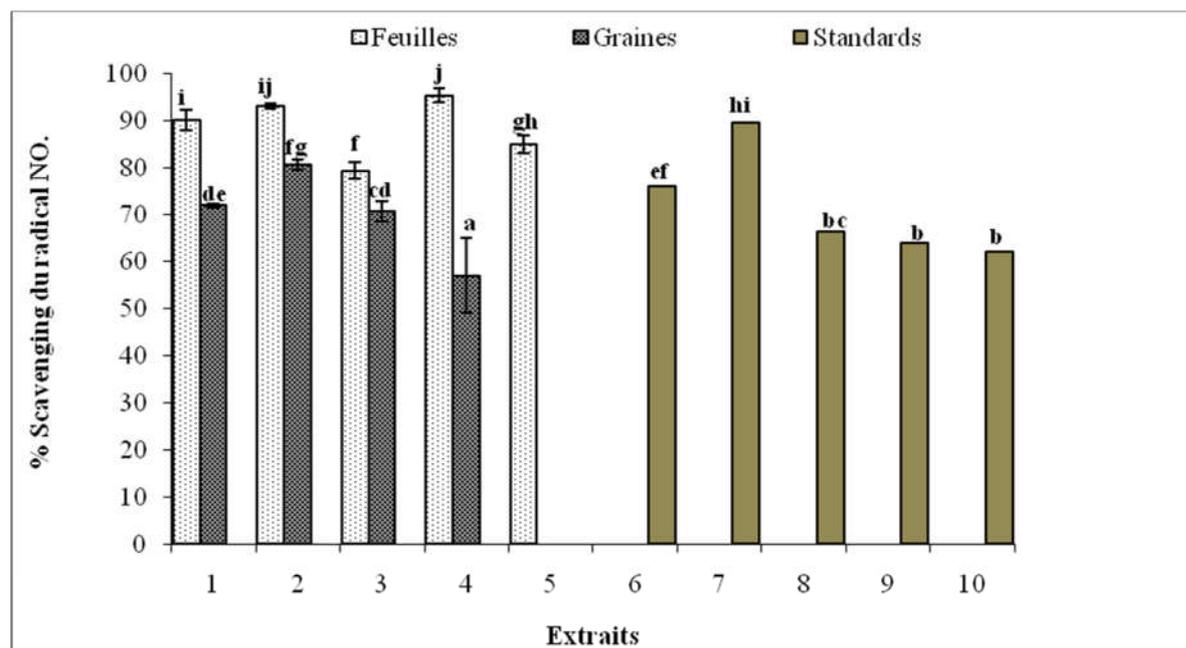


Figure N°39 : Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : Extrait de chloroforme, 5 : Extrait aqueux chloroforme. 6 : Acide caféique, 7 : Acide gallique, 8 : Quercétine, 9 : Catéchine, 10 : BHA

A première vue de cette figure, il est à noter qu'à l'exception de la catéchine et la BHA, tous autres standards et extraits testés des deux parties de la plantes ont montré de très bonne activité avec une différence significative ($P < 0,05$).

En analysant les résultats obtenus, on peut constater que tous les extraits de feuilles ont exhibé des activités largement supérieures à celles montrés par les différentes molécules de référence ($P < 0,05$). Mais aussi, contrairement aux trois tests antioxydant précédents, c'est les extraits organiques notamment le chloroforme et l'acétate d'éthyle, qui exhibent les meilleurs activités scavenging de monoxyde d'azote avec $95,32 \pm 1,41$ et $93,03 \pm 0,62\%$ respectivement, part à rapport aux extraits aqueux de chloroforme et aqueux d'acétate d'éthyle ($85,04 \pm 1,90$ et $79,37 \pm 1,77\%$, respectivement).

En comparant ces résultats à ceux obtenus par plusieurs auteurs, il s'avère que nos extraits rapportent d'excellentes activités. En effet, l'extrait du chloroforme des feuilles de *Chromolaena odorata* testé à $100\mu\text{g/ml}$ n'a enregistré que $27,03 \pm 1,15\%$ et atteint $90,28 \pm 0,52\%$ à une concentration de $5000\mu\text{g/ml}$ (Srinivasa Rao et al., 2010).

De même, l'extrait éthanolique avec $90,09 \pm 2,27 \%$ présente une très bonne activité par rapport à celle rapportée dans d'autres travaux qui se sont intéressés à l'étude de piégeage de $\cdot\text{NO}$ par des extraits de plantes de différentes familles, à titre d'exemple, l'extrait éthanolique de feuilles de *Clerodendrum infortunatum* (Verbenaceae), testé à $100\mu\text{g/ml}$, a affiché une activité de $22,73 \pm 0,55\%$ (Gouthamchandra et al. (2010). Le même taux d'inhibition a été exhibé par le extrait brut de *Nasturtium officinale* R. Br. (watercress), à la même concentration (Bahramikia et Yazdanparast, 2010). Part ailleurs, Shukla et son équipe (2009) ont enregistré à $100\mu\text{g/ml}$ un taux de $42,29\%$, des extraits éthanoliques de feuilles de *Stevia rebaudana* (Asteraceae).

Néanmoins, des résultats similaires ont été rapportés par Kang et al. (2007) sur l'activité scavenging de $\cdot\text{NO}$ par des extraits méthanoliques bruts de deux plantes de famille Araliaceae, il s'agit de *Panax quinquefolium* L. avec (89%) et *Panax ginseng* (94%).

Concernant l'analyse des résultats des graines, plusieurs sont les remarques qui découlent ; nous constatons, que contrairement aux résultats obtenus à partir des tests précédents, tous les extraits exhibent de très bonnes activités scavenging de $\cdot\text{NO}$ avec un taux de $80 \pm 1,10\%$ noté par l'extrait acétate d'éthyle suivi de $71,88 \pm 0,39\%$, $70,64 \pm 2,02\%$, et $56 \pm 96 \pm 8,04\%$ pour l'extrait brut, aqueux acétate d'éthyle et chloroforme, respectivement. Cela peut expliquer la présence des composés phénoliques en commun dans tous les extraits actifs responsables de cette activité. Des résultats assez bons ont été signalés par Shukla et al. (2009) ou l'extrait brut éthanolique des graine de *Caesalpinia bonducella* neutralise $58,29 \pm 0,03\%$ du radical monoxyde d'azote dans le milieu réactionnel à une concentration de $100\mu\text{g/ml}$. D'autres auteurs ont rapporté des valeurs inférieures à celles-ci, Kumar et Kumar, (2009) ont noté un effet scavenger du monoxyde d'azote de $76.83 \pm 2.7\%$, à une concentration de $2,5\text{mg/ml}$ de l'extrait brut méthanolique des fruits de *Vitis trifolia* (Vitaceae).

III.3.2.3.1.1. Activité anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote à différentes concentrations

La très bonne activité scavenging du $\cdot\text{NO}$ obtenue par tous les extraits des feuilles et graines à $100\mu\text{g/ml}$ nous a incité à les tester à différentes dilutions dans le but de déterminer leurs IC_{50} mais aussi de voir leurs comportements vis-à-vis de ce radical à différentes concentrations.

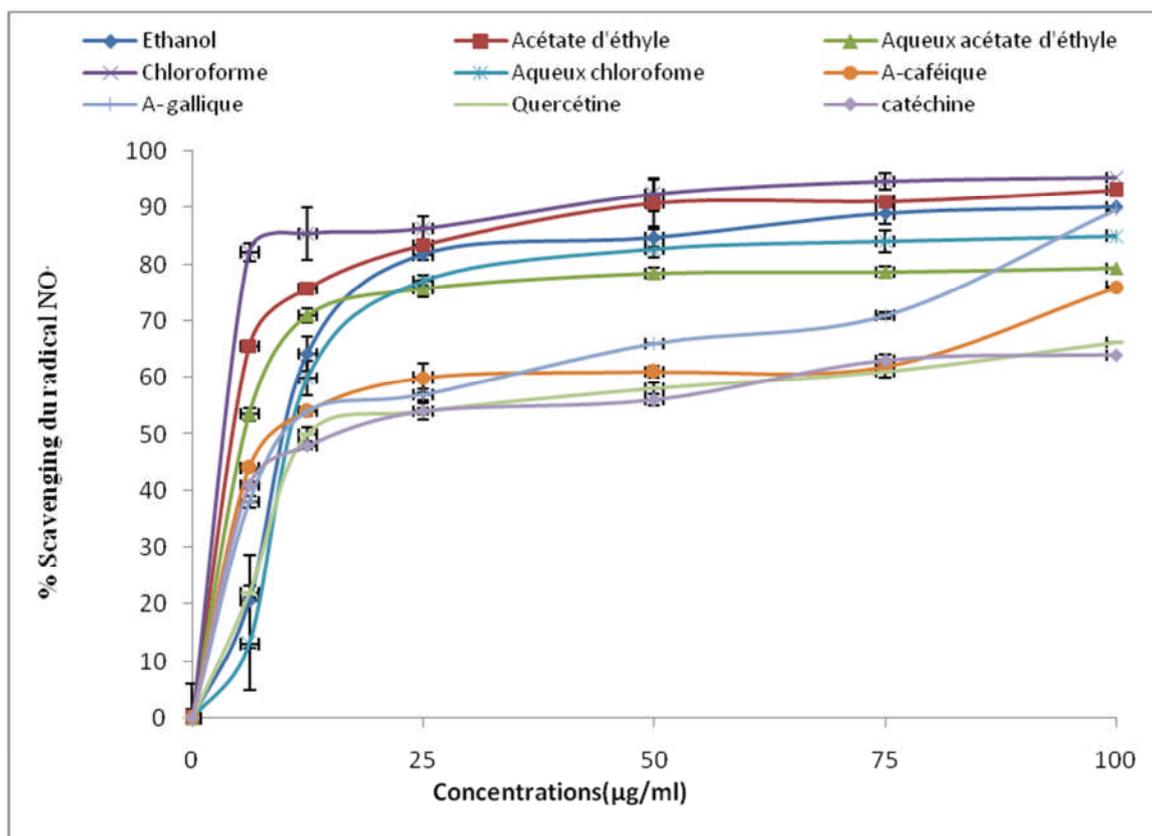


Figure N°40; Effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote de tous les extraits de feuilles de *P. lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

Dans le cas des extraits de feuilles (Figure N°40), nous constatons que l'effet scavenger de tous les extraits et molécules de référence testés est dose-dépendant. En effet, une progression linéaire de l'activité est notée à des concentrations inférieures à 25µg/ml, alors que au delà de cette dernière un plateau se forme, traduisant la stabilité de l'activité scavenging de 'NO, jusqu'à la concentration de 100µg/ml. De même, Hazra et ses collaborateurs (2008), en étudiant l'activité antioxydant d'écorce d'une plante appartenant à la même famille que *Pistacia lentiscus* nommée *Spondias pinnata*, ont rapporté une activité dose-dépendante de l'extrait brut, avec un taux de neutralisation du radical 'NO estimé à 61.2% à une concentration de 70 µg/ml.

La même constatation a été signalée par Razali et ses collaborateurs (2008), concernant l'activité scavenging de ce radical de deux extraits de *Anacardium occidentale* (anacardiaceae), notamment l'extrait brut méthanolique et l'extrait acétate d'éthyle qui n'ont enregistré que 50% et 24% à une concentration de 500µg/ml.

À partir de ces courbes représentées dans la figure (N°40) nous avons déterminé les IC₅₀ dont les plus faibles est celles des extraits du chloroforme et acétate d'éthyle avec des valeurs de 2,710 et 4,40 µg/ml, suivies de celles de l'aqueux acétate d'éthyle, extrait brut, puis aqueux du chloroforme. Comme le montre la figure (N°42a) toutes les IC₅₀ des extraits sont largement inférieures à celles des standards qui exhibent des valeurs supérieures à 11,5 µg/ml.

Ces résultats sont très intéressants en les comparant à ceux rapportés par de nombreuses études. En effet, la concentration nécessaire de l'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *Chromolaena odorata* pour la neutralisation de 50% de ce radical est de 380 µg/ml (Alisi et Onyeze, 2008). L'IC₅₀ de l'extrait du chloroforme de feuilles de la même plante (*Chromolaena odorata*) est de 0.28 mg/ml (Srinivasa Rao et al., 2010). Celle d'extrait de chloroforme de feuilles de *Solanum pseudocapsicum*, une plante appartenant à la famille solanaceae est 70.80±0,96 µg/ml, alors que l'extrait acétate d'éthyle a donné une valeur supérieure à 7000 µg/ml (Badami et al., 2005), des concentrations hautement supérieures à celles obtenues dans cette étude.

De même, d'autres auteurs ont rapporté des IC₅₀ des extraits brut supérieures à celle de *Pistacia lentiscus* où l'extrait éthanolique de *Striga Orobanchoïdes* (Scrophulariaceae) a enregistré une IC₅₀ 11.20 ± 0.52 g/ml (Badami et al., 2003), celui de feuilles de *Nasturtium officinale* (Brassicaceae) une valeur de 395.2 µg/ml (Bahramikia et Yazdanparast, 2010), alors que Vijayabaskaran et al. (2010) ont noté une concentration d'inhibition 50% de 78.1±1.75 µg/ml de l'extrait éthanolique de *Pseudarthria viscida* (Fabaceae). Flavonoïde isolé à partir de *Orostachys japonicas* exhibe une valeur d'IC₅₀ de 34.2 ± 0.75 mg/l (Lee et al., 2011).

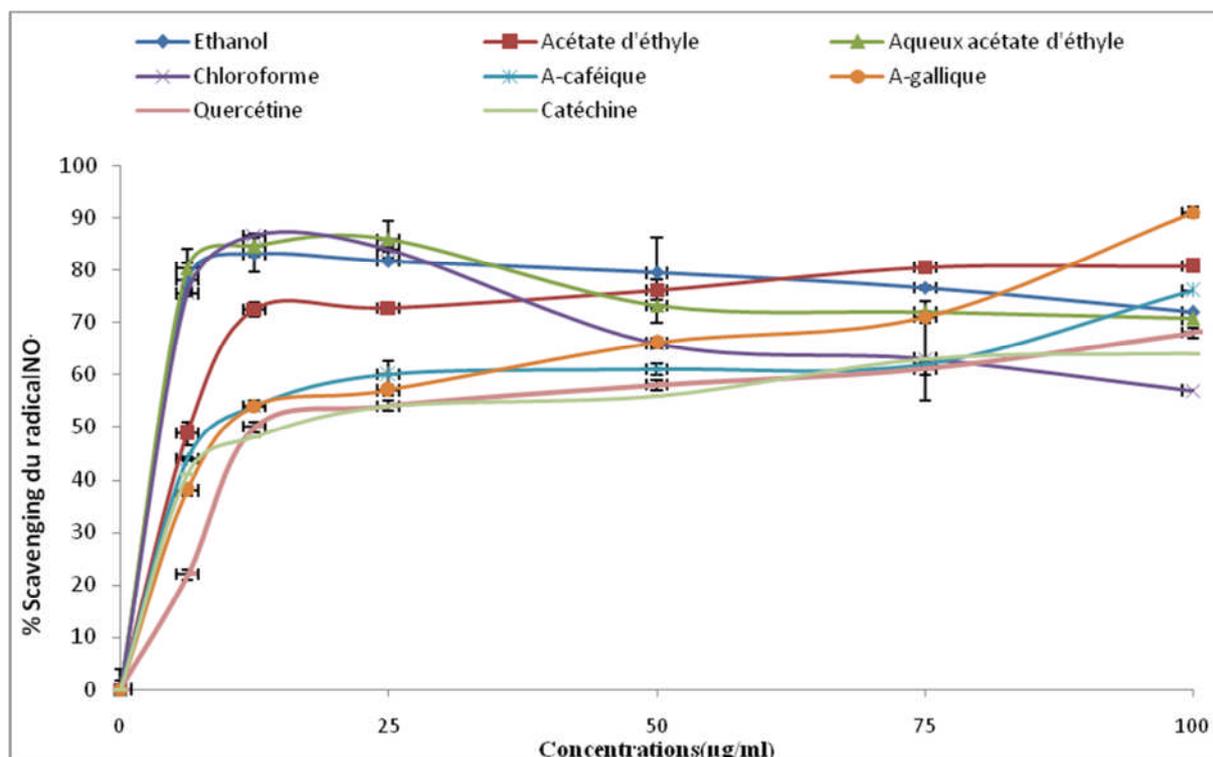


Figure N°41 : Effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote de tous les extraits de graines de *P. lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

Après l'analyse de la figure (N°41), il s'avère que comme pour les extraits de feuilles, l'effet scavenger de $\cdot\text{NO}$ par les extraits de graines et molécules de référence est dose dépendant ; cependant, il est à noter que tous les extraits exhibent une diminution de l'activité à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle qui maintient une linéarité dans l'activité en fonction de la concentration. En effet, l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle comme l'extrait de chloroforme notent une progression de l'activité jusqu'à 25µg/ml ou ils enregistrent des taux de 85,87 et 83, 88%, respectivement. Au de-là de cette dernière, une diminution de leur activité est notée provoquant ainsi un effet pro-oxydant, cela est également observé au niveau de l'extrait brut à partir d'un taux d'inhibition de 83,06 à 12,5µg/ml.

De même, Silva et son équipe, en appliquant le même protocole que celui de notre étude, ont détecté un puissant effet scavenger de $\cdot\text{NO}$ de $78.7 \pm 1.3\%$ de l'extrait éthanolique de *Hypericum perforatum* à 10µg/ml et diminue à $58.2 \pm 2.6\%$, à une concentration de 100µg/ml, due à l'effet prooxydant des composés actifs qui se sont comportés comme des oxydants à forte concentration (Silva et al., 2008). Ce qui s'est produit aussi au niveau de l'extrait acétate d'éthyle de *Chromolaena odorata* (Alisi et Onyeze, 2008).

Cet effet pro-oxydant peut être interprété par un encombrement stérique des composés phénoliques contenus dans ces extraits responsables de piégeage de ce radical ou par la saturation des groupements de ces molécules, sites de fixation de $\cdot\text{NO}$ et leurs inaptitudes à neutraliser la formation des ions nitrites par manque de compétition avec l'oxygène moléculaire.

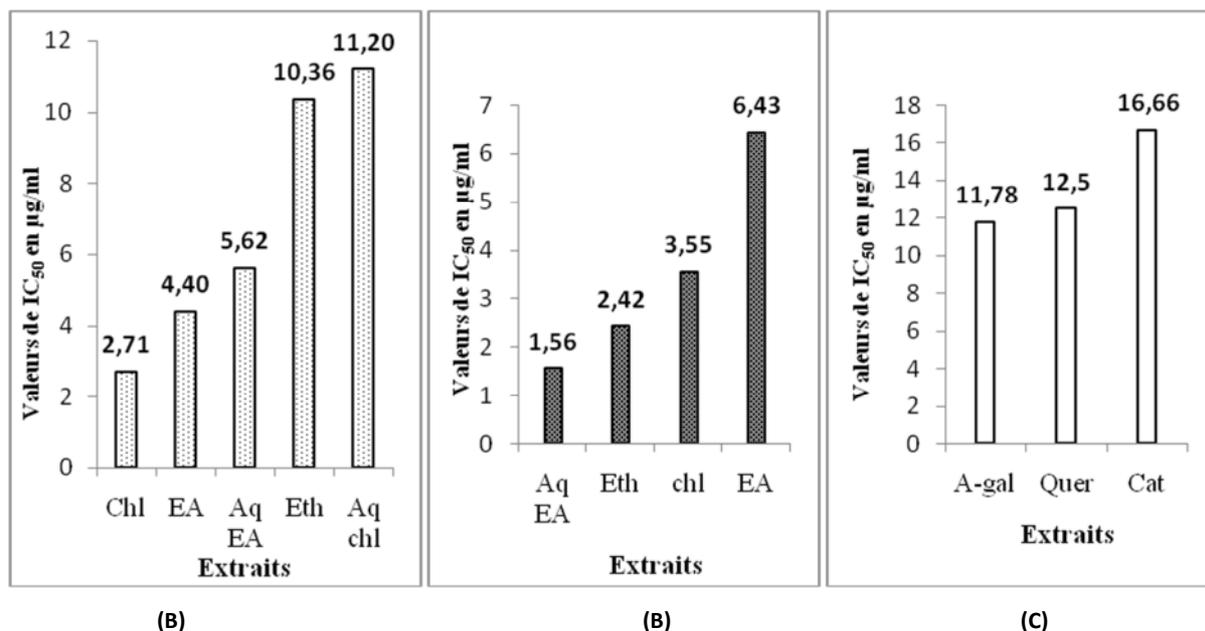


Figure N°42 : Classement croissant des extraits (A) de feuilles, (B) de graines et (C) de certaines molécules de référence, selon leurs IC₅₀. **Eth** : Extrait ethanologique, **EA** : Extrait acétate d'éthyle, **Aq EA** : Extrait aqueux acétate d'éthyle, **Chl** : Extrait de chloroforme, **Aq chl** : Extrait aqueux chloroforme, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercetine, **Cat** : Catéchine.

Nos résultats sont loin d'être proches de ceux de Rajeshwar et *al.* (2005) ayant déterminé l'IC₅₀ de l'extrait méthanolique des graines de *Mucuna pruriens* (Fabaceae) (52.5µg/ml) et de ceux de l'extrait de graine de *Nelumbo nucifera* avec une IC₅₀ de 84.86±3.56g/ml (Rai et *al.*, 2006).

D'autre études ont rapporté, également des valeurs de 102.65 lg/ ml de l'extrait ethanologique de graines de *Caesalpinia bonducella* (Shukla et *al.*, 2009), mais aussi une concentration inhibitrice à 50% de $\cdot\text{NO}$ de 98.8 µg/ml du même extrait de graines de *Sesamum indicum*(Pedaliaceae) (Visavadiya et *al.*, 2009).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des composés phénoliques et l'activité anti- $\cdot\text{NO}$, dont celle de Pollard *et al.* (2006), qui ont rapporté l'implication des motifs structuraux des flavonoles aglycone, dont la quercétine, dans cette activité; le groupement catéchol 3', 4' du cycle B, la double liaison C2=C3 et la fonction 4-oxo. Ces constatations ont été appuyées par les études de Heim *et al.* (2002) et Aquilano *et al.* (2008) où une corrélation positive entre le nombre de groupements OH principalement du cycle B et cette activité a été établie.

Pour conclure, d'après les résultats de comparaison des extraits des feuilles et graines selon leurs IC_{50} , on remarque que les extraits de graine sont les plus puissants. Ce résultat peut être expliqué par la présence des composés ayant les mêmes structures chimiques dans les deux parties de chaque échantillon mais à fortes concentrations dans les graines, douées de l'activité scavenging du monoxyde d'azote, qui par transfert d'hydrogène ou de protons neutralise le radical et inhibe la formation des ions nitrites. De ce fait notre plante avec ses deux parties peut être un nouvel agent thérapeutique pour le piégeage de $\cdot\text{NO}$ et dans la régulation des pathologies causées par la génération excessive de ce radical.

III. 4. Les corrélations

III. 4. 1. Corrélation des activités avec le contenu phénolique des extraits

Les composés phénoliques semblent contribuer de manière très importante au potentiel antioxydant des extraits de plantes médicinales, à cet effet, les teneurs des extraits de *P.lentiscus* en composés phénoliques ont été corrélées avec leurs activités antioxydants. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°VIII : Corrélation entre les activités anti-radicalaires et les teneurs des extraits en composés phénoliques.

Composés phénoliques	FRAP		ABTS $\cdot+$		O $_2\cdot$		$\cdot\text{NO}$	
	feuilles	graines	feuilles	graines	feuilles	graines	feuilles	graines
Phénols totaux	0,85 ^a /0,87 ^b	0,93 ^a /0,93 ^b	0,66	0,60	0,44	/	-0,49	-0,63
Flavonoïdes	0,92 ^a /0,91 ^b	0,51 ^a /0,51 ^b	0,48	0,46	0,30	/	-0,32	0,24
Tannins	-0,38 ^a /-0,4 ^b	-0,4 ^a /-0,4 ^b	-0,81	-0,56	-0,65	/	0,42	-0,30

NB - a: eq A Asc; b : eq A Caf

- Pour plus de détails voir annexe.

III. 4. 1.1. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir réducteur

A partir des résultats obtenus, on constate de bons coefficients de corrélation entre la teneur en phénols totaux et le pouvoir réducteur au niveau des extraits des graines ($r = 0,93$) et des feuilles ($r = 0,87$) de *P. lentiscus* (Tableau N°XIII). Atmani et al. (2009) ont rapporté un très bon coefficient ($r=0,96$), entre les concentrations en phénols totaux et le pouvoir réducteur des extraits des feuilles de la même plante. De plus, plusieurs travaux dont parmi eux; Maksimovic et al., 2005; Katalinic et al., 2006; Surveswaran et al. 2007; Prasad et al., 2010, ont rapporté des résultats similaires, en appliquant la méthode FRAP.

De même, pour les extraits des feuilles, les teneurs des flavonoïdes, sont en corrélation très étroite avec cette activité. Néanmoins un coefficient de corrélation moyen est établi pour les extraits de graines ($r=0,51$). A l'inverse des phénols totaux et les flavonoïdes, les tannins ne semblent pas être impliqués dans le pouvoir réducteur des extraits des deux parties étudiées de la plante (tableau N° VIII).

III. 4. 1.2. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging du cation ABTS⁺

Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation entre les phénols totaux et les flavonoïdes a révélé des valeurs positives moyennes autant pour les extraits des feuilles avec $r= 0,66$ et $r=0,48$ respectivement, que pour ceux des graines ($r=0,60$ et $r=0,46$). Djeridane et al. (2007) ont enregistré une corrélation linéaire entre la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et l'effet scavenger des extraits de 11 plantes médicinales Algériennes avec $r= 0,83$, $r= 0,33$ respectivement.

Cependant des coefficients de corrélation négatifs sont établis entre la teneur en tannins et l'effet scavenger de radical cationique des extraits de feuilles et de graines, suggérant que l'effet scavenger du radical ABTS⁺ de cette plante ne serait pas attribuée à sa composition en composés phénoliques seulement étant donné que tous les extraits de feuilles de *P. lentiscus* ont exhibé des activités supérieures à 80%.

III. 4. 1.3. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging de l'anion superoxyde

D'après les figures (annexe 3 et tableau tableau N° VIII), il est à noter, que des coefficients de corrélation positifs faibles ont été obtenus entre la teneur en phénols totaux, flavonoïdes et l'effet scavenger de l'anion superoxyde des extraits de feuilles ($r= 0,44$ et $r=0,30$) respectivement. Cela explique que rien que 44% et 30% de cette activité exhibée par les extraits de feuilles résultent de la contribution de phénols totaux et flavonoïdes

respectivement. Parejo *et al.* (2003) ont rapporté une bonne corrélation entre la teneur en phénols totaux, de dix plantes médicinales, et cette activité qui varie entre 0,58 et 0,97.

D'autre part, un coefficient de $r = -0,65$ est obtenu entre la teneur en tannins et le pourcentage d'inhibition de ce radical, ce résultat est en accord avec celui Falleh et son équipe (2008) où un coefficient de $r = -0,68$ est enregistré entre la teneur en tannins et l'effet scavenger de l'anion superoxyde de l'extrait méthanolique de *Cynara cardunculus* (Asteraceae),

III.4.1.4. Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité scavenging de monoxyde d'azote

La corrélation entre l'effet anti-•NO des les extraits de feuilles et de graines de *P.lentiscus* et leurs teneurs en composés phénoliques a révélé des coefficients de corrélation faibles positifs et négatifs (voir tableau N°VIII). Ces résultats témoignent de l'implication des composés non phénolique dans cette activité. Kumari et Kakkar (2008) ont estimé que 97,5% des composés phénoliques de *Crataeva nurvala* contribuent à l'effet scavenger de •NO, cependant, ils ont estimé une très faible corrélation entre cette activité et la teneur en tannins.

D'après tous ces résultats obtenus, il est clair qu'il ya une contribution d'autres antioxydants dans les différentes activités testées tels que les terpènes, vitamines, caroténoïdes (Javanmardi *et al.*, 2003). Effectivement, Il a été rapporté que *P. lentiscus* est riche en α -tocophérol (Kyvcak et Akay, 2005) et en monoterpènes, en huiles essentielles et triterpénoïdes (Castola *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2000; Dogan *et al.*, 2003; Chryssavgi *et al.*, 2008; Amhamdi *et al.*, 2009).

III. 4. 2. Corrélation entre les activités antioxydants

Etant donné que les composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés de neutralisation des radicaux libres soit par transfert d'électrons ou d'hydrogènes, une corrélation entre les différents tests antioxydants est entreprise dans le but de déterminer la nature de cette corrélation et de vérifier si ces composés qui contribuent dans ces activités.

Il a été rapporté par plusieurs études (Nilsson *et al.*, 2005; Surveswaran *et al.*, 2007; Vasco *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009; Pasko *et al.*, 2009) qu'un bon pouvoir réducteur peut prédire une bonne activité antioxydant mais ce n'est pas toujours le cas . Effectivement, des coefficients de corrélation moyens positifs ont été obtenus entre les tests antioxydant FRAP - ABTS^{•+} et FRAP - O₂^{•-} des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* (voir tableau N°IX).

Alors qu'une bonne corrélation est enregistrée entre les tests FRAP et ABTS•+ des extraits des graines ($r= 0,79$) suggérant que 79% des composés antioxydants interviennent dans ces deux activités, un tel résultat a été rapporté par (Chang et al., 2007).

Tableau N°IX :Corrélation entre les activités antioxydants des extraits des feuilles et des graines

Activité antioxydant	FRAP		ABTS ^{•+}		O ₂ ^{•-}		•NO	
	feuilles	graines	feuilles	graines	feuilles	graines	feuilles	graines
FRAP	1,00	1,00						
ABTS ^{•+}	0,61 ^a /0,65 ^b	0,79 ^a /0,79 ^b	1,00	1,00				
O ₂ ^{•-}	0,53 ^a /0,56 ^b	/	0,84	/	1,00	/		
•NO	-0,59 ^a /-0,62 ^b	-0,53 ^a /-0,53 ^b	-0,71	-0,13	-0,94	/	1,00	1,00

NB - a: eq A Asc; b : eq A Caf

- Pour plus de détails voir annexe.

Par ailleurs des corrélations entre les tests anti-radicalaires ont été également établies, où le coefficient le plus élevé est enregistré entre les résultats des tests ABTS^{•+}- O₂^{•-} des extraits des feuilles avec $r=0,71$. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Chen et Yen (2007) des deux tests ABTS^{•+}- O₂^{•-} des extraits des feuilles de *Psidium guajava* L.

Quant aux résultats des tests anti-(•NO-O₂^{•-}) des extraits de feuilles, ont noté une relation inversement proportionnelle en exhibant un coefficient de $r= -0,88$. De même, cette relation est retrouvée entre les deux activités ABTS^{•+}-•NO des extraits de feuilles et des graines ($r= -0,70$ et $r= -0,13$ respectivement).

L'ensemble des résultats obtenus indiquent que l'utilisation des différents tests antioxydant renseigne sur la variation des mécanismes d'actions des composés contenus dans les extraits de *P. lentiscus* contre les radicaux libres.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

Les extraits de feuilles et graines de *P.lentiscus* ayant montré de fortes activités antioxydants et les extraits bruts ont été fractionnés au moyen d'une chromatographie sur colonne. Ainsi, différentes fractions ont été récupérées selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans les systèmes d'éluion utilisés. Ces fractions ont été testées dans le but d'évaluer leur activité antioxydant.

III.5.1. Mesure du pouvoir antioxydant (FRAP) des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

Les résultats représentés dans les figures (N°43) et (N°44) indiquent des différences significatives entre les fractions de chaque extrait en équivalent acide ascorbique/acide caféique à l'exception des trois dernières fractions de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles et les deux dernières fractions de l'extrait éthanolique et aqueux acétate d'éthyle des graines qui n'enregistrent aucune différence significative ($P < 0,05$).

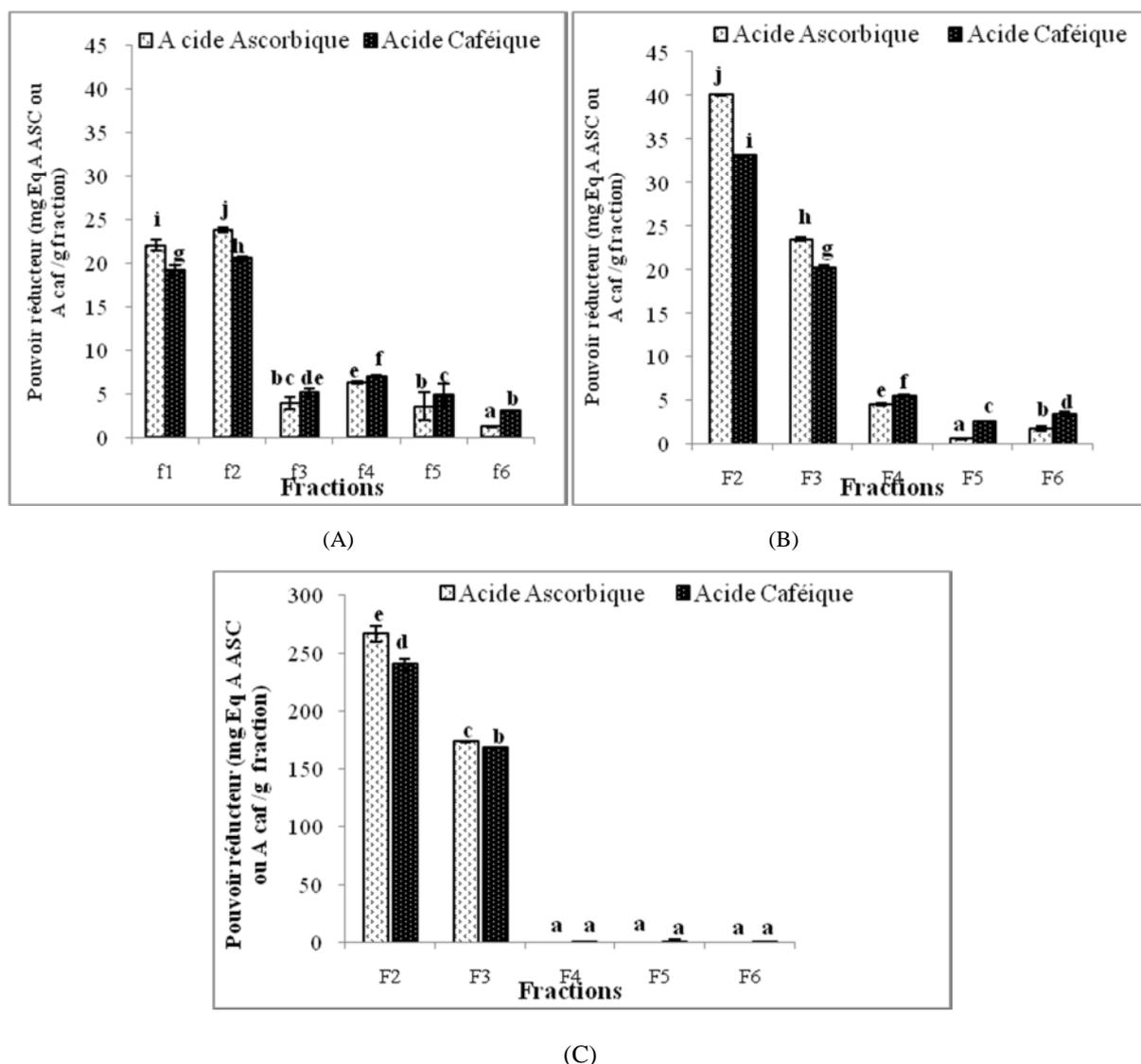


Figure N°43 : Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode FRAP des fractions des extraits ; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, des feuilles de *Pistacia lentiscus* en équivalent d'acide ascorbique/d'acide caféique.

En examinant cette figure (N°43), il en ressort que l'activité réductrice des trois extraits fractionnés s'est concentrée au niveau des premières fractions F1 et F2 pour l'extrait brut et F2 et F3 pour les extraits aqueux. Alors que les autres fractions enregistrent des activités très faibles voire même nulles. Ce qui nous laisse dire que les composés responsables de cette réduction sont de nature apolaire ou d'une polarité moyenne.

En effet, avec un taux de $22,04 \pm 0,66$ mg Eq A Asc/g fraction et $19,18 \pm 0,51$ mg Eq Acaf/g fraction, la première fraction de l'extrait d'éthanol, élue par un mélange de solvants le plus apolaire (chloroforme : acétate d'éthyle), vient après la deuxième fraction F2 élue par le système (acétate d'éthyle: méthanol) qui note une activité de $23,80 \pm 0,32$ mg Eq A Asc/g fraction et $20,54 \pm 0,25$ mg Eq A.caf/g fraction. Cette dernière est moins active non seulement par rapport à celle de l'extrait aqueux acétate d'éthyle ($40,08 \pm 0,07$ mg Eq A Asc/g fraction et $33,13 \pm 0,05$ mg Eq Acaf/g fraction) mais aussi largement inférieure à celle de l'aqueux du chloroforme qui exhibe une activité réductrice élevée avec $266,30 \pm 6,58$ mg Eq A Asc/g fraction et $240,00 \pm 5,09$ mg Eq Acaf/g fraction. La même tendance de variation de l'activité est notée entre les fractions F3 récupérées par le mélange (méthanol : eau) des trois extraits actifs des feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Ces résultats sont en concordance avec ceux d'une étude récente réalisée par Jeong et ses collaborateurs (2011), en appliquant la méthode FRAP, où le fractionnement de l'extrait brut de feuilles d'une plante médicinale *Zanthoxylum piperitum*, dont les usages thérapeutiques sont les mêmes que celles de *Pistacia lentiscus*, par six systèmes d'élution à polarité croissante à base d'un mélange du chloroforme et méthanol, a révélé un pouvoir réducteur plus important au niveau des fractions de polarité moyennes à savoir celles élues par les systèmes méthanol/chloroforme (1 :4) et (1 : 2).

En ce qui concerne les graines, comme pour les feuilles, les premières fractions ont noté les meilleures activités réductrices du fer ($p < 0,05$) à savoir F1 et F2 pour les extraits brut et chloroforme et F1, F2 et F3 pour l'extrait aqueux acétate d'éthyle. Néanmoins, ces activités restent très faibles par rapport à celles des fractions actives des extraits de feuilles.

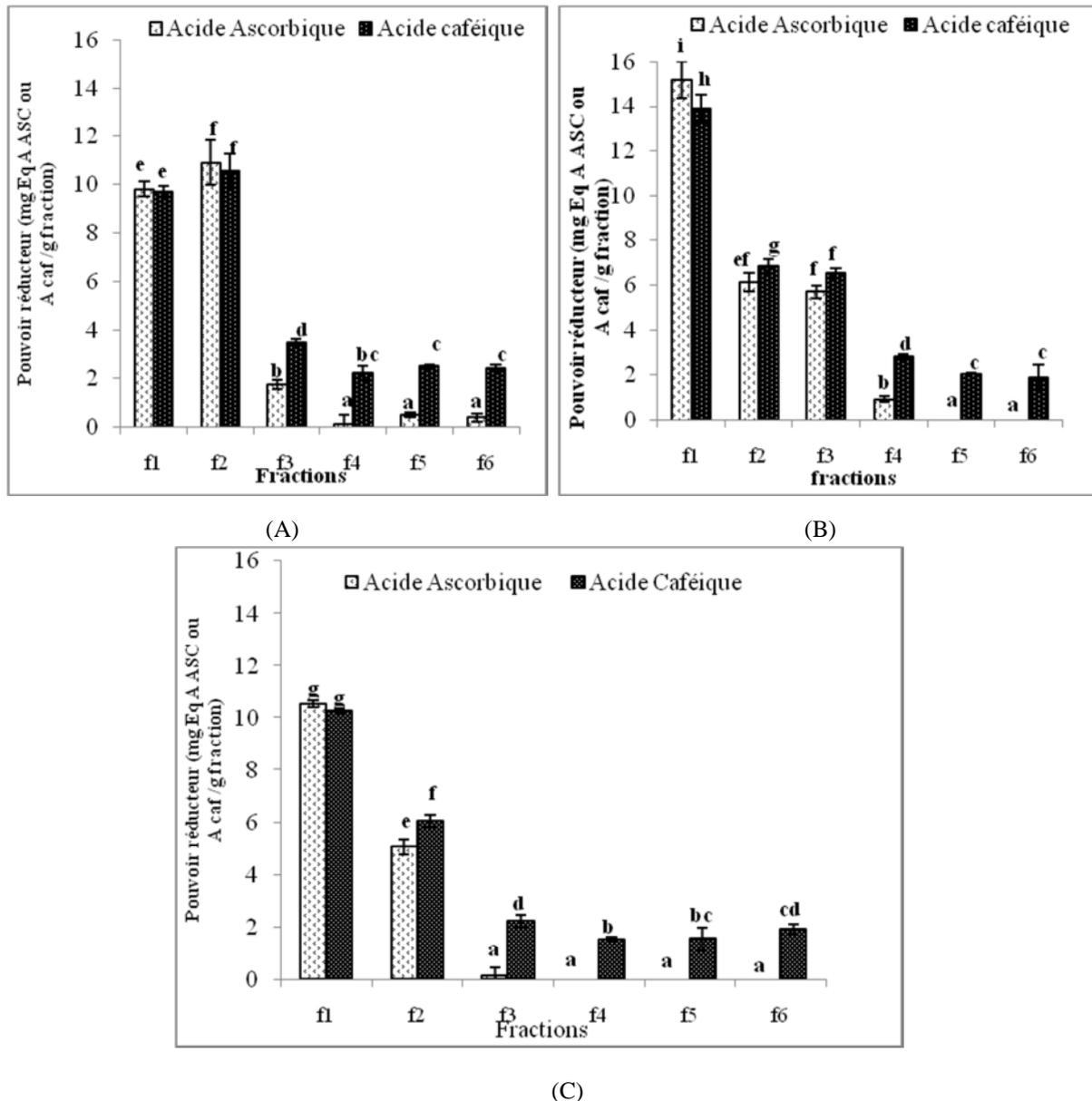


Figure N°44: Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode FRAP des fractions des extraits ; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : du chloroforme, des graines de *Pistacia lentiscus* en équivalent d'acide ascorbique/d'acide caféique.

Après analyse des figures (N°44A, 44B, 44C), on constate que la première fraction F1 éluee par le système (chloroforme : acétate d'éthyle) de l'extraits aqueux acétate d'éthyle exhibe une activité réductrice la plus élevée avec $15,19 \pm 0,82$ mg Eq A Asc/g fraction et $13,88 \pm 0,64$ mg Eq A Caf/g fraction. Suivie par celle issue de l'extrait du chloroforme puis celle de l'extraits brut ($10,54 \pm 0,11$ mg Eq A Asc/g fraction et $10,28 \pm 0,09$ mg Eq A Caf/g fraction et $9,81 \pm 0,30$ mg Eq A Asc/g fraction et $9,71 \pm 0,23$ mg Eq A Caf/g fraction, respectivement). Ces fractions présentent des activités proches de celle de leurs extraits natifs ($15,64$ mg Eq A Asc/g fraction et $13,52$ mg Eq A Caf/g fraction) et ($13,54$ mg Eq A Asc/g fraction et $11,89$ mg Eq A Caf/g fraction) et ($7,02$ mg Eq A Asc/g fraction et $6,85$ mg Eq A Caf/g fraction), respectivement.

Néanmoins, seule la fraction 2 éluée par acétate d'éthyle : méthanol de l'extrait brut qui a montré un pouvoir réducteur plus élevé que celui de son extrait natif. De plus, cette fraction a présenté une grande activité par rapport à celle des deux autres extraits fractionnés. La fraction F3 de l'extrait aqueux acétate d'éthyle a noté un pouvoir réducteur supérieur non seulement à ceux des autres extraits mais aussi à ceux des autres fractions qui restent des trois extraits ($p < 0,05$).

De ces résultats on peut déduire que le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux acétate d'éthyle et du chloroforme est du à un effet synergique entre les molécules présentes dans ces fractions actives. Un effet antagoniste est exposé par les fractions de l'extrait brut qui peut être interprété par l'encombrement stérique. En effet, une récente étude réalisée par Hidalgo et *al.* (2010), ont démontré la présence de cet effet tant synergique que antagoniste entre une gamme de composés phénoliques à savoir les flavonoïdes, en appliquant la méthode FRAP, où l'effet synergique est observé juste dans le cas d'un mélange de molécule isomolaire, néanmoins l'effet antagoniste peut apparaître même en respectant ce rapport, c'est le cas de présence de myricétine avec quercétine, 1:1, mais aussi en présence de mélange de peonidin-3-glucoside et malvidin-3-glucoside, correspondant aux anthocyanins, qui possède le 3'-OMe et les groupes 3'- et 5'-OMe dans le cycle B-, respectivement, et la co-présence de peonidin-3-glucoside avec délfhinidin-3-glucoside dans le mélange.

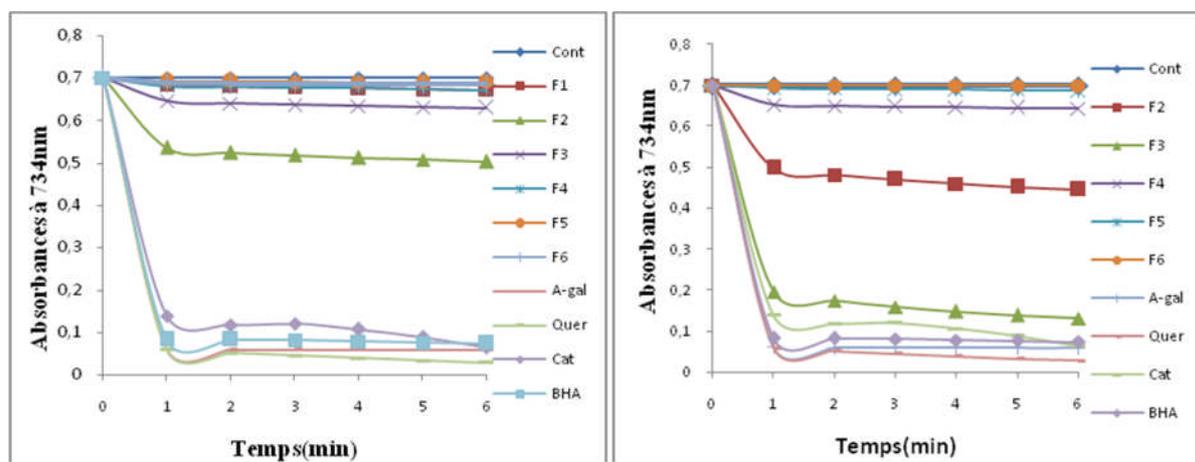
Selon l'ensemble de tous les résultats obtenus dans la figure (N°43) et (N°44), Il est à noter que le pouvoir réducteur des fractions de tous les extraits testés est inversement proportionnel à la polarité, ce qui nous laisse dire que les composés réducteurs sont de nature apolaire, voire même de polarité moyenne. Cependant les fractions polaires sont caractérisées par des activité réductrices dont les valeurs en équivalent d'acide caféique sont plus élevée que celle en équivalent d'acide ascorbique, ce qui peut être expliqué par le nombre (Chvatalova et *al.*, 2008) et la positions des groupements OH contenus des ces antioxydants qui entrent dans le mécanisme d'action.

III.5.2. Activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus* à 100µg/ml

III.5.2.1. Activité scavenging du radical cationique ABTS^{•+}

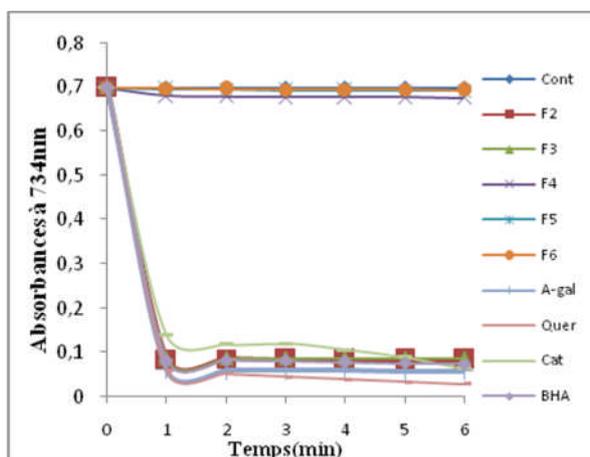
III.5.2.1.1. La cinétique de l'activité antiradicalaire

Les résultats de la variation des absorbances du radical ABTS^{•+} en fonction du temps en présence des différentes fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles et de graines et quelques molécules de référence obtenus à une concentration de 100 µg/ml sont illustrés dans les figures (N°45) et (N°46) suivantes :



(A)

(B)



(C)

Figure N°45: Effet scavenger contre le radical ABTS^{•+} des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, de feuilles de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml en fonction du temps. **Cont** : Contrôle, **F** : Fractions 1-6, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercetine, **Cat** : Catéchine.

L'ensemble des représentations graphiques dans la figure (N°45) indique la stabilité de l'absorbance du radical cationique $ABTS^{*+}$ en présence de la majorité des fractions actives et des molécules de référence après la première minute, comme indiqué pour leurs extraits natifs. A l'exception de la catéchine, les fractions F2 de tous les extraits actifs et la fraction F3 de l'aqueux acétate d'éthyle qui marquent une diminution de l'absorbance jusqu'à la dernière minute de la réaction. Ces absorbances sont largement inférieures à celle du contrôle (0,70), ce qui traduit une grande activité scavenging de ce radical. Cela est absent au niveau des deux dernières fractions F5 et F6 de tous les extraits ayant enregistré un très faible effet scavenger.

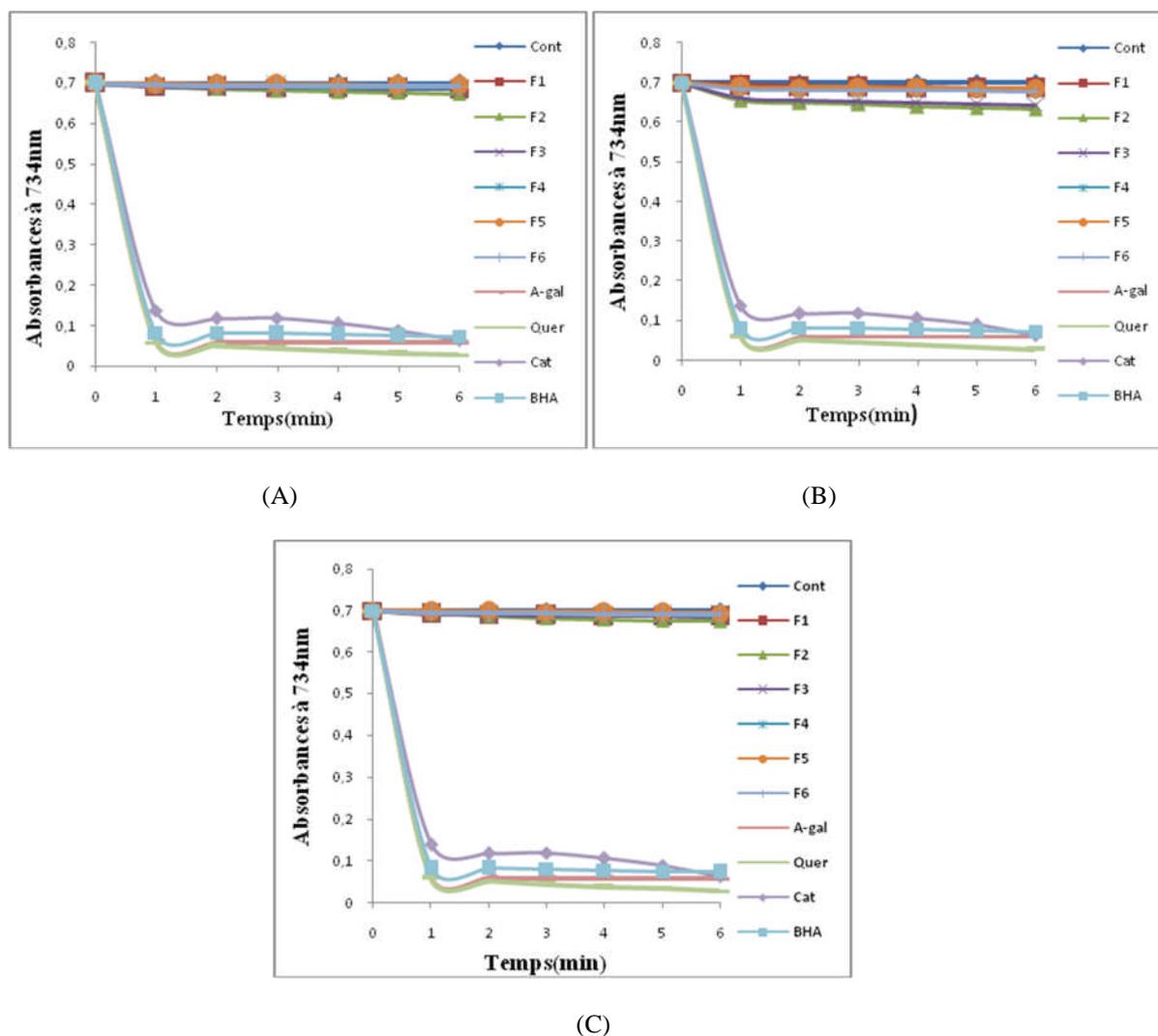


Figure N°46: Effet scavenger contre le radical $ABTS^{*+}$ des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, de graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 $\mu\text{g/ml}$ en fonction du temps, **Cont** : Contrôle, **F** : Fractions 1-6, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercétine, **Cat** : Catéchine.

La même constatation est soulevée dans la figure (N°46) où l'absorbance du radical en présence de toutes les fractions des extraits actifs de graines est très proche de celle du contrôle avec des valeurs allant de 0,69 à 0,6786. Alors qu'une très grande différence entre ces absorbances et celles de toutes les molécules de référence est mise en évidence reflétant ainsi des activités scavenging très faibles.

Seules au niveau des deux fractions F2 et F3 de l'aqueux acétate d'éthyle qu'il y'a eu une légère diminution dans l'absorbance du radical pendant la première minute, et atteint 0,6550 et 0,6612, mais qui tendent à se stabiliser jusqu'à la fin de la réaction à des valeurs de 0,6328 et 0,6443, respectivement.

III.5.2.1.2. l'activité anti- ABTS^{•+} en terme de pourcentage et TEAC

L'activité scavenging du radical cationique ABTS^{•+}, exprimée en pourcentage d'inhibition et en terme de TEAC, des différentes fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* et quelques molécules de référence testées à 100µg/ml est illustrée dans les figures (N°47) et (N°47) et les tableaux (N° X) et (N° XI) ci-dessous :

L'analyse statistique montre clairement des différences significatives ($p < 0,05$) entre toutes les fractions des extraits actifs de feuilles et de graines avec les molécules de référence, et entre les fractions du même extrait. Néanmoins, aucune différence n'est enregistrée entre la fraction F1 et F3 et entre les deux fractions F5 et F6 issues de l'extrait brut. La même observation est notée entre F2, F3, F5 et F6 de l'extrait aqueux du chloroforme.

En analysant les résultats illustrés dans la figure (N° 47), on remarque que l'effet scavenger contre l'ABTS^{•+} est enregistré principalement au niveau des premières fractions de chaque extrait actif. En effet, les fractions F2 et F3 de l'extrait aqueux de chloroforme exhibent les meilleures activités avec $87,95 \pm 0,61\%$ et $87,52 \pm 0,57\%$, respectivement, proches de celle de leur extrait natif (90,55%), exprimant ainsi les valeurs les plus élevées en terme de TEAC ($20,45 \pm 0,14$ et $20,38 \pm 0,12$ mmol Trolox/g de fraction, respectivement), suivies par la fraction F3 de l'extrait aqueux acétate d'éthyle ($81,30 \pm 0,03\%$ et $18,37$ mmol trolox/g de fraction).

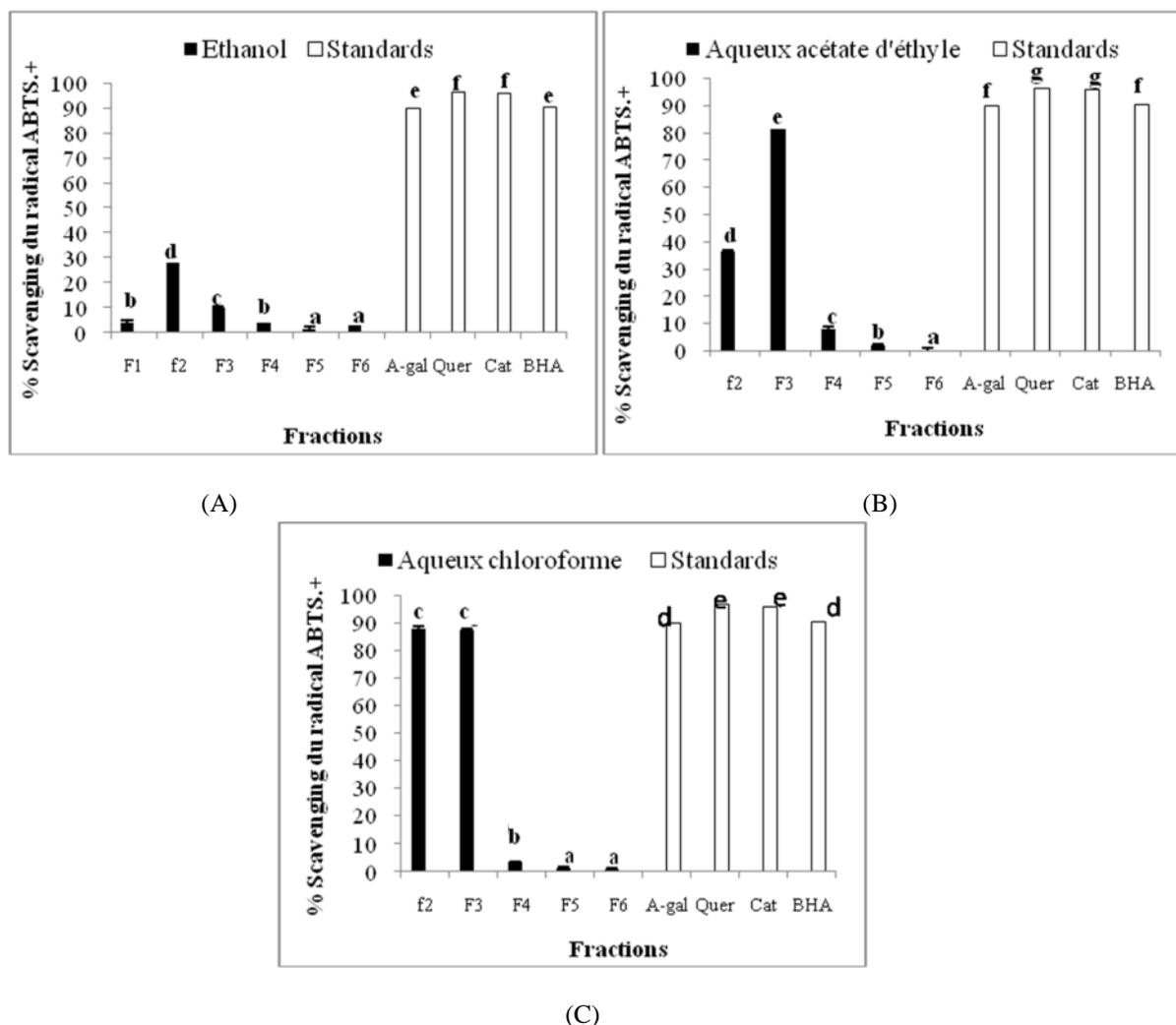


Figure N°47 : Effet scavenger contre l'ABTS⁺ des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme, de feuilles de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. **F** : Fractions 1-6, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercetine, **Cat** : Catéchine.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Cependant, la fraction F2 de l'extrait aqueux d'acétate ainsi que celle de l'extrait brut présentent des activités inférieures à celle enregistrée par la F2 issue de l'aqueux du chloroforme, qu'avec un taux d'inhibition de 36,29±0,45 et 28,07±0,12% en terme de pourcentage d'inhibition et 7,97 ±0,10 et 6,21± 0,02 mmol eq trolox/g de fraction, suivies par la F3 de l'extrait brut qui enregistre un effet scavenger du radical de 10,12±0,16%.

Tableau N°X: Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l'ABTS^{•+} en (TEAC) (mmol eq trolox/g de fraction) à 100µg/ml des fractions des extraits actifs de feuilles de *P. lentiscus*.

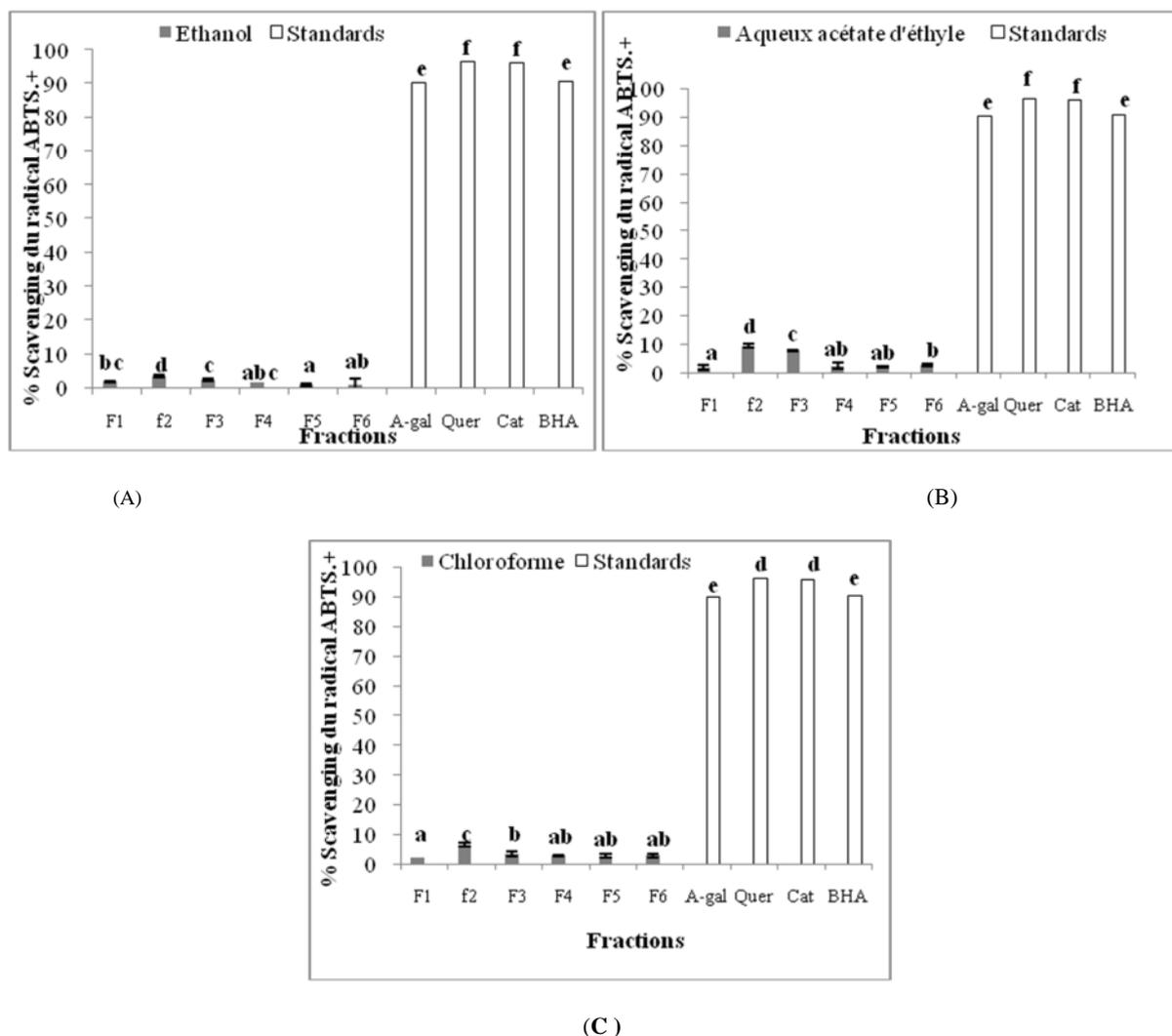
Fractions	Effet anti-radicalaire contre l'ABTS ^{•+} en (TEAC) mmol eq trolox/g de fraction		
	Ethanol	Aqueux acétate d'éthyle	Aqueux chloroforme
Fraction1	0,79±0,17 ^b	/	/
Fraction2	6,21±0,02 ^d	7,97±0,10 ^d	20,45±0,14 ^c
Fraction3	2,17±0,03 ^c	18,37±0,00 ^e	20,38±0,12 ^c
Fraction4	0,80±0,03 ^b	1,75±0,18 ^c	0,69±0,09 ^b
Fraction5	0,28±0,25 ^a	0,32±0,12 ^b	0,18±0,12 ^a
Fraction6	0,43±0,12 ^a	0,07±0,07 ^a	0,14±0,07 ^a

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Les autres fractions, notamment les plus polaires, éluées par un système à base d'eau ont noté des effets insignifiants. Ces résultats sont appuyés par ceux de Jeong et ses collaborateurs (2011) ayant rapporté la même tendance de variation de l'activité scavenging du radical cationique par des fractions chromatographiques de l'extrait brut de feuilles de *Zanthoxylum piperitum*, éluées par des systèmes de polarité croissante, où toutes les fractions ont enregistré de faibles activités scavenging à l'exception de deux qui sont éluées par deux systèmes de polarité moyenne méthanol/chloroforme (1:4 et 1:2, v/v) avec 81.2 et 80.9% respectivement à 500µg/ml et 3.51% par la fraction la plus apolaire (méthanol : chloroforme 1 :49) testée à la même concentration.

Tel que déjà mentionné, à l'exception des fractions F4 et F5 de l'aqueux acétate d'éthyle et les trois dernières fractions de l'extrait du chloroforme, toutes les fractions des extraits de graines exposent des différences significatives avec les standards mais aussi entre les fractions du même extrait (P<0,05).



FigureN°48 : Effet scavenger contre l' ABTS⁺ des fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, de graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. **F** : Fractions 1-6, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercétine, **Cat** : Catéchine.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.
 -Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

A la première lecture des résultats obtenus on constate que toutes les fractions des extraits de graines marquent de très faibles activités avec les meilleurs taux d'inhibition de $9,59 \pm 0,63\%$; $1,98 \pm 0,13$ mmol eq trolox/g fraction et $7,95 \pm 0,19\%$, $1,63 \pm 0,05$ mmol eq trolox/g fraction, notés par F2 et F3 d'aqueux acétate d'éthyle, suivies de $6,57 \pm 0,60\%$ $1,34 \pm 0,14$ mmol trolox/g fraction de la F2 issue de l'extrait de chloroforme.

Ce qui n'est pas en accords avec les résultats rapportés par Bhouri et *al.* (2010) ayant déterminé une activité scavenging du radical cationique ABTS⁺ de l'ordre de 42% à une concentration de (100µg/ml), d'un composé élué par un système à base de méthanol et eau, issu d'un extrait acétate d'éthyle des fruits de *Pistacia lentiscus*.

La présence de cette divergence entre les résultats même s'il s'agit de la même plante peut être attribuée à la différence entre les conditions climatiques (l'origine de l'échantillon Algérie/Tunisie), la période de récolte mais aussi à la différence entre les protocoles d'extractions.

Tableau N° XI: Activité anti-radicalaire contre le radical cationique l' ABTS⁺⁺ en (TEAC) (mmol eq trolox/g de fraction) à 100µg/ml des fractions des extraits actifs de graines de *P. lentiscus*.

Fractions	Effet anti-radicalaire contre l'ABTS ⁺⁺ en (TEAC) mmol eq trolox/g de fraction		
	Ethanol	Aqueux acétate d'éthyle	chloroforme
Fraction1	0,35±0,01 ^b	0,37±0,15 ^a	0,39±0,03 ^a
Fraction2	0,66±0,11 ^c	1,98±0,13 ^d	1,34±0,14 ^d
Fraction3	0,43±0,11 ^{bc}	1,63±0,05 ^c	0,73±0,15 ^c
Fraction4	0,25±0,00 ^{ab}	0,50±0,24 ^{ab}	0,60±0,08 ^{bc}
Fraction5	0,11±0,06 ^a	0,44±0,02 ^a	0,59±0,17 ^{bc}
Fraction6	0,17±0,07 ^{ab}	0,63±0,09 ^b	0,57±0,14 ^{bc}

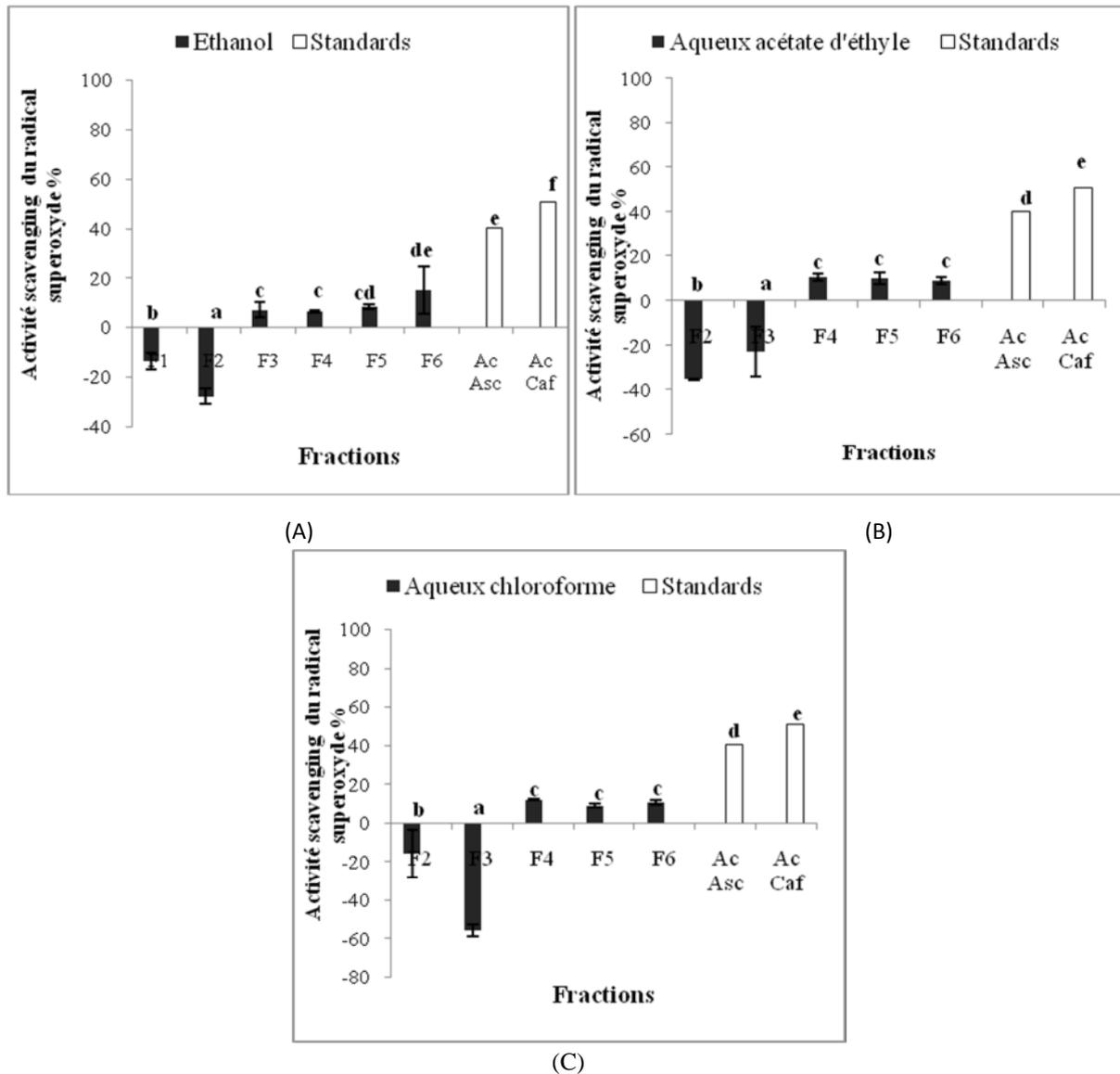
-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05)

III.5.2.2. Activité scavenging des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus* contre l'anion superoxyde

A l'issue des résultats négatifs de l'activité scavenging de l'anion superoxyde de tous les extraits de graines, seules les fractions des extraits actifs de feuilles de *P. lentiscus* sont évaluées pour leurs éventuelles capacités à piéger ce radical, à une concentration de 100µg/ml. L'acide caféique et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards.

D'après les valeurs illustrées dans la figure (N°49), on voit clairement que mis à part les deux premières fractions de chaque extrait actif, toutes les autres fractions ont manifesté des activités scavenging de l'anion superoxyde positives très faibles par rapport aux molécules de référence (p<0,05) avec des taux d'inhibitions de 6,40±0,58% et 11,98±0,37% pour les fractions F4 issues de l'extrait brut et de l'aqueux du chloroforme respectivement. Où une différence significatives est enregistrée dans toutes les représentations graphiques excepté entre les deux fractions F3 et F4 de l'extrait brut éluées par les systèmes (méthanol : eau) de polarité croissante, et entre les trois dernières fractions à savoir F4, F5 et F6 des deux extraits aqueux. Ces résultats peuvent être expliqués par la nature polaire des composés élués par les mélanges de solvant ayant le même mécanisme réactionnel dans la neutralisation de ce radical.



FigureN° 49 : Effet scavenger de l'anion superoxyde des différentes fractions des extraits actifs (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* et quelques molécules de référence à 100µg/ml. **F** : Fractions 1-6, **Ac Asc** : Acide ascorbique, **Ac Caf** : Acide caféique
-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.
-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative ($P < 0,05$).

Concernant les deux premières fractions qui se sont montrées actives dans les deux tests précédant, dans le présent test, elles ont marqué des activités négatives notamment les fractions F1 et F2 de l'extrait brut et la F2 et F3 des extraits aqueux éluées par les systèmes respectifs (chloroforme : acétate d'éthyle), (acétate d'éthyle : méthanol) et (méthanol : eau).

Cette activité négative est expliquée par le phénomène prooxydant des molécules contenues dans ces fractions contre ce radical. Effectivement, ce résultat est vérifié en réalisant des dilutions pour la F2 de l'extrait brut où ce phénomène persiste même à une concentration de 50µg/ml, alors qu'un taux d'inhibition de 26,20% est enregistré à 25 µg/ml et une activité de 37,67% presque similaire à celle de son extrait natif (37,09%) est obtenue à une concentration de 12,5 µg/ml.

Ce phénomène peut être interprété par la co-oxydation du NADH par les métabolites semiquinones issus de l'auto-oxydation des composés phénoliques contenus dans ces fractions, induisant ainsi l'augmentation du taux de radical superoxyde dans le milieu réactionnel (Wilms et *al.*, 2008). Cela confirme le comportement biphasique des composés phénoliques, en étant des antioxydants à faible concentration et des composés prooxydants à fortes doses (Chen et Yen, 2007; Jayaprakasha et Patil, 2007; Silva et *al.*, 2008; Skandrani et *al.*, 2009; Kalaivani et Mathew, 2010). Bhourri et ses collaborateurs (2010), ont signalé que la fraction (acide digallique) élue par un mélange méthanol : eau issue de l'extrait acétate d'éthyle de fruits de *Pistacia lentiscus* a exhibé un bon effet scavenger contre l'anion superoxyde (produit par le système xanthine oxydase) à faibles concentrations (50µg/ml) et note une diminution de cette activité à 100µg/ml qui tend à maintenir la même valeur à une concentration plus élevée (150µg/ml).

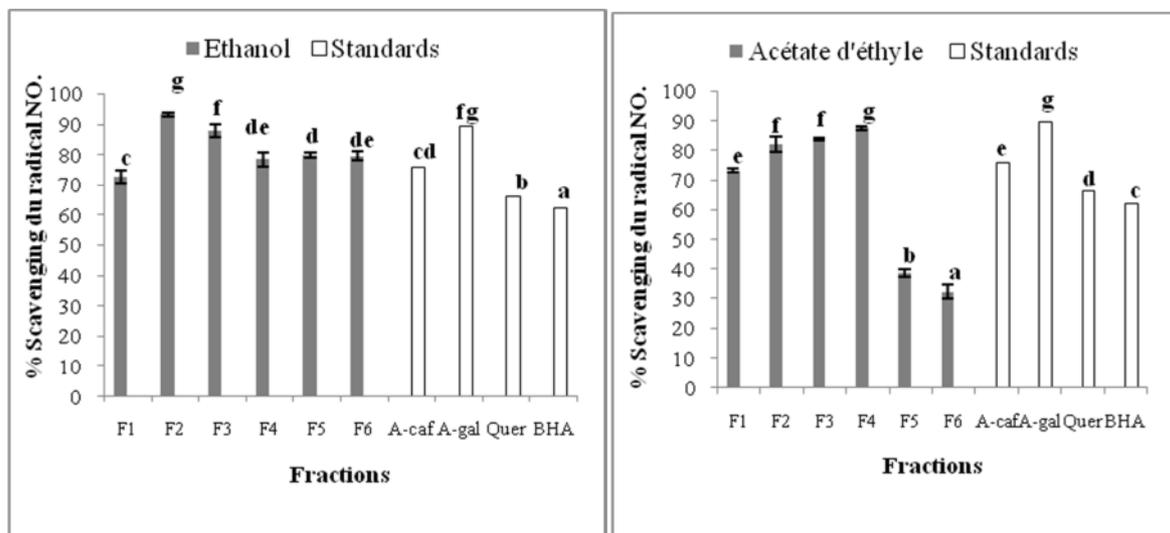
Par ailleurs, le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de fruits de *Garcinia mangostana*, par des mélanges de solvants contenant entre autre l'acétate d'éthyle et le méthanol, a permis l'obtention de deux composés ayant une forte activité contre l'anion superoxyde (généré par l'auto-oxydation de pyrogallole) où le composé 1(α -mangostin) a montré un effet de 80% à une concentration de 80 µg/ml alors que le deuxième composé (γ -mangostin) à 100µg/ml a donné un pourcentage d'inhibition de 60% (Cui et *al.*, 2010).

III.5.2.3. Activité scavenging des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus* contre le monoxyde d'azote

Selon les résultats illustrés par l'ensemble des histogrammes des figures (N°50) et (N°51), deux observations nous paraissent importantes à relever :

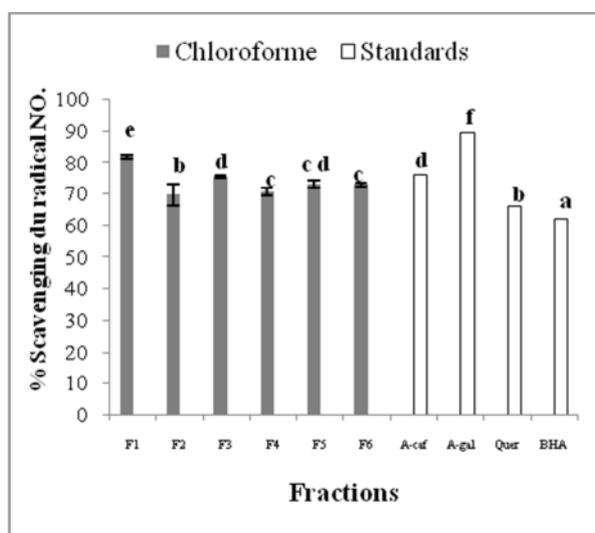
✓ l'analyse statistique a montré, des différences significatives entre les différentes fractions des extraits actifs et les molécules de référence ($P < 0,05$). Alors qu'aucune différence n'est enregistrée, pour les extraits de feuilles, entre la F4 issue de l'extrait acétate d'éthyle et l'acide gallique, entre la F 1 du même extrait et l'acide caféique, mais aussi entre la fraction 3 issue de l'extrait du chloroforme et l'acide caféique. Pour les graines, seules deux fractions issues de l'extrait aqueux acétate d'éthyle qui n'enregistre pas une différence significative notamment la F2 avec BHA et F3 avec la quercétine, respectivement ($P < 0,05$).

✓ la comparaison des résultats de l'évaluation de l'activité scavenging du monoxyde d'azote par les fractions des extraits actifs des feuilles et des graines à 100µg/ml à ceux des autres tests, nous a permis de signaler l'existence d'une divergence non seulement dans le comportement entre les fractions des extraits contre ce radical mais aussi dans la localisation des fractions actives qui change d'un extrait à un autre dans les deux parties de la plante.



(A)

(B)



(C)

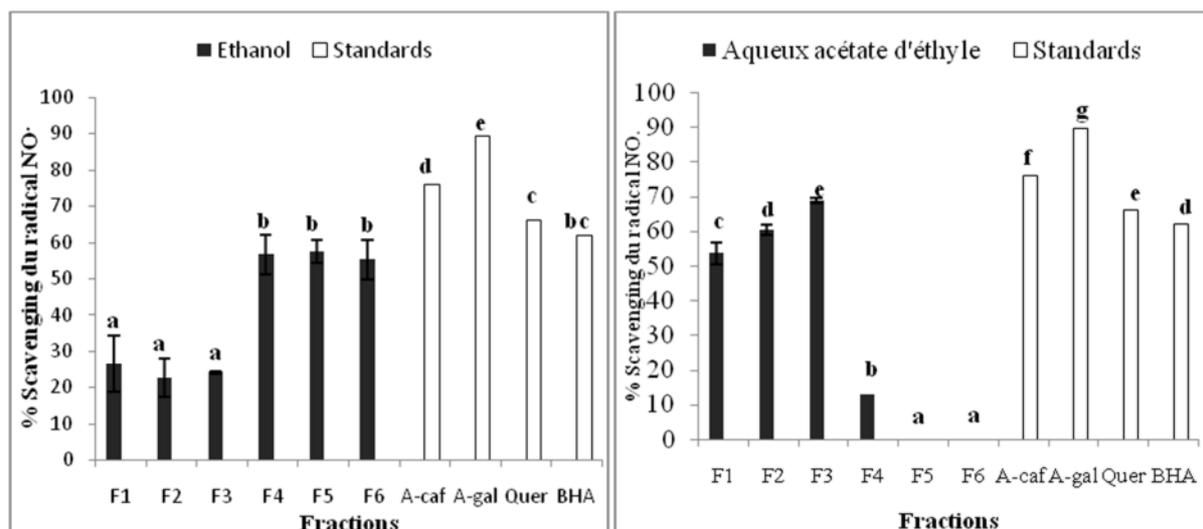
Figure N°50 : Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs; (A) éthanolique, (B) : acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, des feuilles de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. **F** : Fractions 1-6, **A- Caf** : Acide cafeïqie, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercetine.

Pour les feuilles, toutes les fractions de l'extrait brut et celles des deux extraits organiques ont exhibé de très bonnes activités contre le $\cdot\text{NO}$, cet effet peut être dû à la présence des composés de polarité variable dans les différentes fractions récupérées, par les systèmes d'élution de polarité croissante utilisés dans la séparation chromatographique des composés phénoliques de chaque extrait actif. Effectivement, la fraction F2 issue de l'extrait brut, avec un taux d'inhibition de $93,06 \pm 0,68\%$ a donné le taux le plus élevé par rapport aux autres fractions et standards testés et aussi par rapport à son extrait natif ($90,099 \pm 2,27\%$). Ce qui peut expliquer que l'activité de l'extrait brut n'est pas due à un effet synergique entre les composés contenus dans les fractions. La première fraction F1 éluee par le système le plus apolaire enregistre l'activité la plus faible ($72,62 \pm 2,20\%$) mais qui reste supérieure à celle des deux standard la quercetine et la BHA ($p < 0,05$).

Ces résultats sont différents de ce qui est obtenu au niveau des fractions issues de l'extrait du chloroforme où un puissant effet scavenger contre le $\cdot\text{NO}$ est localisé au niveau de la fraction F1 avec $81,64 \pm 0,51\%$, qui est supérieure à celui de toutes les autres fractions et les molécules de référence mis à part l'acide gallique ($p < 0,05$). Alors que, la plus faible activité est figurée dans la fraction F2 avec $69,62 \pm 3,47\%$ supérieure aux taux exhibés par la quercetine et la BHA ($p < 0,05$).

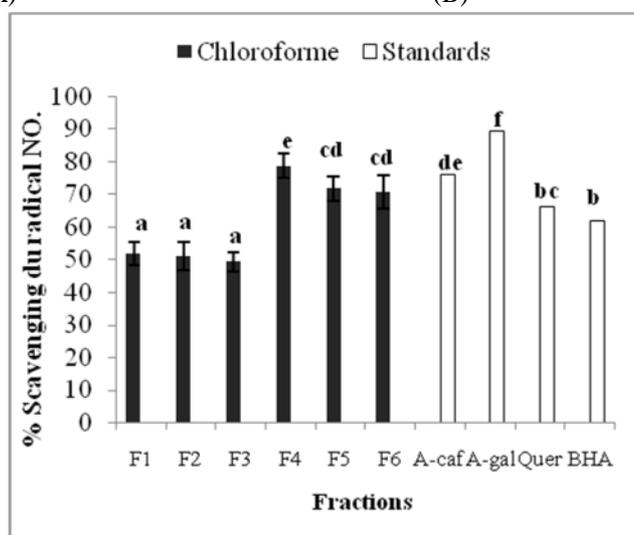
Encore une fois, les fractions issues de l'extrait acétate d'éthyle exposent un autre comportement vis-à-vis du radical, en effet, dans cet extrait, la fraction F4 à polarité moyenne éluee par un système incluant le méthanol, note l'effet scavenger le plus remarquable ($87,56 \pm 0,59\%$), similaire à celui de l'acide gallique, suivie par les deux fractions F2 et F3 qui se sont avérées également plus actives par rapport aux autres fractions et molécules de référence avec $82,02 \pm 2,67\%$ et $83,79 \pm 0,47\%$, respectivement. Par ailleurs, la fraction F6 la plus polaire (eau: acide acétique) avec un pourcentage d'inhibition de $32,38 \pm 2,37\%$, marque le taux le plus faible.

Pour ce qu'est de l'activité anti- $\cdot\text{NO}$ des fractions des extraits actifs des graines, il apparait selon la figure (N°51) qu'elles enregistrent de bonnes activités similaires à celles de leurs extraits correspondants et à celle les fractions des extraits actifs de feuilles.



(A)

(B)



(C)

Figure N°51: Effet anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs; (A) éthanolique, (B) : aqueux acétate d'éthyle, (C) : chloroforme, des graines de *Pistacia lentiscus* et certaines molécules de référence à 100 µg/ml. **F** : Fractions 1-6, **A- Caf** : Acide cafeique, **A-gal** : Acide gallique, **Quer** : Quercétine.

Selon les résultats obtenus (figure N°51), il existe une large diversité concernant le pouvoir antiradicalaire entre les fractions des extraits organiques et celles de l'extrait aqueux acétate d'éthyle, puisque au niveau des extraits organiques notamment, l'extrait brut et l'extrait du chloroforme, les pourcentages d'inhibition les plus élevés se localisent au niveau des trois dernières fractions de nature polaire alors que ceux de l'extrait aqueux se situent au niveau des trois premières fractions apolaires. Cette différence de comportement contre ce radical peut s'expliquer par la polarité des molécules responsables de cette activité où elles ont été récupérées par des systèmes polaires dans les extraits organiques et par des systèmes apolaires dans l'extrait aqueux.

Concernant l'extrait brut, on constate que l'ensemble des molécules de référence montre un effet scavenger de $\dot{\text{N}}\text{O}$ plus puissant que celui de toutes les fractions ($P < 0,05$), et sur six fractions récupérées, trois d'entre elles à caractère polaire ; F4, F5 et F6 exhibent des activités similaires ($56,57 \pm 5,46\%$, $57,40 \pm 3,13\%$ et $55,30 \pm 5,50\%$, respectivement), jugées plus élevées par rapport aux trois premières fractions (F1, F2 et F3), également caractérisées par des activités similaires ($p < 0,05$).

Le même profil de variation de l'activité entre les fractions d'extrait du chloroforme est noté (figure N°51C), où l'augmentation de la polarité est accompagnée par celle de l'activité scavenging de $\dot{\text{N}}\text{O}$. En outre, les trois dernières fractions exhibent des taux d'inhibition allant de 70,56% à 78,60% nettement supérieurs à celui de l'extrait natif ($56,96 \pm 8,04$) à $100 \mu\text{g/ml}$. Néanmoins, ces résultats appuient ceux obtenus en fonction de concentration de cet extrait dans la mesure où ces activités sont proches de celles obtenues dans l'intervalle de concentration (6,25 -12,5 et $25 \mu\text{g/ml}$). (page40). De ce fait on peut dire que le fractionnement a abouti à distinguer les fractions responsables de cette grande activité anti- $\dot{\text{N}}\text{O}$.

Pour ce qui est de l'activité des fractions issues du fractionnement de l'extrait aqueux acétate d'éthyle, on note qu'elle est proportionnelle à l'augmentation de la polarité au niveau des trois premières fractions apolaires enregistrant ainsi le taux le plus élevé par la fraction F3 avec $68,86 \pm 0,64\%$ proche de celui de son extrait natif ($70,64 \pm 2,06\%$). Alors que, cet effet est inversement proportionnel à la polarité au niveau des autres fractions les plus polaires qui exhibent de très faibles activités ($12,99 \pm 0,12\%$) pour la fraction F4, voire même nulles pour les deux autres fractions F5 et F6. La seule explication pour ce résultat peut être, que la quasi-totalité des molécules actives contre le $\dot{\text{N}}\text{O}$ présentes dans l'extrait aqueux acétate d'éthyle sont éluées par les trois premiers systèmes utilisés.

En résumé, il ressort de l'ensemble des résultats obtenus par les différents tests antioxydants des fractions chromatographiques des extraits actifs des graines et feuilles que plusieurs points à signaler :

✓ La localisation des fractions les plus actives au niveau des premières fractions éluées par les systèmes moins polaires pour tous les extraits actifs de graines et de feuilles avec une nette distinction entre ces deux parties de *P. lentiscus* dans les trois tests notamment le pouvoir réducteur, test anti-ABTS^{•+} et anti-O₂^{•-}, présume la nature des composés responsables de ces activités qui peuvent être soit des tannins condensés ou des flavonoïdes connus pour leur grande activité antioxydant ;

A l'inverse de ces résultats, ceux obtenus dans le test anti-•NO des fractions des extraits actifs des deux parties montrent que toutes les fractions se sont avérées actives contre ce radical avec une divergence dans la localisation des fractions les plus actives entre les extraits que ce soit dans ceux des feuilles ou ceux des graines, ce qui explique l'implication des composés phénoliques de polarité différente dans cette activité ;

✓ La variation dans l'activité antioxydant entre les molécules de référence et quelques fractions pourrait être interprétée, par la pureté des standards, ou par la présence d'une gamme de composés potentiellement actifs qui par un effet synergique entre ces constituants marquent des activités plus puissantes que celle des standards ;

✓ Il y'a lieu aussi d'ajouter que les fractions dont le potentiel antioxydant est faible comparativement à leurs extraits natifs, agissent en synergie. Alors que l'apparition des fractions plus actives que leurs extraits natifs explique la présence dans ces derniers du phénomène d'encombrement stérique qui masque le vrai effet des composés actifs sous l'effet de la concentration des molécules actives et inactives à la fois.

III.6. Caractérisation des fractions actives des extraits de *Pistacia lentiscus*

Après l'évaluation quantitative du contenu en composés phénoliques des extraits de cette plante par dosage des phénols totaux, flavonoïdes et tannins, une analyse qualitative des extraits et leurs fractions actives a été entreprise, en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM).

Étant donné que la combinaison des solvants induit une excellente reproductibilité des résultats et la distribution régulière des R_F (Males et al 1998), deux systèmes d'élution ont été utilisés :

- le système (A) : acétate d'éthyle, acide formique, acide acétique, eau, avec les rapports (100 :11 :11 :26, v/v/v/v) (Andriambelson et *al.* (1998)
- le système (B) : acétate d'éthyle, hexane, acide formique avec les rapports (50:45:5, v/v/v).

III.6. 1. Caractérisation des fractions actives des extraits des feuilles

III.6. 1. 1. La caractérisation de l'extrait éthanolique et de ses fractions actives

L'utilisation du système d'éluion (B) : hexane, acétate d'éthyle, acide formique en premier lieu nous a permis une séparation des composés de l'extrait éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus* et de ses fractions (figure N°52).

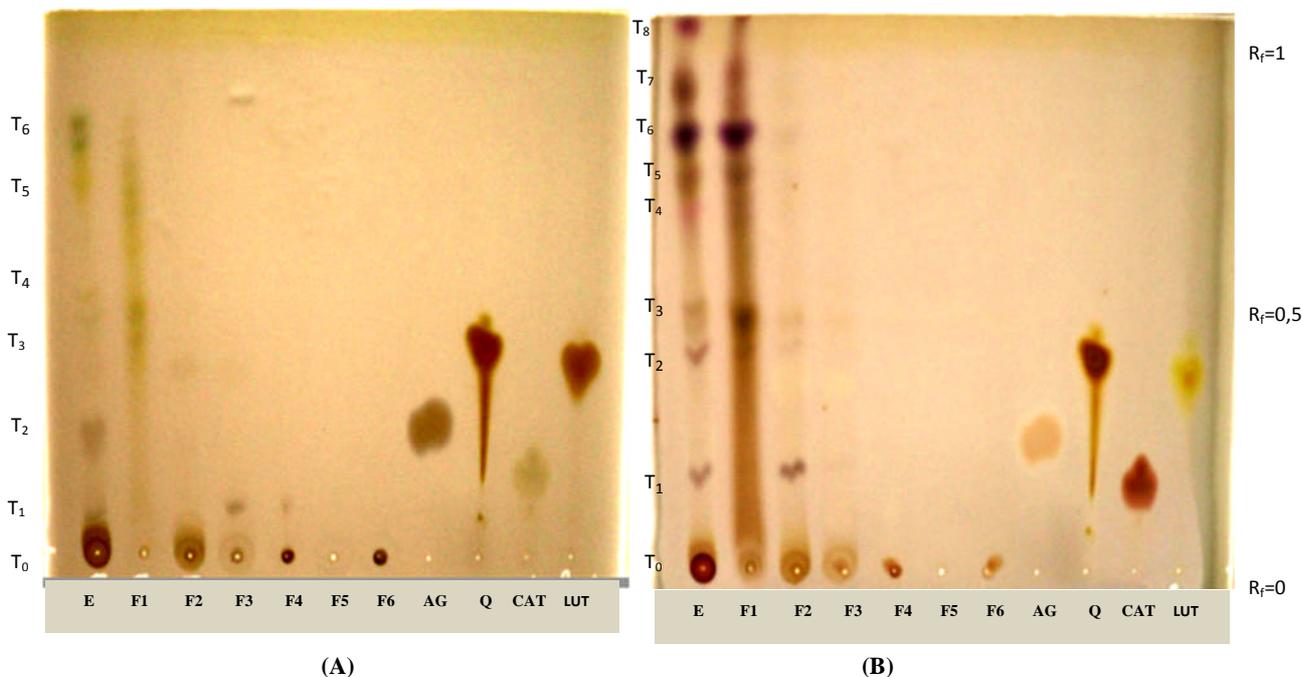


Figure N°52 : Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA -Hex - AF) **E** : Extrait éthanolique, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Lutéoline

La figure ci-dessus a révélé cinq sous-fractions visibles à la lumière du jour au niveau de l'extrait brut, de colorations bien distinctes, alors que presque aucune tache n'a été remarquée au niveau des fractions (F3-F6), cela peut être expliqué par la faible concentration de ses composés dans ces fractions. En effet, un sillon de coloration jaune-vert a été obtenu tout au long du trajet de migration dont deux sous fractions qui se distinguent par une coloration foncée, due probablement à la présence de flavonoïdes.

Par ailleurs, il a été observé au niveau de la fraction 3 uniquement l'apparition d'une tache dont la couleur est similaire à celle de l'acide gallique et dont le R_f est le même que celui de la sous fraction (T1) de l'extrait brut. De même, la sous fraction T2 de ce dernier partage le même R_f et la même couleur que celle de l'acide gallique laissant présager la présence de ce composé dans l'extrait brut. Une tache de coloration marron foncée n'ayant pas migré a été observée au niveau des chromatogrammes de l'extrait éthanolique et de ses fractions 2, 4 et 6. Ce qui en se référant à Meller-Harvey (2001), pourrait correspondre à un tannin condensé de poids moléculaire élevé.

La pulvérisation par la solution de la vanilline sulfurique a été préparée selon la méthode préconisée par Eloff et *al.* (2005), qui a permis de mettre en évidence d'autres sous fractions invisibles à la lumière du jour, ce révélateur à spectre large permet la détection des terpnoïdes, des dérivés de type phenylpropane et des phénols. Ce dernier est très utilisé par différents auteurs dans la révélation des composés phénoliques en développant plusieurs couleurs caractéristiques de chaque composé (Iwalokun et *al.*, 2007; Glavnik et *al.*, 2009; Tokoudagba et *al.*, 2010) .

La figure (N° 52B) révèle la présence d'une tache rouge foncée au niveau du dépôt de l'extrait brut de la même couleur que celle du standard catéchine, cela pourrait correspondre à des formes complexes de haut poids moléculaire de nature tannins condensés (Meller-Harvey, 2001; Tokoudagba et *al.*, 2010). La fraction 2 et l'extrait brut partagent une sous fraction (T1) bien séparée de coloration violette claire ayant le même $R_f = 0,18$, suggérant la présence des terpènes (Dohou et *al.*, 2003). De même, un tel spot (T2) est bien visible juste au niveau de l'extrait à un $R_f = 0,4$ mais de coloration très claire au niveau de la fraction 1 et 2, cela est dû probablement à la faible concentration de ce composé au sein de ces fractions.

Une teinte rose violacée claire est apparue à un R_f de 0,65 au niveau de l'extrait ethanologique seulement. De plus, une série de quatre sous fractions a été observée aussi bien dans l'extrait brut que dans la première fraction, dans le même ordre avec les mêmes intensités de colorations rose –violacée, dont la T6 montre la coloration la plus foncée ($R_f = 0,8$), qui selon Dohou et *al.* (2003) révélerait les composés de nature triterpénique.

Afin d'avoir plus de renseignement sur la nature des composés qui caractérisent cet extrait et ses fractions entre l'intervalle de R_f (0 et 0, 5), un autre système plus polaire a été appliqué. Les résultats des chromatogrammes ont été représentés dans la figure (N°53).

On remarque qu'il n'y a pratiquement pas de taches visibles au niveau des chromatogrammes observés à la lumière du jour, à l'exception de T1 présentant une coloration jaune claire et la T2 qui est partagée entre l'extrait et la fraction 1 (figure N°53a).

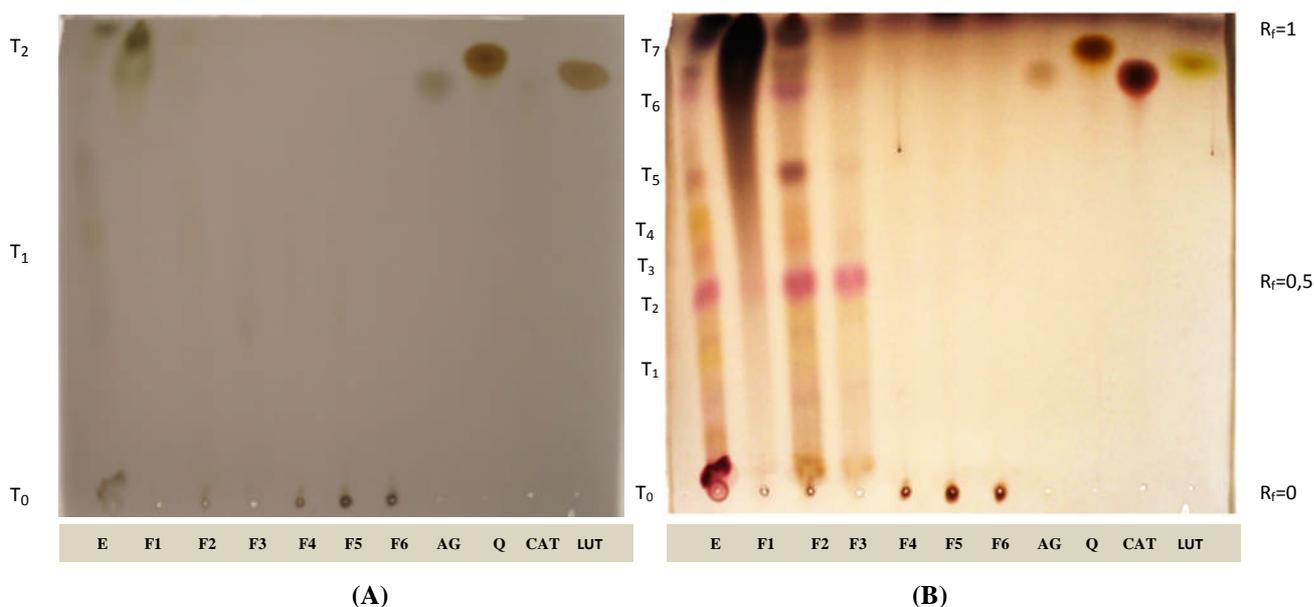


Figure N°53 : Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **E** : Extrait éthanolique, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catechine, **Lut** : Luteoline.

Selon La figure (N°53B), le traitement chimique de cette plaque par la pulvérisation avec la vanilline sulfurique a permis de visualiser un profil chromatographique similaire pour l'extrait éthanolique et ses fractions F2 et F3 avec des colorations claires pour cette dernière. En effet, une succession de spots sous forme d'un sillon de coloration jaune claire s'est étalée entre la sous fraction 0 et la sous fraction 1.

Au niveau des rapports frontaux de 0,4, et 0,5, deux sous fractions de coloration rose-violacée (foncée et claire respectivement) ont été déterminées, supposées correspondre à des terpènes (Dohou et al. (2003). L'extrait brut partage avec sa fraction 2 les sous T4 (jaune et $R_f = 0,57$), T5, T6 et T7 (violette foncée) ainsi que la tache T7 qui a exhibé une couleur similaire à celle de l'acide gallique et partageant avec ce dernier le même R_f (0,89). Ce composé a déjà été détecté par Topçu et al. (2007) au niveau des feuilles de *P. lentiscus*.

D'autre part, aucune migration n'a été révélée pour les autres fractions F4, F5 et F6, d'où l'apparition d'une tache de coloration rouge –marron foncée au niveau du dépôt de ces dernières, qui pourrait être expliquée par la condensation et la concentration des composés de haut poids moléculaires non séparés par ce système. Comme cela a été observé dans le résultat précédant (figure 53a), la T0 de l'extrait brut présente une coloration rouge similaire à celle de la catéchine, une récente étude réalisée par Glavnik et ses collaborateurs (2009) ont rapporté qu'une coloration rouge est obtenue suite à la réaction de la vanilline avec (+)-catéchine et (-)-epicatéchine, encore une fois cela témoignerait de la richesse de cet extrait en tannins condensés.

De ce qui précède, on peut dire que ces deux systèmes sont complémentaires étant donné que chacun a mis en évidence une gamme de composé de coloration et R_f différents, ce qui confirme la diversité des composés et la richesse de cet extrait et de ses fractions.

III.6. 1. 2. La caractérisation des extraits aqueux et de leurs fractions actives

Il a été rapporté par plusieurs études que le système (A) est le système adéquat pour la séparation des composés des extraits aqueux, vue sa polarité élevée, qui permet une meilleure séparation (Males et *al.*, 1998; Males et *al.*, 2006; Cieśla et *al.*, 2011; Dongmo et *al.*, 2011).

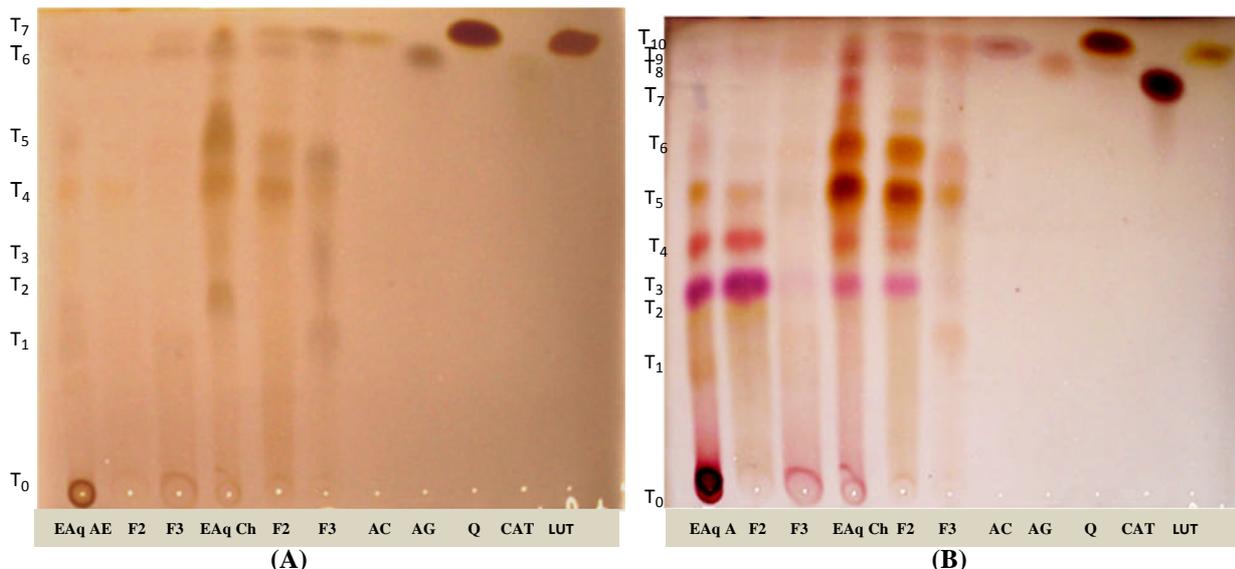


Figure N°54. Chromatogrammes des fractions des extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **EAq AE** : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, **F2** : Fractions 2 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, **F3** : Fractions 3 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, **EAqChl** : Extrait aqueux de chloroforme, **F2** : Fractions 2 de l'extrait aqueux de chloroforme, **F3** : Fractions 3 de l'extrait aqueux de chloroforme, **AC** : Acide caféique, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Lutéoline

L'observation à la lumière du jour des chromatogrammes des deux extraits aqueux et de leurs deux premières fractions (F2 et F3) a permis de détecter des profils chromatographiques presque identiques avec des colorations plus intenses pour l'extrait aqueux du chloroforme et ses fractions (figure N°54).

Selon la figure ci-dessus, toutes les sous fractions issues de la séparation ont acquis deux teintes ; grises et jaunes correspondantes essentiellement à l'acide gallique et aux flavonoïdes, respectivement. En effet, la tache T2 de l'extrait aqueux du chloroforme et les taches (T1, T3 et T5) de sa fraction F3 partagent uniquement la même coloration de l'acide gallique, alors que la tache T6 de l'extrait aqueux acétate d'éthyle, de l'extrait aqueux du chloroforme et de ses deux fractions F2 et F3 (étant plus claire), partagent la même couleur et le même rapport frontal que l'acide gallique.

Par ailleurs, la dernière sous fraction T7 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et de ses deux fractions F2 et F3, exhibent les mêmes caractéristiques chromatographiques que celle de l'acide caféique. De ce fait, il serait probable que l'acide caféique soit présent au niveau de cet extrait et de ses fractions.

En outre, une tache de couleur marron foncé au niveau du dépôt de l'extrait aqueux acétate d'éthyle a été détectée, indiquant la nature complexe des composés contenus dans cet extrait qui n'ont pas pu être élués par ce système. D'après Meller-Harvey (2001) ces composés pourraient être des tannins condensés. Effectivement, l'apparition d'une coloration rouge foncée similaire à celle de la catéchine au niveau de ce dépôt, suite à la pulvérisation avec la vanilline sulfurique confirmerait l'appartenance de ces composés à la famille des tannins condensés (Kandil et al., 2000; Glavnik et al., 2009). De même, cette observation a été remarquée au niveau des dépôts de la F3 issue de l'aqueux acétate d'éthyle et de l'extrait aqueux de chloroforme à des intensités plus faibles, suggérant ainsi la richesse de ces extraits et leurs fractions en tannins moins condensés et moins polymérisés, ce qui a facilité leur migration.

L'absence de cette coloration dans les autres dépôts expliquerait l'hydrolyse de ces composés en sous unités ayant un poids moléculaire réduit favorisant leurs migration. En fait, selon Andriambelson et ses collaborateurs (1998), ce système d'éluion permet la migration des composés issus de l'hydrolyse acide des formes complexes (tannins) suite, à l'action de l'acide acétique et de l'acide formique.

La comparaison des chromatogrammes (N°54a) et (N°54b), révèle la présence d'autres bandes après exposition à la vanilline sulfurique, une coloration jaunâtre a été détectée, en faveur de l'existence de flavonoïdes au niveau de la sous fraction T1 de l'extrait aqueux acétate d'éthyle (Males et al., 2006).

Par ailleurs, il est à noter que ce système a mis en évidence des profils chromatographiques similaires entre les deux extraits et leurs fractions, où les taches T2, T3 et T4 de colorations jaune, violette foncée et rouge respectivement sont retrouvées dans les deux extraits et les fractions F2, suggérant que ce système a séparé les mêmes composés qui correspondraient, à des terpènes (T3) (Dohou et al., 2003), à des flavonoïdes (T2) (Males et al., 2006) et à la catéchine (T4) (Kandil et al., 2000; Glavnik et al., 2009).

Seule la tache T5 de coloration jaune similaire à celle de la quercétine a été retrouvée en commun entre l'extrait aqueux acétate d'éthyle, sa deuxième fraction F2 (intensité est claire), l'aqueux du chloroforme et dans ses deux fractions. Le grand potentiel antioxydant exhibé par ces deux extraits aqueux et leurs fractions pourrait être attribué en partie à la présence des dérivés de ce composé retrouvé en T5.

La sous fraction T6 ($R_f=0,72$) de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle partage la même coloration que celle de l'acide gallique, alors que la T6 et T7 dans l'extrait aqueux du chloroforme et sa fraction 2 exhibent la même teinte que la molécule de la quercétine. Le reste des sous fractions exhibent la même coloration (T8, T9) et le même R_f (T8) que ceux de l'acide gallique. Un tel nombre de sous fractions de différentes colorations et de rapports frontaux détectées, témoigne de la richesse et de la diversité des composés des extraits aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* et de leurs fractions.

III.6. 1. 3. La caractérisation des extraits organiques (acétate d'éthyle, chloroforme) et leurs fractions actives

III.6. 1. 3.1. Extrait organique acétate d'éthyle et ses fractions actives

Les chromatogrammes observés à la lumière du jour pour l'extrait organique acétate d'éthyle et ses fractions dans le système (B), montrent une meilleure séparation surtout au niveau de l'extrait et les deux fractions F1 et F2, qui se sont scindés en taches distinctes.

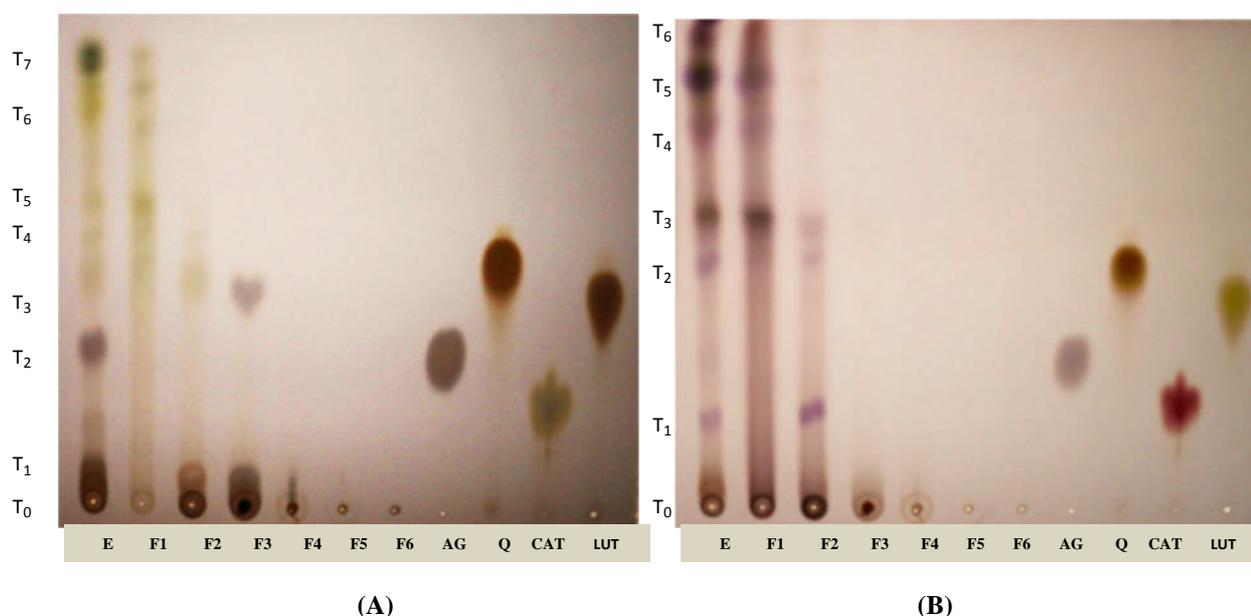


Figure N°55 : Chromatogrammes des fractions de l'extrait acétate d'éthyle de feuilles de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF). **E** : Extrait acétate d'éthyle **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Luteoline

En effet, le même profil chromatographique a été obtenu entre l'extrait acetate d'éthyle et sa première fraction excepté pour les deux sous fractions 1 et 2, qui sont présentes juste au niveau de l'extrait, caractérisées par une coloration grise similaire à celle de l'acide gallique. De même, cette couleur est mise en évidence dans les deux spots de la F3. Cependant, toutes les autres sous fractions en commun entre l'extrait et sa première fraction sont de couleur jaune-verdâtre. La tache T₀, présente dans l'extrait et ses fractions est supposée correspondre à des formes complexes de composés phénoliques de haut poids moléculaire qui n'ont pas pu être éluées par ce système.

La révélation avec la vanilline sulfurique de ces chromatogrammes a permis de mettre en évidence d'autres fractions non visibles à la lumière du jour qui apparaissent sous différentes couleurs. C'est le cas des deux taches T₁ et T₂ de l'extrait et de la fraction 2 ainsi que les trois sous fractions (4, 5 et 6) retrouvées uniquement au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et de sa première fraction, présentant une coloration violette à intensité variable. Cela expliquerait que ce système aurait séparé les mêmes composés de l'extrait et de ses fractions. La tache T₃ est partagée entre l'extrait et ses deux premières fractions 1 et 2 caractérisée par une coloration intense pour l'extrait et la fraction 1 et très claire pour la fraction 2. Cela pourrait être expliqué par la différence de concentration de ces composés dans cette dernière.

III.6.1. 3.2. Extrait organique de chloroforme et ses fractions actives

Concernant la séparation des composés de l'extrait organique du chloroforme et de ses fractions, un mélange de solvant (B) a été utilisé comme éluant étant donné que ce fut le meilleur système de séparation pour les extraits organiques par rapport au système A vue sa composition à base d'hexane et d'acétate d'éthyle.

Les résultats à la lumière du jour des chromatogrammes (figure N°56a) se résument à deux sillons de coloration jaune-verdatre localisés uniquement au niveau de l'extrait et de sa première fraction, avec des dépôts caractérisés par la présence de taches de coloration marron foncé qui n'ont pas migrés en raison de la complexité et du poids moléculaire élevé des composés concentrés au niveau de cette ligne du dépôt de l'extrait et de ses deux fraction F2 et F3.

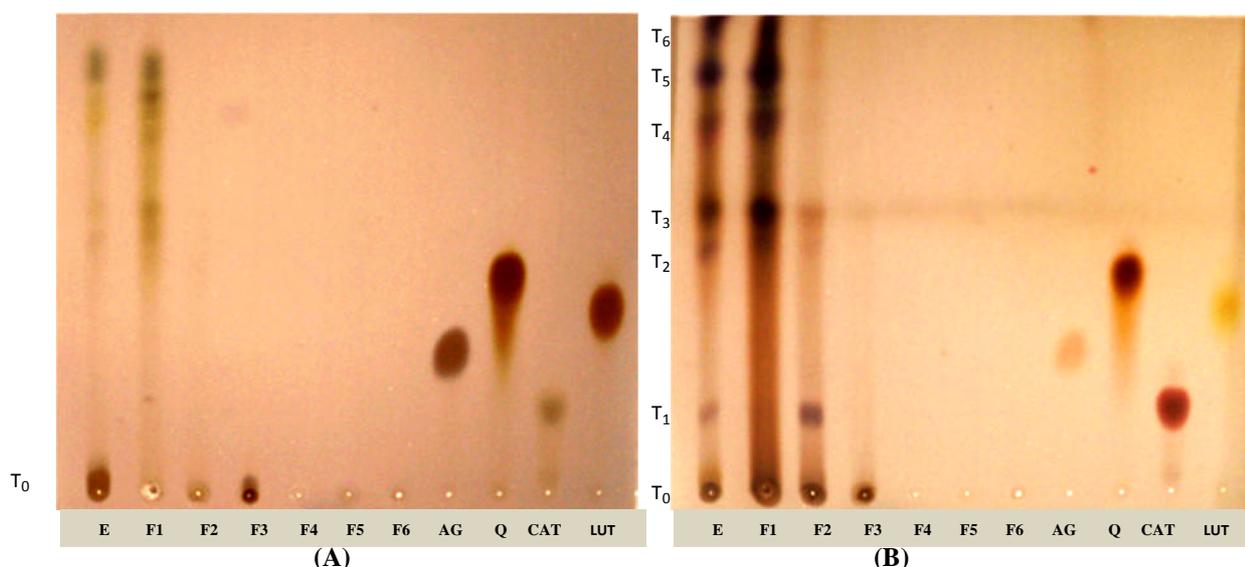


Figure N°56 Chromatogrammes des fractions de l'extrait organique du chloroforme de feuilles de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF). **E** : Extrait du chloroforme, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercetine, **Cat** : Catechine, **Lut** : Luteoline

La comparaison des chromatogrammes de la figure (55b) et (56b) des extraits organiques ont donné les mêmes taches non seulement dans le même ordre mais aussi dans la même coloration. Nous pouvons dire que ce système d'élution a séparé les mêmes composés et a mis en évidence la similitude du contenu moléculaire de ces deux extraits et de leurs fractions qui a été confirmée par la pulvérisation avec la vanilline sulfurique.

III.6.2. Caractérisation des fractions actives des extraits des graines

III.6. 2. 1. La caractérisation de l'extrait ethanologique et de ses fractions actives

La même procédure appliquée sur celui des feuilles a été entreprise pour la caractérisation des composés de l'extrait ethanologique des graines et de ses fractions actives.

Comme le montre clairement la figure (N°57a), aucune tache correspondante à une séparation de l'extrait brut et ses de fractions n'a été observée à la lumière du jour au niveau de cette plaque, cette observation a été rapidement contredite après pulvérisation avec la vanilline sulfurique, en effet, selon la figure (N°57b), une série de spots (SF1-9) a bien été séparée par ce système, de coloration violette, obtenue au niveau de l'extrait brut, où la sous fraction (T1) de R_f 0,17 est présente dans la fraction F2 et son extrait correspondant.

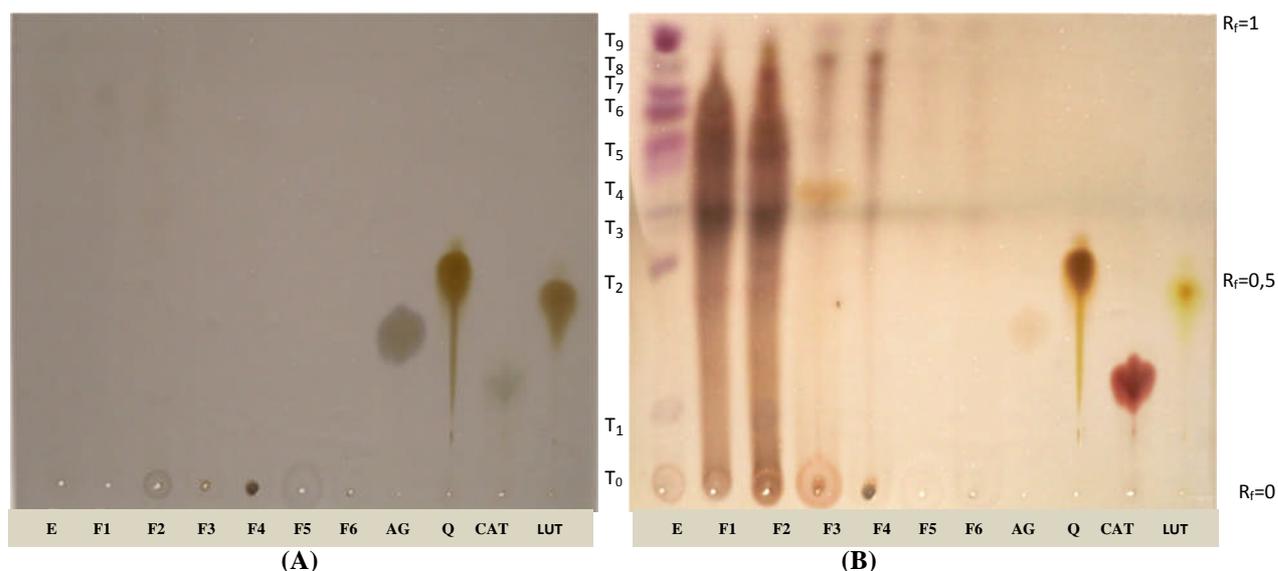


Figure N°57. Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de graines de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF). **E** : Extrait éthanolique, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Luteoline

De même une autre tache SF3 plus intense a été détectée dans les fractions F1 et F2 qui partage le même profil chromatographique que celui de leur extrait natif avec une moindre intensité. Toutes ces sous fractions de coloration violette correspondraient selon Dohou et collaborateurs (2003) à des terpènes.

Par ailleurs, l'apparition d'un sillon marron foncé tout au long du trajet de migration indique la richesse des fractions (F1 et F2) en oligomères de tannins condensés, présents également dans les fractions F3 et F4 mais à de faibles concentrations (Meller-Harvey, 2001). Une tache s'individualise aussi au niveau de la fraction F3 à une distance de R_f (0,61) qui pourrait correspondre à un flavonoïde autre que la quercétine et la de lutéoline en raison de la différence de l'intensité de la coloration jaunâtre et des rapports frontaux.

Le résultat obtenu de la plaque de CCM dans le système (A) (figure N°58), est similaire à celui obtenu en appliquant le système (B). En effet, l'observation à la lumière du jour dans le système aqueux n'a révélé aucune tache au niveau de l'extrait brut des graines et de ses fractions, cependant, la révélation avec la vanilline sulfurique a permis de mettre en évidence cinq sous fractions T0, T1, T2, T3 et T4

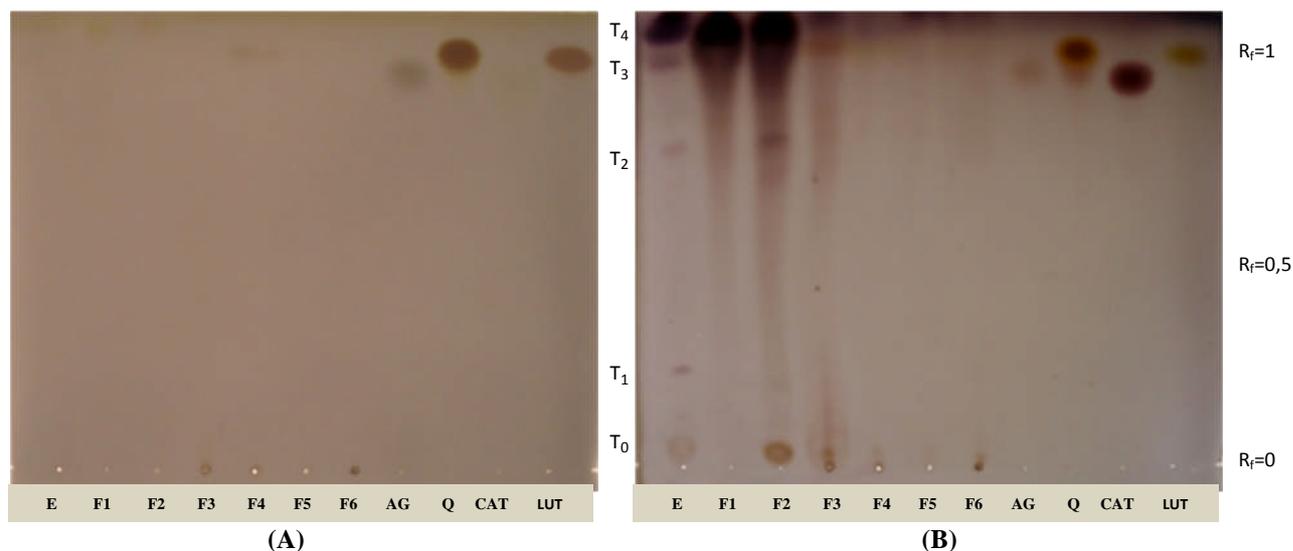


Figure N°58. Chromatogrammes des fractions de l'extrait éthanolique de graines de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **E** : Extrait éthanolique, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercetine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Luteoline

Les fractions F1 et F2 présentent le même profil de séparation sous forme d'un sillon de coloration marron-violacée foncé à l'exception d'une tache SF2 localisée au niveau de la fraction 2, cette dernière partage avec l'extrait la même intensité de coloration violette et le même ($R_f=0,7$). Deux autres sous fraction T1 ($R_f=0,21$) et T3($R_f=0,87$) de la même intensité de coloration sont localisées uniquement au niveau de l'extrait. La sous fraction T4 des F1 et F3 de teinte marron violacée foncé et partage le même $R_f=0,95$ que celle de l'extrait de coloration violette.

Il ya lieu aussi d'ajouter que comme le système (A), le système (B) a séparé la sous fraction jaune au niveau de la fraction 3 ave la même intensité mais de R_f différent, vu la différence de polarité des deux systèmes. En effet, cette sous fraction partage le même R_f que la quercetine et la lutéoline révélant ainsi l'appartenance de cette tache à l'un des dérivés de la quercetine ou de la lutéoline.

III.6. 2. 2. La caractérisation de l'extrait aqueux acétate d'éthyle et de ses fractions actives

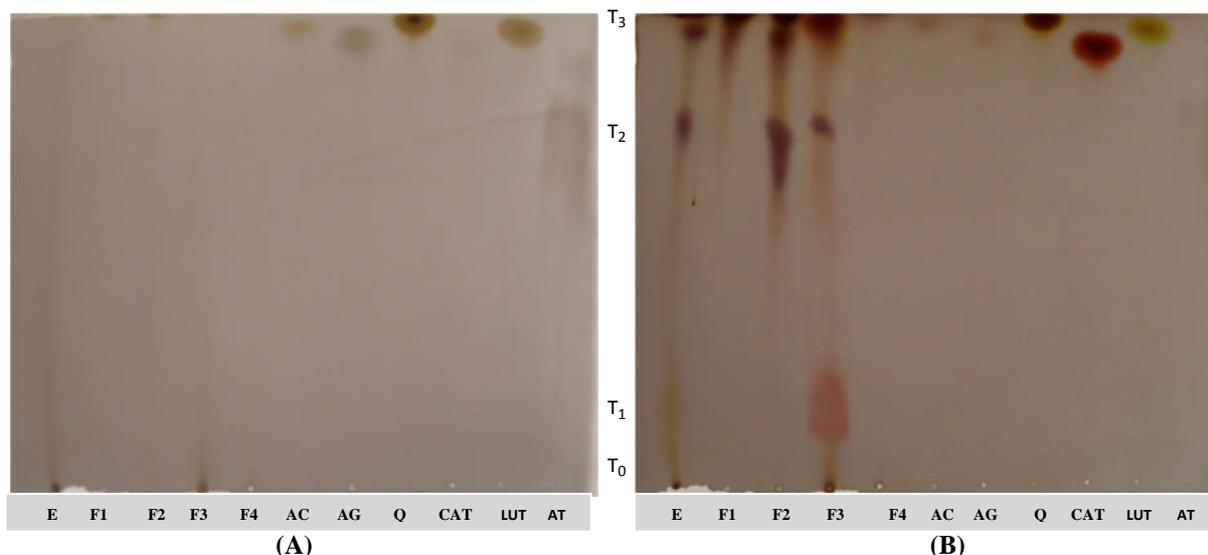


Figure N°59. Chromatogrammes des fractions de l'extrait aqueux acétate d'éthyle de graines de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **E** : Extrait aqueux acétate d'éthyle, **F** : Fractions 1-4, **AC** : Acide caféique, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Lutéoline, **AT** : Acide tannique.

L'application du système d'élution (A) sur l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des graines de *P.lentiscus* et de ses quatre fractions actives, a montré des résultats intéressants après la révélation avec la vanilline sulfurique, sachant qu'aucune tache n'a été détectée à la lumière du jour (figure N°59(a)). Les chromatogrammes (figure N°59(b)) ont révéler deux sous fractions de coloration violette, l'une étant (T₂), commune entre l'extrait aqueux acétate d'éthyle et les fractions F2 et F3 ayant un (R_f=0,75), l'autre étant (T₃) retrouvée uniquement entre la fraction F2 et son extrait correspondant (R_f=0,93).

Au niveau des dépôts de l'extrait et celui de sa troisième fraction, on observe l'apparition de taches de teinte marron foncé, n'ayant pas migrées, soupçonnées être des composés de nature complexe. Par ailleurs, la F3 s'individualise par une bande de quelques millimètres (R_f=0,19) de coloration rouge claire similaire à celle de la catéchine, probablement issue d'une hydrolyse acide suite à l'action de l'acide formique et de l'acide acétique contenus dans le système d'élution appliqué. En effet, selon Andriambelson et ses collaborateurs (1998), ce système de polarité importante permet une hydrolyse acide des composés complexes de haut poids moléculaire tel que les tannins, en sous unités facilitant ainsi leur migration.

Une troisième tache a été détectée au niveau de la F3, caractérisée par une coloration rouge similaire à celle de la catéchine ayant un R_f (0,97) proche de cette dernière mais similaire à celui de la quercétine. De ce fait, la nature de cette bande pourrait correspondre à un composé appartenant à l'un des dérivés de ces deux standards la quercétine ou la catéchine.

III.5. 2. 3. La caractérisation de l'extrait organique du chloroforme et de ses fractions actives

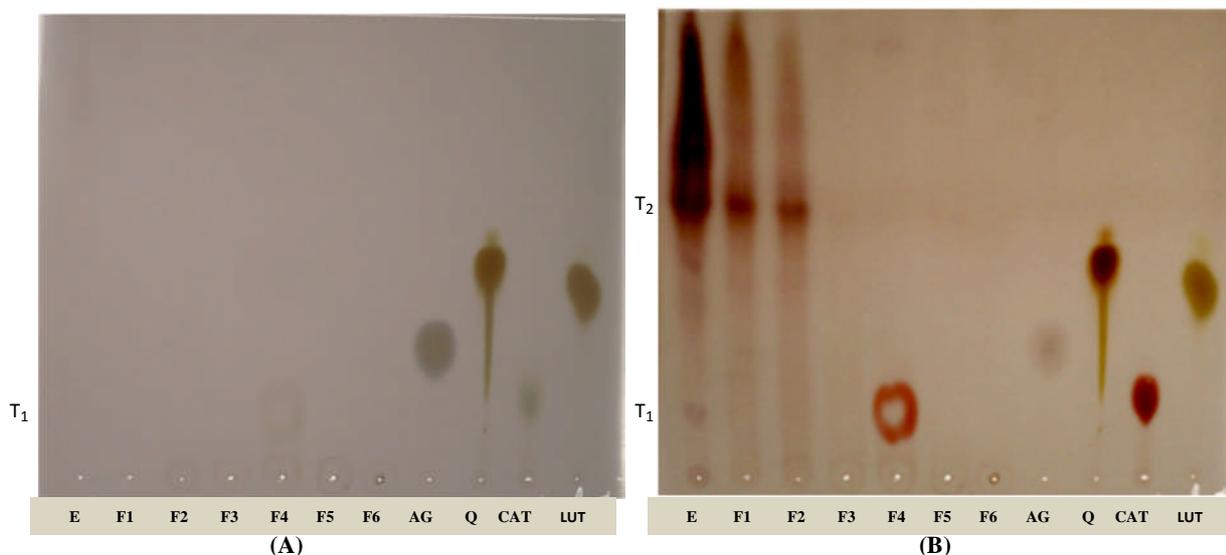


Figure N°60. Chromatogrammes des fractions de l'extrait organique du chloroforme de graines de *P. lentiscus* (A) : à la lumière du jour, (B) : révélés par la vanilline sulfurique, avec le système de séparation (EA- Hex- AF). **E** : Extrait organique du chloroforme, **F** : Fractions 1-6, **AG** : Acide gallique, **Q** : Quercétine, **Cat** : Catéchine, **Lut** : Lutéoline.

Selon la figure (N°60a), aucune séparation n'a été observée pour toutes les fractions et leur extrait natif n'est visible à la lumière du jour, à l'exception d'une seule tâche qui apparaît au niveau de la quatrième fraction ayant le même R_f (0,15) que celui de la catéchine. En effet, cette sous fraction, après révélation avec la vanilline sulfurique partage la même coloration que la catéchine (figure N°60b). D'ailleurs, il a été rapporté par Kandil et *al.*, 2000 et Glavnik et *al.*, 2009, que cette coloration est une caractéristique de la catéchine et de ses dérivés, suggérant de ce fait, que cette sous fraction appartiendrait à la famille des composés des dérivés de la catéchine.

Egalement en observant ces chromatogrammes, une sous fraction de coloration violette claire a été séparée par ce système uniquement au niveau de l'extrait, caractérisée par un rapport frontal de 0,14. Alors qu'une autre sous fraction a été révélée dans l'extrait et ses deux premières fractions dont la coloration jaune est plus intense au niveau de l'extrait, par référence à Males et *al.* (2006), cette dernière pourrait correspondre à l'un des dérivés de la quercétine.

D'après tous les résultats obtenus dans cette partie, plusieurs remarques sont importantes à relever :

- ✓ L'application des systèmes A et B dans la séparation des composés des extraits ethanologique des feuilles et des graines, ainsi que leurs fractions actives, a révélé une complémentarité dans les résultats des deux séparations, en détectant un nombre élevé de sous fractions de colorations différentes qui confirme la richesse de cette plante en métabolites secondaires comme cela a été rapporté dans la partie bibliographique.
- ✓ Concernant les extraits organiques ainsi que leurs fractions, on peut conclure d'une part, que le système adéquat pour la séparation est celui à base d'acétate d'éthyle, hexane et acide formique, vu la meilleure séparation obtenue au niveau de toutes les plaques CCM par rapport à celle obtenue avec le système A (résultats non représentés dans cette partie). D'autre part, le système B a pratiquement séparé les mêmes composés dans le même ordre avec la même intensité de coloration au niveau de tous les extraits et de leurs premières fractions (figures N° 521b, 455b et 56b).
- ✓ L'absence de sous fractions au niveau des dernières fractions issues de tous les extraits, caractérisés par CCM dans cette étude, n'affirme pas la pauvreté de ces fractions en composés actifs vu le potentiel antioxydant qu'elles ont exhibé, cela pourrait être expliqué d'une part, par le fait que le comportement des fractions n'est pas différent de celui des extraits. De ce fait, l'application des autres systèmes de séparation permettraient d'avoir des profils chromatographiques et de révéler d'autres molécules qui n'ont pas été séparées par les systèmes A et B. D'autre part, l'utilisation d'autres révélateurs que la vanilline pourrait révéler la présence de molécules non détectées par cette dernière à cause de leur structure. En effet, il a été rapporté par plusieurs auteurs que ce révélateur réagit avec la position 6 et 8 des flavonoïdes (catéchine), proanthocyanidines...etc qui sont activées par la présence des groupements OH et l'engagement de ces groupement dans la polymérisation induit la non réaction avec la vanilline (Riberau-Gayon, 1968; Tomaino et *al.*, 2010)

Cette gamme de spots mise en évidence par l'analyse chromatographique (CCM), appliquée sur les extraits et fractions des feuilles et des graines de *P.lentiscus*, nous laisse supposer l'implication de ces composés dans les diverses activités biologiques rapportées dans la littérature, et appuie son utilisation en médecine traditionnelle.



IV- Conclusion et perspectives

La diversité des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager l'ampleur de ce qui reste à découvrir. En effet, la nature nous offre un clavier de molécules originales a priori infini, on considère que jusqu'à ce jour, moins de 10% des espèces végétales qui occupent la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques.

Cette étude réalisée avait pour objectifs d'une part le dosage des composés phénoliques présents dans les extraits des feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus* et l'évaluation de leurs pouvoirs antioxydant ainsi que celui des fractions issues des extraits actifs. D'autre part, la caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM) des fractions actives.

Les résultats obtenus des dosages quantitatifs des composés phénoliques des feuilles et des graines de *P. lentiscus* indiquent la richesse des feuilles en composés phénoliques comparativement aux graines avec une répartition hétérogène de ces composés entre les solvants d'extraction utilisés. En effet, les extraits éthanolique et aqueux du chloroforme des feuilles semblent être plus riches en substances actives (phénols totaux et flavonoïdes), à l'exception des tannins qui marquent des teneurs élevées dans les extraits organiques acétate d'éthyle et chloroforme. De même, les extraits de graines exhibent des teneurs élevées en tannins avec 192,20 et 139,37mg EqAT/g par les d'extraits brut et chloroforme, respectivement, alors que, tous les autres extraits exhibent des teneurs très faibles en phénols totaux et flavonoïdes. Ces résultats peuvent confirmer que *Pistacia lentiscus* est riche en différentes classes de composés phénoliques de polarité variable.

L'estimation du pouvoir réducteur des extraits des feuilles et des graines de *Pistacia lentiscus*, par la méthode FRAP, a montré une faible activité réductrice de tous les extraits des fruits par rapport à ceux des feuilles qui ont manifesté un très grand pouvoir réducteur, essentiellement les phases aqueuses.

Le suivi de la cinétique, pendant 6 minutes, de l'effet scavenger des extraits de *Pistacia lentiscus* contre le radical cationique ABTS^{•+}, révèle une stabilité de l'absorbance de l'ABTS^{•+} de tous les extraits de feuilles et des standards à l'exception de la quercétine, la catéchine et les extraits de graines après la première minute de réaction.

Ainsi, les deux standards cités exhibent des activités de 96,50% et 95,93%, respectivement plus élevées que celles de tous les extraits, dont les meilleurs ont été les extraits ethanologique et les deux extraits aqueux des feuilles. Ces derniers ont enregistré, à 100µg/ml, des activités similaires qui dépassent les 90% et 181,74 mmol trolox/g d'extrait en terme de TEAC, manifestant de ce fait les IC₅₀ les plus faibles (<5µg/ml). Les extraits des graines quant à eux enregistrent de faibles activités dont la plus forte est de 46,58% ou 10,74 mmol trolox/g d'extrait exhibée par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle.

De même, les extraits aqueux des feuilles ont exhibé les activités les plus élevées contre l'anion superoxyde avec des IC₅₀ de 37,99 et 114,84 µg/ml. À une concentration de 100µg/ml, l'extrait aqueux d'éthyle acétate a révélé un effet scavenger de 64,86 %, largement supérieur à celui de l'acide caféique (50,59%) et l'acide ascorbique (40,09%). L'extrait aqueux du chloroforme, pour sa part, a démontré une activité avoisinant les molécules de références avec 44,50%. Alors que, des résultats négatifs ont été obtenus par tous les extraits des graines.

Quant à l'évaluation de l'activité scavenging de monoxyde d'azote les extraits de graines ont montré d'excellents résultats à 100µg/ml dont les taux d'inhibition allant de 56,96 % à 80%. Ainsi, l'extrait aqueux acétate d'éthyle et l'extrait ethanologique manifestent les IC₅₀ les plus faibles (1,56 et 2,42 µg/ml), respectivement par rapport à celles de toutes les molécules de référence ainsi que celles de tous les extraits des feuilles. Ces derniers exhibent également des activités scavenging élevées dont les meilleures sont représentées par les extraits organiques de chloroforme et d'acétate d'éthyle, avec des valeurs des IC₅₀ de 2,71 et 4,40µg/ml, respectivement.

Les résultats obtenus des différents tests antioxydants (à 100µg/ml), des fractions chromatographiques sur colonne des extraits actifs des graines et feuilles, ont révélé que les molécules actives responsables de l'activité réductrice, d'effet anti ABTS^{•+} sont localisées au niveau des deux premières fractions F1 et F2 pour l'extrait ethanologique et au niveau des F2 et F3 pour les extraits aqueux avec une nette distinction entre les activités des graines et des feuilles en faveur de ces dernières.

D'autres part, ces fractions issues des extraits actifs des feuilles ont exhibé un effet pro-oxydant contre l'anion superoxyde. De très bonnes activités scavenging de monoxyde d'azote ont été enregistrées pour toutes les fractions de chaque extrait fractionné, excepté les deux dernières fractions F5 et F6 issues de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles avec des taux d'inhibition de l'ordre de 32% et celles de l'aqueux d'acétate d'éthyle des graines qui n'ont exhibé aucune activité.

Le criblage par CCM de toutes ces fractions actives a permis de visualiser différents spots de coloration et R_f variables en utilisant les deux systèmes d'élution à polarités différentes. Ces résultats ont été appuyés par la révélation avec la vanilline sulfurique d'où l'apparition de plusieurs taches ayant partagé les mêmes profils chromatographiques que ceux des molécules de référence utilisées, notamment l'acide gallique, l'acide caféique, la catéchine, la quercétine et la luteoline, témoignant de ce fait la richesse des extraits de cette plante en métabolites secondaires dont les composés phénoliques et les terpènes qui sont à l'origine de diverses activités biologiques précédemment rapportées par les études scientifiques.

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude n'est qu'une étape préliminaire dans la recherche des molécules bioactives de *Pistacia lentiscus*, ainsi plusieurs perspectives découlent au terme de ce travail en vue d'une application expérimentale complémentaire sur les extraits de cette plante :

- Détermination des concentrations minimales d'inhibitions (IC_{50}) des fractions actives par les méthodes appliquées dans cette étude.
- Isolement et identification des substances actives dans ces fractions, par des techniques plus performantes (HPLC, RMN.... etc).
- Evaluation de l'activité antioxydant *in vitro* par d'autre tests complémentaires tels que l'activité scavenging de l'anion superoxyde généré par un complexe enzymatique(la xanthine oxydase), le test de peroxyde ONOO⁻, HOCL, ¹O₂, mais aussi il est intéressant de tester l'activité chélatrice des métaux (Fer, cuivre...etc).
- Evaluation de l'activité biologique *in vivo* des extraits de cette plante sur des animaux présentant des pathologies inflammatoires, diabétiques....etc et de vérifier également l'absence d'effets cytotoxiques.



V- Références bibliographiques

- 📖 Adamczyk, B.; Kitunen, V. and Smolander, A. (2008). Protein precipitation by tannins in soil organic horizon and vegetation in relation to tree species. *Biol Fertil Soils*, 45: 55–64.
- 📖 Adams D.O. and Harbertson J.F. (1999). Evolution of skin and seed tannins in pinot noir berries during ripening: Application of a simple assay to a difficult problem. In “2nd Joint Burgundy-Californi-Oregon Winemaking symposium”. *UCDavis Cooperative Extension*, 8-9: 26-29
- 📖 Abdelwahed, A.; Bouhleb, I.; Skamdrani, I.; Valenti, K.; Kadri, M.; Guirand, P.; Steiman, R.; Mariotte, A. M.; Gherdia, K.; Laporte, F.; Dijoux, F.; Ranca, M. G.; and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia Lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter.* 165:1-13.
- 📖 Abreu, P.; Matthew, S.; Gonzalez, T.; Costa, D. ; Segundo, M. A. and Fernandes, E. (2006). Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*. *Life Sciences*, 78: 1578 - 1585
- 📖 Abu Bakar, M. F.; Mohamed, M.; Rahmat, A. and Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113: 479–483.
- 📖 Afonso, V.; Lomri, A. ; Champy, R.; Mitrovic, D. and Collin, P. (2007). Radicaux libres dérivés de l’oxygène et superoxyde dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue de Rhumatisme*, 74: 636-643.
- 📖 Ahmad, N.S.; Farman, M.; Najmi, M.H.; Mian, K.B and Hasan, A. (2008). Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 478-482.
- 📖 Ahmadi Afzadi, M.; Sayed Tabatabaei, B.A.; AbolghasemMohammadi, S.; Tajabadipur, A. (2007). Comparison of genetic diversity in species and cultivars of pistachio (*Pistacia* sp. L.) based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5(3): 147-153
- 📖 Aksoy, A.; Duran, N.; Koksall, F. (2006). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial effects of mastic chewing gum against *Streptococcus mutans* and *mutans streptococci*. *Archives of Oral Biology*, 51: 476-481.
- 📖 Alisi, C.S. et Onyeze, G.O.C. (2008). Nitric oxide scavenging ability of ethyl acetate fraction of methanolic leaf extracts of *Chromolaena odorata* (Linn.). *African Journal of Biochemistry Research*, 2 (7):145-150.
- 📖 AL-Saghir M-G. (2006). Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae). Blacksburg, Virginia. *Thèse de doctorat*, p:37
- 📖 AL-Saghir, M. G. (2010). Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L.(Anacardiaceae) based on morphological data. *Asia Journal of Plant Sciences*, 9(1): 28-35.
- 📖 Alvarez, R. ; Encina, A.; Perez Hidalgo, N.(2008). *Pistacia terebinthus* L. leaflets: an anatomical study. *Plant Systematics and Evolutio*, 272: 107-118.

- Amhamdi, H.; Aouinti, F.; Wathelet, J.P.; and Elbachiri, A. (2009). Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec. Nat. Prod.* 3(2): 90- 95.
- Ammar, H.; Lopez, S. and Gonzalez, J.S. (2005). Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 323–331
- Andriambelson, E.; Magnier, C.; Hann-Archipoff, G.; Lebostien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J.C. and Andriansitohaina, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The journal of nutrition*, 128: 2324-2333.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; McDonald, S. and Robards, K. (2001). Metsu for testicule antioxydant activité. *Theo Analyste*, 127: 183-198.
- Ao, C.; Li, A.; Elzaawely, A.A.; Xuan, T.D.; Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. *Food Control*, 19 :940–948
- Aquilano, K.; Baldelli, S.; Rotilio, G. and Ciriolo, M.R. (2008). Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochem Res*, 33: 2416–2426.
- Ardanaz, N. and Pagano, P.J. (2006) Hydrogen Peroxide as a Paracrine Vascular Mediator: Regulation and Signaling Leading to Dysfunction. *Experimental Biology and Medicine*, 237-251
- Arumugam P.; Ramamurthy P.; Santhiya S-T. and Ramesh A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn: An analysis by ABTS⁺ decolorization assay. *Asia Pac J Clin Nutr.* 119-124.
- Assimopoulou, A.N. ; Zlatanov, S.N. and Papageorgiou, V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, 92: 721–727
- Atmani, D.; Chaher, N.; Barboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H. ; Debbache, N.; Atmani, D. (2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112: 303-309.
- Ba, K.; Tine, E.; Destain, J.; Cissé, J. and Thonart, P. (2010). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1): 131-139
- Baba-Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles, *Flore d'Algerie et du Maghreb*, p: 1-218,.
- Badami, S.; Kumar Gupta, M. and Suresh, B. (2003). Antioxidant activity of the ethanolic extract of *Striga orobanchioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 227–230
- Badami, S.; Prakash, O.; Dongre, S.H. and Suresh, B. (2005). *In vitro*, antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. *Indian Journal Pharmacol*, 37(4):251-252.

- 📖 Bahramikia, S. and Yazdanparast, R. (2010). Antioxidant Efficacy of *Nasturtium officinale* Extracts Using Various In Vitro Assay Systems. *J Acupunct Meridian Stud*, 3(4): 283–290
- 📖 Balana, K.V. ; Prince, J. ; Hana, Z. ; Dimas, K. ; Cladaras, M. ; Wyche , J.H. ; Sitaras, N.M. and Pantazis, P. (2007) .Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phytomedicine*, 14: 263–272.
- 📖 Balasundram, N.; Sundram, K and Sammam, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products, antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99: 191-203.
- 📖 Barazani,O.; Dudai, N.; And Golan-Goldhirsh, A. (2003) . Comparison Of Mediterranean *Pistacia Lentiscus* Genotypes By Random Amplified Polymorphic Dna, Chemical, And Morphological Analyses. *Journal Of Chemical Ecology*, 29(8) :1939-1952
- 📖 Barazani, O and Golan-Goldhirsh , A. (2009) . Salt-driven interactions between *Pistacia lentiscus* and *Salsola inermis*. *Environ. Sci. Pollu.t Re.s* 16:855–861
- 📖 Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Science*, 22(3): 266-272.
- 📖 Barrajon-Catalán, E.; Fernández-Arroyo, S.; Saura, D.; Guillén, E.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A.; Micol, V. (2010). *Cistaceae* aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, (48): 2273–2282.
- 📖 Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, 2 (1) 43-52
- 📖 Bayer, E. ; Buttler, K.P. ; Finkensteller, X. and Grau, J. (1987). Guide de la flore méditerranéenne , caractéristiques, habitat, distribution et particularité de 536 espèces. *La Martinière Groupe*, p: 94
- 📖 Beaudoux, J-L.; Delattre, J.; Therond, P.; Bonnefont-Rousselot, D.; Legrand, A. and Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie specialise*, 21: 144-150
- 📖 Belhadj, S. (2002). Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation . *Centre Universitaire de Djelfa*, 107-109
- 📖 Benhammou, N.; Bekkara, F.A and Panovska, T.K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 22-28.
- 📖 Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol. Med.* 13 (2):184-196.
- 📖 Ben Sghaiera, M.; Boubakera, J.; Skandrani, I.; Bouhlel, I.; Limema, I.; Ghediraa, K. and Chekir-Ghedirab, L. (2011). Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31: 220–232.

- 📖 Berboucha, M.; Ayouni, K.; Atmani, D.; Atmani, D.; and Benboubetra, M. (2010). Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Food*, 13 (4): 1–9.
- 📖 Berger, M. M. (2006). Manipulation nutritionnelle du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- 📖 Berry, C.E. and Hare, J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implication. *Journal Physiology*, 555(3): 589-606.
- 📖 Bhourri, W.; Derbel, S.; Skandrani, I.; Boubaker, J.; Bouhlef, I.; B. Sghaier, M.; Kilani, S.; Mariotte, A. M.; Dijoux-Franca, M. G.; Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*, 24: 509–515
- 📖 Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.
- 📖 Book, B. (2008). *Pistacia lentiscus* L. Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. 4 :02.
- 📖 Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation*, p : 1120.
- 📖 Bucic´-Kojic´, A.; Planinic´, M.; Tomas, S.; Bilic, M.; Velic, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81: 236–242.
- 📖 Cacace, J. E. et Mazza, G. (2001). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*, 12: 1-15.
- 📖 Cai, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.
- 📖 Carloni, P., Greci, L.; Maurelli, E.; Stipa, P. and Wozniak, M. (1993). The role of oxygen in the reduction of tetrazolium salts with NADH mediated by 5-methyl phenazonium methyl sulfate. AN EPR and voltammetric study. *Res. Chem. Intermed.*, 19(7): 643-656 .
- 📖 Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A. and Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113 :859–871
- 📖 Castola, V.; Bighelli, A. and Casanova, J. (2000). Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 79–88
- 📖 Celik, S.E.; Özyürek, M.; Güclü, K. and Apak, A. (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81 : 1300–1309.

- 📖 Chaing, H.S.; Juilo, Y. and Lu, F. J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila Spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61-71.
- 📖 Charef, M.; Yousfi, M.; Saidi, M. and Stocker, P. (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc.* 85:921–924.
- 📖 Cheeseman, K.; and Slater, H. (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49: 481-493.
- 📖 Chen, H.Y. and Yen, G.C. (2007). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, 101: 686–694.
- 📖 Chethan, S. and Malleshi, N.G.(2007). Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chemistry*, 105 : 862–870
- 📖 Chevallier, A. (1997). Encyclopédie des plantes médicinales. *Larousse- Bordas*, P :1-51
- 📖 Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 223–229.
- 📖 Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C and Teissèdre, P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6: 75–82.
- 📖 Chisté, R.C.; Mercadante, A.Z.; Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J.L.F.C.and Bragagnolo, N. (2011). In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127 : 419–426
- 📖 Chvatalova, K.; Slaninova, I.; Brezinova, L. and Slanina, J.R. (2008). Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. *Food Chemistry*, 106 : 650–660.
- 📖 Cieśla, L.; Staszek, D.; Hajnos, M.; Kowalska, T. And Waksmundzka-Hajnos, M.(2011). Development of Chromatographic and Free Radical Scavenging Activity Fingerprints by Thin-layer Chromatography for Selected *Salvia* Species. *Phytochem. Anal.* 22: 59–65
- 📖 Ciftci, H.; Ozkaya, A. et Kariptas, E.(2009). Determination of fatty acids, vitamins and trace éléments in *Pistacia terebinthus* coffee. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7:72 - 74.
- 📖 Cillard, J et Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*. 13(1) : 24-29.
- 📖 Cortina, J.; Green J.J.; Baddeley, J.A. and Watson, C.A. (2008). Root morphology and water transport of *Pistacia lentiscus* seedlings under contrasting water supply: A test of the pipe stem theory. *Environmental and Experimental Botany*, 62:343–350.
- 📖 Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Vlietink, A.J and Berghe, D.V. (1998). Structure- activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavenger. *J.Nat.Prod.* 61: 71-76.
- 📖 Cseke, J.L.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P.B.; Warber, S.; Duke, J.A. and Briemann, H.L. (2006). Natural Products from Plants. *Taylor & Francis Group. 2nd ed. New York.* Pp 286-299;

- 📖 Cui, J.; Hu, W.; Cai, Z.; Liu, Y.; Li, S.; Tao, W. and Xiang, H. (2010). New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 95: 166–172.
- 📖 Curty, J. P. and Robin, J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. *Nutritherapie Info*. 1-4.
- 📖 Daferera, D.; Pappas, C.; Tarantilis, P.A. and Polissiou, M. (2002). Quantitative analysis of α -pinene and β -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 77: 511-515.
- 📖 D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. and Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, 43(4): 348-361.
- 📖 Da Silva, S.L.; da Silva, A.; Honoria, K.M.; Marangori, M.H.; Toyama, M.H. and da Silva, A.B.F. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure*, 684: 1-7.
- 📖 Dean, J.R. (1998). Extraction Methods for Environmental Analysis. *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*, p: 106-123.
- 📖 Dedoussis, G. V.Z.; Kaliora, A. C. Psarras, S.; Chiou, N.; Mylona, N.; Papadopoulos, N. G.; Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174: 293–303.
- 📖 Delattre, J.; Durand G. and Jardillier J.C. (2003). Biochimie pathologique, Aspect moléculaire et cellulaire. Médecine -sciences. *Flammarion*, p :59-81.
- 📖 Delille, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. *Berti*. p :147-148.
- 📖 Devasagayam, T.P.A.; Tilak, J.C.; Bloor, K.K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S. and Lele, R.D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI*, 52: 794-804.
- 📖 De Vos, P. (2010). European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. *Journal of Ethnopharmacology*, 132 : 28–47.
- 📖 Djeridane, A.; Yousfi, M.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Journal of Food Chemistry*, 97: 654-660.
- 📖 Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J-F. and Stocker P. (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, 224: 801–809
- 📖 Dogan, Y.; Baslar, S.; Aydin, A. and Mert, A.H. (2003). A Study Of The Soil-Plant Interactions Of *Pistacia Lentiscus* L. Distributed In The Western Anatolian Part Of Turkey. *Acta Bot. Croat.* 62 (2), 73–88,
- 📖 Dongmo, A.B.; Azebaze, A.G.B.; Donfack, F.M.; Dimo, T.; Nkeng-Efouet P.A.; Devkota K.P.; Sontia B.; Wagner H.; Sewald, N. and Vierlin, W. (2011). Pentacyclic triterpenoids and

ceramide mediate the vasorelaxant activity of *Vitex cienkowskii* via involvement of NO/cGMP pathway in isolated rat aortic rings. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 204–212

📖 Dohou, N.; Yamni, k.; Tahrouch, S.; Idrissi hassani, L. M.; Badoc, A.; and Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61-78.

📖 Duenas,M.; González-Manzano, S.; González-Paramás,A. and Santos-Buelga,C. (2010) .Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 443-449.

📖 Du, G.; Li,M.; Ma, F. and Liang, D. (2009) .Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits. *Food Chemistry*, 113: 557–562.

📖 Duru , M.E.; Cakir , A.; Kordali , S.; Zengin , H. ; Harmandar , M. ; Izumi , S. and Hirata, T. (2003). Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. *Fitoterapia*, 74: 170–176.

📖 Kavak D.D.; Altıok E.; Bayraktar, O.; Ülkü S. (2010). *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64 : 167–171.

📖 Eckert, R.; Randall, D., Burggren, W., French, K., Math, F., Propper, A. et Henquell, L. (1999). Physiologie animale. *Edition De BOECK*, p :840.

📖 Eddouks, M.; Ouahidi, M.L.; Farid, O.; Moufid, A.; Khalidi, A. and Lemhadri, A. (2007). L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5: 194–203.

📖 Edmund deAzevedo Pribitkin, M.D. and Gregory Boger, M.D. (2001). Herbal Therapy What Every Facial Plastic Surgeon Must Know, *Arch Facial Plast Surg*, 3:127-132.

📖 El beyrouthy, M.(1999). Contribution a l'étude de quelques familles médicinales de la flore libanaise. Université Saint-Esprit de Kaslik Faculté des Sciences Agronomiques.

📖 Eloff, J.N.; Famakin, J.O.; and Katerere, D.R.P. (2005). *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 4 (10) : 1161-1166.

📖 Essop, A.B.; van Zyl, R.L.; van Vuuren, S.F.; Mulhollandb, and Viljoen, A.M.(2008). The in vitro pharmacological activities of 12 South African *Hermannia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 119 : 615–619.

📖 El Watan (2008). Plantes médicinales : Les remèdes traditionnels toujours en vogue. *Edition du 7 Janvier*.

📖 Falleh, H ; Ksouri,R. ; Chaieb, K. ; Karray-Bouraoui,N. ; Trabelsi,N. and Boulaaba,M. ; Abdelly, C.(2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 : 372-379

📖 Fang Tian, F.; Li,B.; Ji,B.; Yang , J.; Zhang , G.; Chen ,Y.and Luo; Y.(2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113 : 173-179

- 📖 Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.
- 📖 Fernandez, A.; Camacho, A.; Fernandez, C. and Altarejos, J. (2000). Composition of the Essential Oils from Galls and Aerial Parts of *Pistacia lentiscus* L. *Essent. Oil Res.* 12:19-23
- 📖 Fontaine, E.; Barnoud, D. ; Schwebel, C. and Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11 : 411-420
- 📖 Fossey, J.; Lefort, D. and Sorba, J. (1993). Les radicaux libres en chimie organique, in les radicaux libre en biochimie. *Masson Edition*, Pp : 201-210.
- 📖 Fu, W.; Chena, J.; Cai, Y.; Lei, Y.; Chen, L.; Pei, L. ; Zhou, D.; Liang, X. and Ruana, J. (2010). Antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective potential of the extract from *Parathelypteris nipponica* (Franch. et Sav.) Ching. *Journal of Ethnopharmacology*, 130: 521–528.
- 📖 Gan, C.Y. and Latiff, A.A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry*, 124: 1277-1283
- 📖 Gardeli, C.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Theodosios Kibouris, T.; Michael. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107 :1120–1130.
- 📖 Gardès-Albert, A. M.; Bonnefont, D. R.; Abedinzadeh, Z. et Jore. D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité Chimique*, p: 91-95.
- 📖 Garnier, G.; Bézanger-Beauquesne, L. and Debraux, G. (1961). Ressources médicinales de la flore française. *Edition, Vigot Frères Editeurs*, p :665-666.
- 📖 Ghedira, K. (2005). Les flavonoides: Structure, propriétés biologique, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4 : 162-169.
- 📖 Glavnik, V.; Simonovska, B. and Vovk, I. (2009). Densitometric determination of (+)-catechin and (–)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. *Journal of Chromatography A*, 1216 :4485–4491.
- 📖 Goli, A. H.; Barzegar, M.; and Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92: 521-525.
- 📖 Goudable, J. and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxidant. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11: 115-120.
- 📖 Gouthamchandra, K.; Mahmood, R. and Manjunatha, H. (2010). Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from *Clerodendrum infortunatum* L. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30 : 11–18
- 📖 Gramza, A.; Pawlak-Lemańska, K.; Korczak, J.; Włóscowicz, E. and Rudzińska, M. (2005). Tea Extracts as Free Radical Scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (6), 861-867.

- 📖 Gülçin, I.; Bursal, E.; Sehitoglu, H.M.; Bilsel, M. and Gören, A.C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 2227-2238
- 📖 Gulçin, .; Huyut, Z.; Elmastas, M. and Aboul-Enein, H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3: 43–53
- 📖 Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1–93
- 📖 Hagerman, A. E.; et Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26: 809-812.
- 📖 Halliwell, B.; and Gutteridge, J. M. C. (1994). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 219: 1-14.
- 📖 Hamlat N. et Hassani A. 2008. Analyse des flavonoïdes présents dans les feuilles du lentisque par les méthodes chromatographiques. XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie.
- 📖 Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67– 202.
- 📖 Hayouni, E. A.; Abedrabba, M. ; Bouix, M. and Hamdi, M.(2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105: 1126-1134.
- 📖 Hazra, B.; Biswas, S.; and Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *Bio.Med.Cental Complementary and Alternative Medicine*, 8:63 1-10.
- 📖 Heim, K. E.; Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584
- 📖 Hennebelle, T. Sahpaz, S. et Bailleul, F.(2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6
- 📖 Heo, H.J.; Kim, Y.J.; Chung, D.; Kim, D.O.(2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry*, 104 : 87–92.
- 📖 Hesberg, C.; Hansch, R.; Mendel, R.R and Bittner, F. (2004). Tandem Orientation of Duplicated Xanthine Dehydrogenase Genes from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(14): 13547-13554.
- 📖 Heyne, B.; Brault, D.; Fontaine-Aupart, M.P.; Kohnen, S.; Tfibel, F.; Mouithys-Mickalad, A.; Deby-Dupont, G.; Hans, P. and Hoebeke, M. (2005). Reactivity towards singlet oxygen of propofol inside liposomes and neuronal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724 : 100- 107

- 📖 Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C. ; de Pascual-Teresa, S. (2010) . Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121: 691–696.
- 📖 Huet, O. et Duranteau, J. (2008) Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres Endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation*, 17 : 387-392.
- 📖 Hwang, T.L.; Li,G. L.; Lan, Y.H.; Chia, Y.C.; Hsieh, P.W.; Wu, Y. H. and Wu, Y. C. (2009). Potent inhibition of superoxide anion production in activated human neutrophils by isopedicin, a bioactive component of the Chinese medicinal herb *Fissistigma oldhamii*. *Free Radical Biology & Medicine*, 46 : 520-528.
- 📖 Iserin, P.; Massou, M.; Restellini, J.P.; Moulard, F.; Zha, E.; Delarouque, R.; Delarouque, O.; Vican, P.; Ybert, E.; Dellesalle-Feat, T.; Biaugeaud, M.; Ringuet, J.; Bloch, J. et Botrel A. (2001) . Encyclopédie des plantes médicinales. *Édition. Larousse*, p: 4.
- 📖 Ivanova, D.; Gerova, D.; Chervenkov, T. and Yankova, T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 145-150.
- 📖 Iwalokun, B. A., Usen, U. A, Otunba, A. A. and Olukoya, D. K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (15), p: 1732-1739.
- 📖 Janakat, S et Al-Meri , H. (2002). Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 135-138.
- 📖 Javanmardi, J.; Stushnoff, C.; Locke, E. and Vivanco, J.M. (2003) . Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83: 547–550
- 📖 Jayaprakasha, G.K. and Patil, B. S. (2007). *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101 : 410–418
- 📖 Jeong , C.H.; Kwak ,J. H.; Kim,J.H.; Choi, G.N.; Kima, D.O. and Heo,H.J. (2011) .Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using in vitro model system. *Food Chemistry*, 125: 417–422.
- 📖 Joy , P. P. ; Thomas, J. ; Mathew,S. Skaria, B.P. (1998). Medicinal Plants. Kerala Agricultural University, Aromatic and Medicinal Plants Research Station. *Odakkali, Asamannoor P.O., Ernakulam District, Kerala, India*, p:1- 211.
- 📖 Kalaivani , T. and Mathew, L.(2010). Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile, an Indian medicinal tree. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 298–305.
- 📖 Kandil, F. E. ; Song, L. ; Pezzuto, J. M. ; Marley, K. ; Seigler, D. S. And Smith, M. A. L. (2000). Isolation Of Oligomeric Proanthocyanidins From Flavonoid-Producing Cell Cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*, 36:492-500,
- 📖 Kang, K.S.; Yamabe, N.; Kima, H.Y.; Okamoto, T.; Sei, Y. and Yokozawa, T. (2007). Increase in the free radical scavenging activities of American ginseng by heat processing and its safety evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 :225–232

- 📖 Kasperek, M. et al-Janabi, S. (2008) . Plantes médicinales, La diversité biologique au service de la santé. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit*, p : 1-2.
- 📖 Katalinic, V.; Milos, M. ; Kulisic, T.; Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550–557
- 📖 Kavak, D. D. ; Altioek, E.; Bayraktar,O. and Ülkü, S. (2010). *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64 : 167-171.
- 📖 Kaviarasan, S.; Naik , G.H.; Gangabhagirathi, R.; Anuradha, C.V.; Priyadarsini, K.I. (2007). In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103: 31–37
- 📖 Khalil, N.K.; Pepato, M.T.; et Brunetti, I.L.(2008). Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. *Biol Res*, 41: 165-171.
- 📖 Kivcak, B.; and Akay, S. (2005). Quantitative determination of a-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76: 62–66.
- 📖 Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- 📖 Kordali S., Cakir A., Zengin H. et M.E. Duru. 2003. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74 :164–167.
- 📖 Krishnaiah, D.; Sarbatly, R. and Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *food and bioproducts processing*, 73:583–587
- 📖 Krishnaraju, A.V.; Rao,C.V.; Rao, T.V.N.; Reddy, K.N. and Trimurtulu, G. (2009). In vitro and In vivo Antioxidant Activity of *Aphanamixis polystachya* Bark. *American Journal of Infectious Diseases*, 5 (2): 60-67
- 📖 Kumar, S. and Kumar, D. (2009). Antioxidant and free radical scavenging activities of edible weeds. *African Journal Food Agriculture Nutrition and Development*, 9 (5): 1174-1190
- 📖 Kumar,B. S. A.; Lakshman, K.; Jayaveera, KN.; Sheshadri Shekar, D.; Kumar, A.A. and Manoj, B. (2010). Antioxidant and antipyretic properties of methanolic extract of *Amaranthus spinosus* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 702-706
- 📖 Kumaran , A. and karunakaran, R. J. (2006) . Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97 :109–114
- 📖 Kumari, A. and Kakkar, P. (2008). Screening of Antioxidant Potential of Selected Barks of Indian Medicinal Plants by Multiple *in vitro* Assays. *Biomedical And Environmental Sciences*, 21: 24-29
- 📖 KVvcak , B. et Akay, S. (2005) .Quantitative determination of a-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76: 62–66

- Landaua, S.; Azaizehb, H. ; Mukladaa, H. ; Glasserc , T. ; Barama, N. Abbasd, E.D.U. H.; Markovicd, A. (2010) . Anthelmintic activity of *Pistacia lentiscus* foliage in two Middle Eastern breeds of goats differing in their propensity to consume tannin-rich browse .*Veterinary Parasitology*, 173 : 280–286.
- Lee, J.H.; Lee ,S.J.; Park, S.; Kima, H.K.; Jeong, W.Y.; Choi, J.Y.; Sung, N.K.; Lee, W.S.; Limd, C.S.; Kime, G.S. and Shin, S.C. (2011). Characterisation of flavonoids in *Orostachys japonicus* A. Berger using HPLC–MS/MS: Contribution to the overall antioxidant effect. *Food Chemistry*, 124:1627–1633.
- Leopoldini, M.; Russo, N. and Toscano, M.(2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125 : 288–306.
- Leon, J.; Acun a-Castroviejo, D.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Tan,D.X.; Russel J. Reiter, R.J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*, 75 : 765–790.
- Lesjak, M.M.; Beara , I.N.; Orcic,D.Z. Anackov, G.T.; Balog, K.J.; Franciškovic, M.M. and Mimica-Dukic, N.M.(2011). *Juniperus sibirica* Burgsdorf. as a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents. *Food Chemistry* 124 : 850–856
- Lin , C.M.; Chen, C.S.; Chen, C.T.; Liang, Y.C and Lin, J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 167-172.
- Li, R.W.; David Lin, G.; Myers, S.P. and Leach, D.N. (2003). Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 61-67.
- Lin, E.S. and Li, C.C. (2010). Evaluation of superoxide radical scavenging capacity and reducing power of areca flower extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10): 975-981
- Lizcano, L. J.; Bakkali,F.; Ruiz-Larrea, M. B. and Ruiz-Sanz, J. I.(2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119 : 1566–1570.
- Ljubuncic, P.; Song ,H.; Cogan , U.; Azaizeh , H. and Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 :198–204
- Longo, L.; Scardino,A. and Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8 : 360–364
- Loo, A.Y., Jain, K. and arah, I. D. (2008). Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107: 1151-1160.
- López-Lázaro, M.(2009). Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.
- Luo,W.; Zhao, M.; Yang,B.; Shen,G. and Rao, G.(2009). Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities. *Food Chemistry*, 114: 499–504

- 📖 Luo, W.; Zhao, M.; Yang, B.; Ren, J.; Shen, G. and Rao, G. (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, 126: 277–282
- 📖 Macheix, J. J.; Fleuriet, A and Jay- Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, p: 192.
- 📖 Maisuthisakul, P.; Pongsawatmanit,R.; Gordon, M.H.(2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*, 100 : 1620–1629
- 📖 Makkar, H.P.S. (2003). Quantification of tannin in tree and shrub foliage. A laboratory manual. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, p :102
- 📖 Maksimovic, Z.; Malencie, N. and kovacevie, N. (2005). polyphénol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts . *Bioresource technology*, 96(8): 873-877
- 📖 Male, Z.; Medic-Saric,M. and Buca, F. (1998). Flavonoids of *Guiera senegalensis* J. F. GMEL.- Thin-layer Chromatography and Numerical Methods. *Croatica Chemica Acta*, 71 (1): 69-79.
- 📖 Males, Z.; Plazibat, M.; Vundac, V.; and Zuntar I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm*, 56: 245-250.
- 📖 Mamtani, R. and Ronac Mamtani, R.(2005). Ayurveda and Yoga in Cardiovascular Diseases. *Cardiology in Review*, 13(3):155-165.
- 📖 Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American journal of clinical nutrition*, 79: 727-747.
- 📖 Mansouri, A.; Makris, D.P . and Kefalas, P. (2005). Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay: Structure–activity relationships. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 22–26
- 📖 Marc, F.; Davin, A.; Deglène-Benbrahim, L.; Ferrand, C.; Baccaunaud, M and Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxidant dans les aliments. *Medecine/ Science*, 20: 458-463.
- 📖 Marcocci, L.; Packer, L.; Droy-Lefaix, M.T.; Sekaki, A. and Garde's-Albert, M.(1994). Antioxidant action of *Ginkgo biloba* extract Egb 761. *Methods of Enzymology*, 234: 462-475.
- 📖 Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leurs réactivités avec les radicaux libres issus des alcools. Formation des depsides. *Thèse doctorat, université de Limoges*, Pp : 40-43.
- 📖 Mariya John, K.M.; Vijayan, D.; Raj Kumar, R et Premkumar, R. (2006). Factors influencing the efficiency of extraction of polyphenols from young tea leaves. *Asian journal of plant sciences*, 5(1): 123-126.
- 📖 Martens, S. et Mithofer, A.(2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66 : 2399–2407

- 📖 Martin, S.; and Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et D'angéiologie*, 51: 304-315.
- 📖 Massion ,M. ; Preiser, J.C. et Balligand, J.L . (2002) Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ? Reactive nitrogen species: deleterious or not? *Nutrition clinique et metabolism*, 16: 248–252
- 📖 Masuko Ushio-Fukai and R. Wayne Alexander(2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling Role of NAD(P)H oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264: 85–97.
- 📖 Mendham, Denny, Barnes, Thomas (2006). Analyse chimique quantitative de vogel. *De Boeck*, p:272-313.
- 📖 Meot-Duros ,L.; Floch, G.L. and Magne, C. (2008). Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 : 258–262
- 📖 Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres : étude et application thérapeutiques. *Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur*, p: 37- 41.
- 📖 Miliauskas, G.; Venskutonisa, P.R.; van Beek, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85 : 231–237
- 📖 Moleneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technology*, 27 :152-159.
- 📖 Mompon, B.; Lemaire, B.; Mengal, P. and Surebled, M. (1996). Extraction des polyphénols du laboratoire à la production. *Ed. INRA*. p :31-42.
- 📖 Mouchabac, S. (2009). Comportements impulsifs, agressivité et oxyde nitrique. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats*, 36 : 19 - 28
- 📖 Mozaffarieh, M.M.D.; Grieshaber, M.D, S.; Orgul, M.D, and J. Flammer, M.D. (2008). The Potential Value of Natural Antioxidative Treatment in Glaucoma. *Ophthalmology*, 53 (5): 479-505.
- 📖 Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-21.
- 📖 Moyo, M.; Ndhlala, A.R.; Finnie, J.F. and Staden, J.V. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, 123 : 69–76.
- 📖 Naczka , M. and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95–111.
- 📖 Nagulendran, KR.; Velavan, S.; Mahesh, R and Hazeena Begum. (2007). *In Vitro* antioxidant and total polyphenolic content of *Cyperus rotundus* rhizomes. *E-Journal of Chemistry*, 4(3): 440-449.

- 📖 Nakagawa, K.; Fujii, S.; Ohgi, A. and Uesato, S. (2005). Antioxidative activity of 3-O-octanyl-(+)- catechin, anewly synthesized catechin, *in vitro*. *Journal Health Science*, 51(4):492-496.
- 📖 Nijveldt, R.J.; Nood, E.V.; Hoorn, D.E.C.V.; Boelens, P.G.; Norren, K.V and Leeuwen, P.A.M.V. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential application. *American journal of clinical nutrition*, 74: 418-425.
- 📖 Nilsson, J.; Pillai, D.; Onning, G.; Persson, C.; Nilsson, A and Akesson, B. (2005). Comparison of the 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6- sulfonic acide (ABTS) and ferric reducing antioxidant power(FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol.Nutr. Food Res.*49:239-246
- 📖 Odoul, M. (2003). Les huiles essentielles. *La Lettre*, 2 : 1- 12.
- 📖 Osman, A.M.; Wong, K.K.Y and Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 321–329.
- 📖 Ono, T .; Tsuruta, R.; Fujitaa, M.; Aki , H. S.; Kutsuna,S.; Kawamuraa , Y.; Wakatsuki, J.; Aoki, T.; Kobayashi,C.; Kasaokaa, S.; Maruyamac, I.; Yuasab ,M. and Maekawa, T. (2009). Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Research*,1305 :158 – 167
- 📖 Organisation Mondiale de la Sante (OMS). (2003). Médecine traditionnelle. *Cinquante-sixième assemblée mondiale de la sante*, p : 1-5.
- 📖 Ostos, J.C.; Lopez-Garrido, R.; Murillo, J.M. and Lopez, R. (2008). Substitution of peat for municipal solid waste- and sewage sludge-based composts in nursery growing media: Effects on growth and nutrition of the native shrub *Pistacia lentiscus* L. *Bioresource Technology*, 99:1793–1800.
- 📖 Oszmianski, J.; Wojdylo, A.; Lamer-Zarawska, E. and Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100:579-583
- 📖 Ozden-Tokatli, Y.; Akdemir, H.; Tilkat, E. and Onay, A. (2010). Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. *Biotechnology Advances*, 28 : 130–141
- 📖 Ozsoy, N.; Can , A.; Yanardag, R. and Ake, N.(2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110: 571–583.
- 📖 Öztürk, M.; Kolak, U.; Topçu,G.; Öksüz, S. and Choudhary, M. I. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, 126 : 31-38.
- 📖 Palacio, S.; Milla, R. et Montserrat-Martí, G. (2005). A phenological hypothesis on the thermophilous distribution of *Pistacia lentiscus* L. *Flora*, 200:527–534.
- 📖 Parejo, I .; Viladomat, F.; Bastida, J. ; Rosas-Romero, A. ; Saavedra,G.; Murcia, M.; Jimenez, A.M. and Codina, C. (2003) . Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73: 1667–1681

- 📖 Pasko, P.; Barton, H.; Zagrodzki, P.; Gorinstein, S.; Folta, M.; Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115: 994–998.
- 📖 Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*, (276) : 87-96.
- 📖 Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- 📖 Pincemail, J. ; Meurisse, M. ; Limet, R. et Defraigne, J.O. (1998b). Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphere*, 78 :1-3.
- 📖 Pincemail, J.; Meurisse, M. ; Limet, R. and Defraigne, J.O.(1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 (4) :1-4.
- 📖 Pincemail, J.; Lecomte, J.; Collart, E.; Jean-Pierre Castiaux, J.P. and Defraigne, J. O.(2001). Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Medecine Interne*, 6(5) : 1-3.
- 📖 Pincemail, J.; Bonjean, K.; Cayeux, K.; Defraigne, J.O. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante : Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 233–239.
- 📖 Pirot, S. (2001). Rôle du monoxyde d'azote dans l'addiction. *Neuropsychiatrie : Tendances et Débats*, 15: 47-51.
- 📖 Pollard, S.P.; Kuhnle, G. G.C.; Vauzour, D.; Vafeiadou, K.; Tzounis, X.; Whiteman, M.; Rice-Evans, C. and Spencer. J.P.E. (2006). The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350: 960–968
- 📖 Pousset, J. L. 2006. Place des médicaments traditionnels en Afrique. *Médecine Tropicale*, 66, p : 606-609.
- 📖 Prasad, K.N.; Xie, H.; Hao, J.; Yang, B.; Qiu, S.; Wei, X.; Chen, F. and Jiang, Y.(2010). Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. *Food Chemistry*, 118: 62–66
- 📖 Prior, R. I.; Wu, X and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *American Chemical Society*, 14:1-13.
- 📖 Quetin-Leclercq, J. (2002). Le voyage insolite de la plante au médicament, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 57 (2) : 11-20.
- 📖 Rai, S.; Wahile, A.; Mukherjee, K.; Saha, B.P. and Mukherjee, P.K.(2006). Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 :322-327
- 📖 Rajeshwar, Y.; Senthil Kumar, G.P.; Malaya Gupta, M. and Mazumder, U.K. (2005). Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *mucuna pruriens* (fabaceae) seeds. *European Bulletin of Drug Research*, 13(1): 31-39.

- 📖 Rasoulzadeh, F.; Jabaryb, H.N.; Naseri, A and Rashidic, M.R. (2009). Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochimica Acta Part A*. 72: 190–193.
- 📖 Razali, N.; Razab, R.; Junit, S.M. and Aziz, A.A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, 111: 38-44
- 📖 Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C.(1999). Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10): 1231–1237.
- 📖 Ré, D.B.; Nafia, I.; Nieoullon, A.; Le Goff, L.K.; et Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- 📖 Reed, J.D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal Animal Science*, 73:1516-1528.
- 📖 Rehecho, S.; Hidalgo, O.; García-Iñiguez de Cirano, M.; Navarro, I.; Astiasarán, I.; Ansorena, D.; Cavero, R.Y. and Calvo, M.I. (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 875-882.
- 📖 Ribéreau-Gayon, P. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*, p: 12-27.
- 📖 Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7):933-956.
- 📖 Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux. In « Physiologie et biochimie ». Ed: Presses polytechniques et universitaires Romandes, p : 318 - 338.
- 📖 Rietjens, I. M.C.M.; Boersma, M.G.; de Haan, L.; Spenkelink, S.; Awad, H. M.; Cnubben, N.H.P. van Zanden, J.J.; van der Woude, H.; Alink, G.M. and Koeman, J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11 : 321–333
- 📖 Robards, K.; Prenzeler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P. and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- 📖 Rogosic, J.; Estell, R.E.; Ivankovic, S.; Kezic, J.; Razov, J. (2008) Potential mechanisms to increase shrub intake and performance of small ruminants in mediterranean shrubby ecosystems. *Small Ruminant Research*, 74: 1–15
- 📖 Rolland, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL* 11: 419-424.
- 📖 Roginsky, V. and Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92 : 235–254.

- 📖 Roy, N.; Laskar, R.A.; Sk, I.; Kumari, D.; Ghosh, T. and Begum, N.A.(2011). A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of *Dalbergia sissoo* Roxb., an Indian medicinal plant. *Food Chemistry*, 126: 1115–1121
- 📖 Sahreen, S.; Rashid Khan , M. and Ali Khan, R.(2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122: 1205–1211.
- 📖 Sakat, S.S.;Juvekar,A.R. and Gambhir,M.N. (2010). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1) : 146-155.
- 📖 Samarth, R.M.; Panwar, M.; Kumar, M.; Soni, A.; Kumar, M. and Kumar, A. (2008). Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*, 106 :868–873.
- 📖 Santangelo, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Di Benedetto, R.; Filesi, C. and Masella, R.(2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist super Sanità*, 43(4): 394-405.
- 📖 Schmitt, C. A. and Dirsch, V. M. (2009). Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*, 21 :77–91
- 📖 Senevirathne, M.; Kim,S.H.; Siriwardhana, N.; Ha, J.H.; Lee, K.W.and Jeon,Y.J.(2006). Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. *Food Sci Tech Int* 12(1):27–38.
- 📖 Sennequier, N. et Vadon-Le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d’azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine/Sciences*, 14: 1185-1195.
- 📖 Shukla, S.; Mehta ,A.; John, J.; Singh , S.; Mehta, P. and Prasad Vyas, S. (2009) .Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 47:1848–1851.
- 📖 Skandrani, I.; Bouhleb, I.; Limema, I.; Boubaker, J.; Bhourri, W.; Neffati, A.; Ben Sghaier, M.; Kilani,S.; Ghedira, K.; Ghedira-Chekir, L. (2009). *Moricandia arvensis* extracts protect against DNA damage, mutagenesis in bacteria system and scavenge the superoxide anion. *Toxicology in Vitro*, 23: 166–175.
- 📖 Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M and Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*, 89: 191-198.
- 📖 Skoog, D.A.; West, D.M et James Holler, F. (1997). Chimie analytique. *De Boeck*. 712-722.
- 📖 Silva, E.M.; Rogez, H. and Larondelle Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55: 381–387.
- 📖 Silva, B.A.; Malva , J.O. and Dias, A.C.P. (2008) .St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 110: 611–619.

- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma. O. I.; and Bahorn, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agent: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
- Soong, Y.Y. and Barlow, P. J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 88 : 411–417
- Srinivasa Rao, K.; Chaudhury, P. K. and Pradhan, A. (2010). Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. *Food and Chemical Toxicology*, 48 :729–732
- Srivastava,A., Harish, S. R. and Shivanandappa, T. (2006) .Antioxidant activity of the roots of *Decalepis hamiltonii* (Wight & Arn.). *LWT*. 39: 1059–1065
- Stewart, V.C and Heales, S.J.R. (2003). Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunctions : Implication for neurodegeneration. *Free Radical Biology & Medicine*, 34(3): 287–303
- Tachakittirungrod, S.; Okonogi, S. and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103 : 381-388.
- Tadhani, M.B.; Patel, V.H. and Subhash, R. (2007). *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 : 323-329
- Taubert, D.; Breitenbach,T.; Lazar, A.; Censarek,P.; Harlfinger,S.; Berkels, R.; Klaus,W.; And Roesen, R.(2003) Reaction Rate Constants Of Superoxide Scavenging By Plant Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(12):1599–1607.
- Terrier, N.; Poncet-Legrand, C. and Cheynier, V.(2009). Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry*, 463-507.
- Thoo ,Y.Y.; Ho,S.K.; Liang, J.Y.; Ho, C.W. and Tan, C.P (2010). Effects of binarysolvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120 : 290–295.
- Tian, F.; Li, B.; Ji, B.; Yang , J.; Zhang , G.; Chen ,Y.; Luo; Y.(2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113 : 173–179.
- Tokoudagba, J.M.; Auger, C.; Bréant, L.; N’Gom, S.; Chabert, P.; Idris-Khodja, N.; Gbaguidi , F.; Gbenou, J.; Moudachirou , M.; Lobstein, A.; Schini Kerth, V. B. (2010). Procyanidin-rich fractions from *Parkia biglobosa* (Mimosaceae) leaves cause redox-sensitive endothelium-dependent relaxation involving NO and EDHF in porcine coronary artery. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 246–250.
- Tomaino, A.; Martorana,M.; Arcoraci,T.; Monteleone,D.; Giovinazzo, C. and Saija, A. (2010). Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. *Biochimie*, 92 : 1115-1122
- Topçu, G.; Ay.; M.; Bilici, A.; Sarikurkcu, C.; Ozoturk, M.; and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816-822.

- 📖 Tounes, M.; Abdennour, C. et Houaine, N. (2008). Influence of *Pistacia Lentiscus* Oil on Serum Biochemical Parameters of Domestic Rabbit *Oryctolagus Cuniculus* in Mercury Induced Toxicity. *European Journal of Scientific Research*, 4: 591-600
- 📖 Trabelsi, N.; Megdiche, W.; Ksouri, R.; Falleh, H.; Oueslati, S.; Soumaya, B.; Hajlaoui, H. and Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT*. 43 : 632–639.
- 📖 Triantafyllou, A.; Chaviaras, N.; Sergentanis, T.N.; Protopapa, E.; Tsaknis. (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 43–49.
- 📖 Tsuda, T.; Kato, Y. and Osawa, T. (2000). Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 484: 207-210.
- 📖 Ushio-Fukai, M. and Wayne Alexander, R. (2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling Role of NAD(P)H oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264: 85–97.
- 📖 Valentao, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M and Bastos, M.L. (2002). Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. *Biol. Pharm. Bull.* 25(10): 1324-1327.
- 📖 Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncola, J.; Izakovic, M.; and Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- 📖 Valko, M.; Labfriz, D.; Moncol, J. Cronin.; Mark T.D.M.; and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biologie*, 39: 44-84.
- 📖 Vamecq, J.; Vallée, L.; Storme, L.; Gelé, P.; et Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1) :16-23.
- 📖 Vasco, C.; J Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111 :816–823
- 📖 Velazquez, E.; Tournier, H.A.; Mordujovich de Buschiazzo, P.; Saavedra, G. and Schinella, G.R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74 : 91–97.
- 📖 Velloso, J.C.R.; de Frias Barbosa, V.; Maissar Khalil, N.; de Freitas Formenton Macedo dos Santos, V.A.; Furlan, M.; Brunetti, I.L.; de Faria Oliveira, O.M.M. (2007). Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43(3): 447-453.
- 📖 Verdú, M and García-Fayos, P. (1998). Ecological causes, function, and evolution of abortion and parthenocarpy in *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae). *Can. J. Bot.* 76: 134–141.

- 📖 Vergely, C. et Rochette L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51 : 109-116.
- 📖 Vergely, C et Rochette, L. (2005). Le stress oxydatif : Les radicaux libres, des composés à fonction biologique méconnue : à côté de leur action physiopathologique, ce sont des régulateurs avant d'être des destructeurs. *AMC pratique*, 141 : 28-30.
- 📖 Vermerris, V and Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Chapter I: Families of phenolic compounds and means of classification. *Edition Springer*, p:1-32
- 📖 Vijayabaskaran, M.; Venkateswaramurthy, N.; Babu, G.; Perumal, P. And Jayakar, B. (2010). *In Vitro* Antioxidant Evaluation Of Pseudarthria Viscida Linn. *International Journal Of Current Pharmaceutical Research*, 2(3): 21-23
- 📖 Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M. and Garcia-Parrilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS•+ method: influence of sample dilution and time. *Talanta* 64 : 501–509.
- 📖 Villano, D.; Fernandez-pachon, M, S.; Moya, M, L.; Traoncoso, A, M. and Garcia-parrilla, M, C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- 📖 Visavadiya, N. P.; Soni, B.; Dalwadi, N. (2009). Free radical scavenging and antiatherogenic activities of *Sesamum indicum* seed extracts in chemical and biological model systems. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2507–2515.
- 📖 Wang, H.; Zhao, M.; Yang, B.; Jiang, Y. and Rao, G. (2008). Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry*, 107 :1399–1406
- 📖 Wang, T.; Jónsdóttir, R. and Ólafsdóttir, G. (2009) . Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116 :240–248.
- 📖 Wei, T.; Sun, H.; Zhao, X.; Hou, J.; Hou, A.; Zhao, Q and Xin, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, Pistafolia A. *Life Sciences*, 70: 1889-899.
- 📖 Wchitl, M. and Anton., R. (2003). Plantes thérapeutiques (5Tradition, pratique, officinale, science et thérapeutique) 2^{ème} Ed. *Tec. Et Doc.* Paris . 200-202.
- 📖 Wichtl, M. and Anton, R. (2003). *Menthae Piperitae folium* in Plantes thérapeutique
- 📖 Willfor, S.M. ; Smeds , A.I. and Holmbom, B.R.. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112 : 64–77.
- 📖 Wojdyło, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R.;(2007) . Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940–949.
- 📖 Wong, C.C.; Li, H.B.; Cheng, K.W. and Chen, F.(2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97 :705–711

- 📖 Yang, J.; Guo, J. and Yuan, J. (2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT*, 41:1060-1066.
- 📖 YouGuo, C.; ZongJi, S. and XiaoPing, C. (2009). Evaluation of free radicals scavenging and immunity-modulatory activities of Purslane polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45:448–452.
- 📖 Yu, L.; Haley, S.; Perret, J.; Harris, M.; Wilson, J.; and Qian, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1619–1624.
- 📖 Yves Requena, M.D. and Dan Kenner, L.A.C. (1996). Botanical Medicine: A European Professional Perspective. *Paradigm Publications*, 1-11.
- 📖 Zhang, H.; Jiang, L.; Ye, S.; Ye, Y. and Ren, F. (2010). Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujube* Mill) from China. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1461-1465.
- 📖 Zhao, X.; Sun, H.; Hou, A.; Zhao, Q.; Wei, T.; and Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724: 103-110.
- 📖 Zhao, G.R.; Xiang, Z.J.; Ye, T.X.; Yuan, Y.J.; Guo, Z.X. (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, 99: 767–774.
- 📖 Zhu, K.X.; Lian, C.X.; Guo, X.N.; Peng, W. and Zhou, H.M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* 126 :1122–1126.
- 📖 Zielinska, D. and Zielinski, H. (2011). Antioxidant activity of flavone C-glucosides determined by updated analytical strategies. *Food Chemistry* 124 : 672–678.
- 📖 Zimmer, Z. and Cordesse, R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions Animales*: 9(3) : 167-179.



Annexes

Annexe1.

COMMUNES DE LA WILAYA DE BEJAIA (BGAYET)



Figure N°1 : Carte de la wilaya de Bejaia

Annexe2. Courbes d'étalonnage

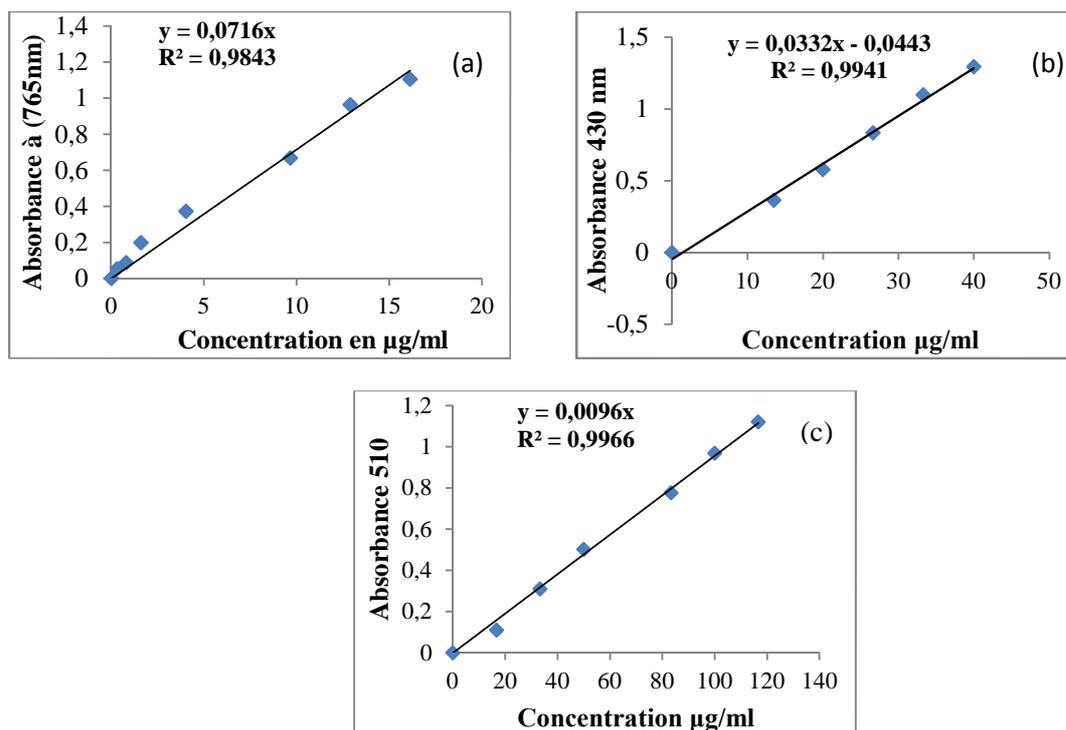


Figure N°2 : Courbes d'étalonnage : (a) dosage des phénols totaux réalisée avec la catéchine (b) dosage des flavonoïdes réalisée avec la rutine (c) dosage des tannins réalisée avec l'acide tannique

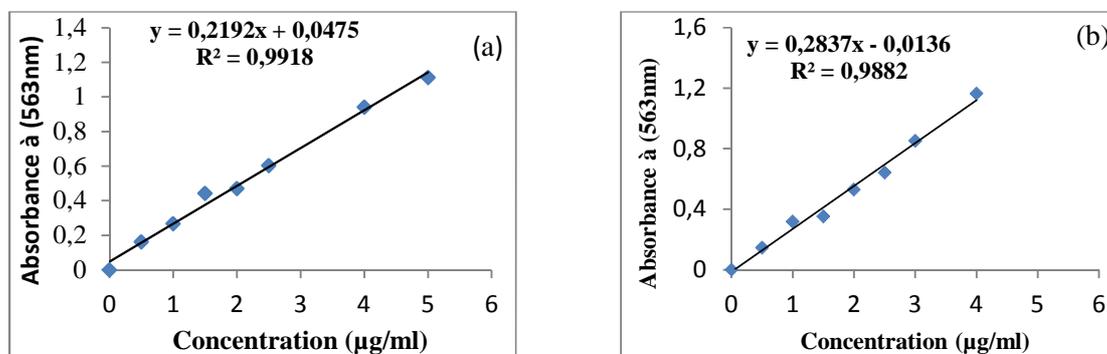


Figure N°3 Courbes d'étalonnages réalisées avec (a) l'acides ascorbique, (b) : l'acide caféique pour le test de pouvoir réducteur

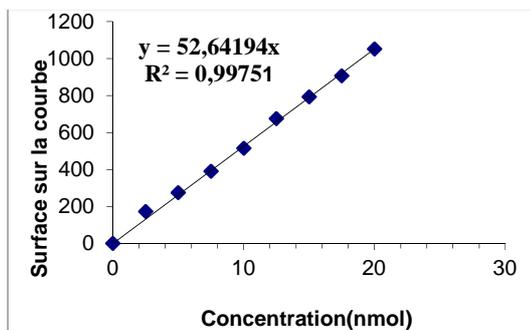


Figure N°4 Courbe d'étalonnage réalisée avec trolox

Annexe 3

Corrélations entre le pouvoir réducteur et les teneurs en phénols totaux, les flavonoïdes et tannins :

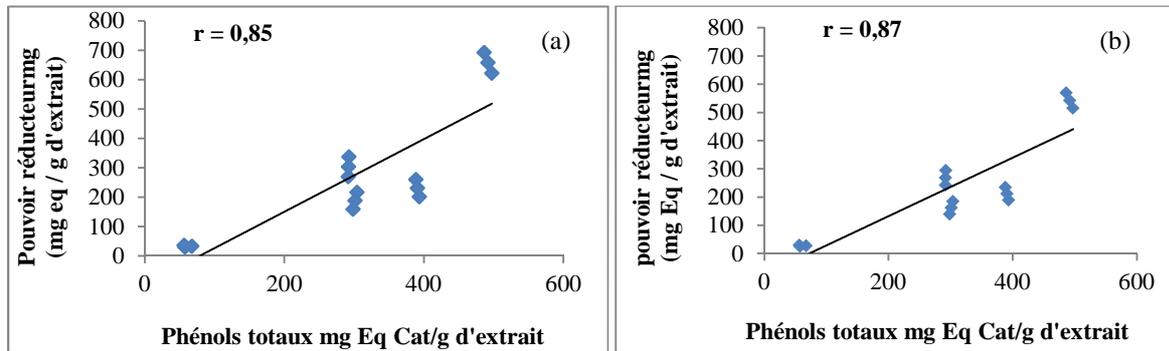


Figure N°5 : Corrélation entre l'activité antioxydants (FRAP) la teneur en phénol totaux des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* (a) en équivalent acide ascorbique (b) en équivalent acide caféique.

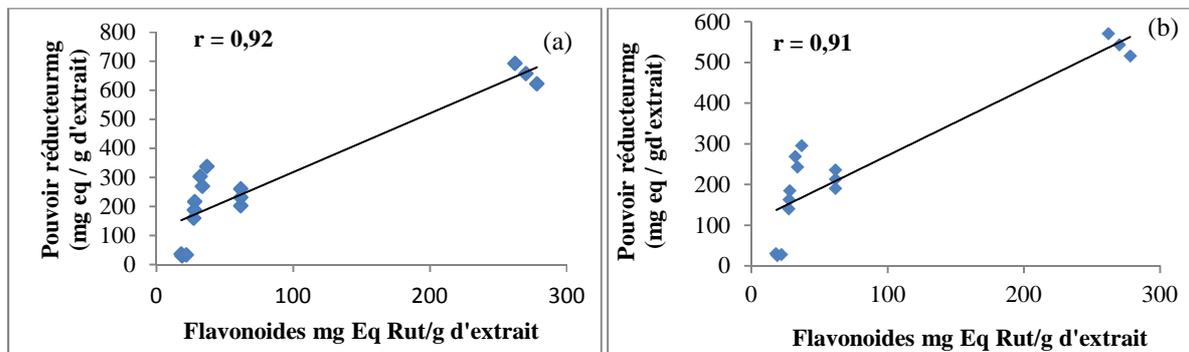


Figure N°6 : Corrélation entre l'activité antioxydant (FRAP) et la teneur en flavonoïde des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* en équivalent (a) acide ascorbique (b) en équivalent acide caféique

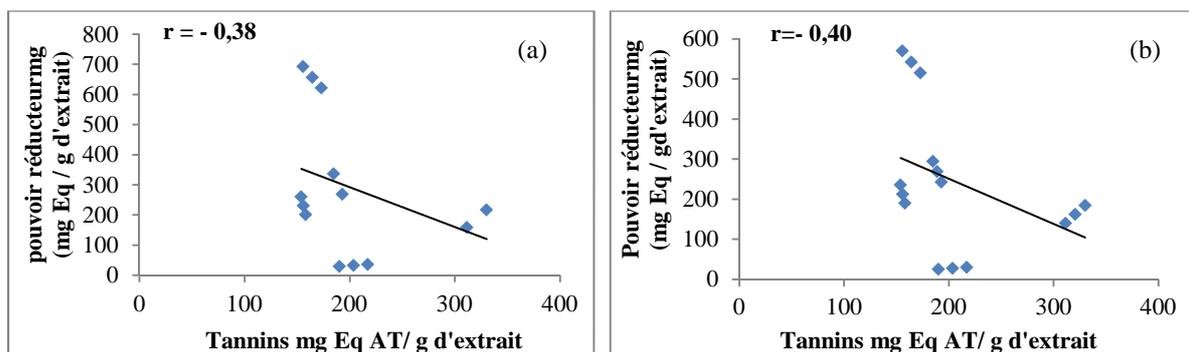


Figure N°7 : Corrélation entre l'activité et la teneur en tannins des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* en équivalent (a) acide ascorbique. (b) en équivalent acide caféique.

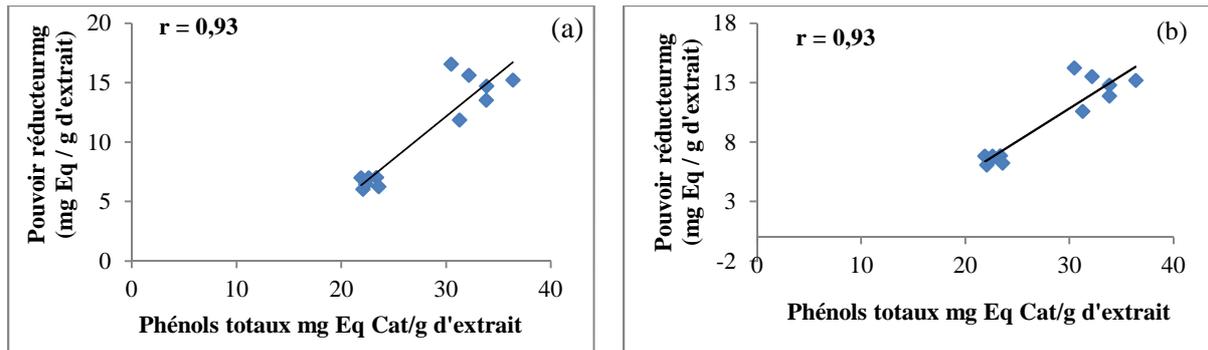


Figure N°8: Corrélation entre l'activité antioxydante (FRAP) et la teneur en phénol total des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* (a) en équivalent acide ascorbique. (b) en équivalent acide caféique.

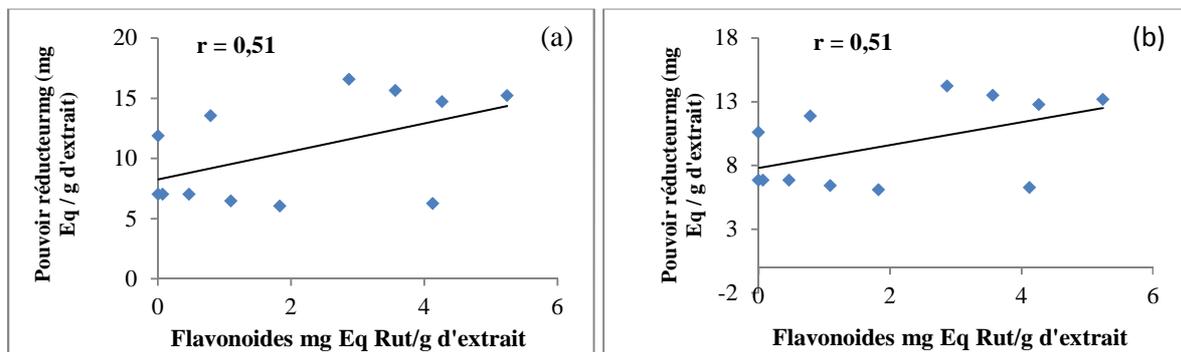


Figure N°9: Corrélation entre l'activité antioxydante (FRAP) et la teneur en flavonoïde des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* (a) en équivalent acide ascorbique. (b) en équivalent acide caféique.

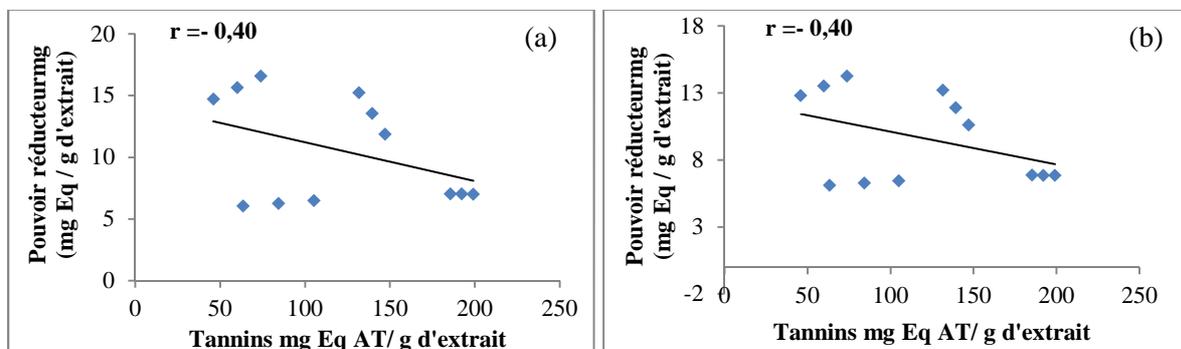


Figure N°10: Corrélation entre l'activité antioxydante (FRAP) et la teneur en tannins des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* (a) en équivalent acide ascorbique (b) en équivalent acide caféique.

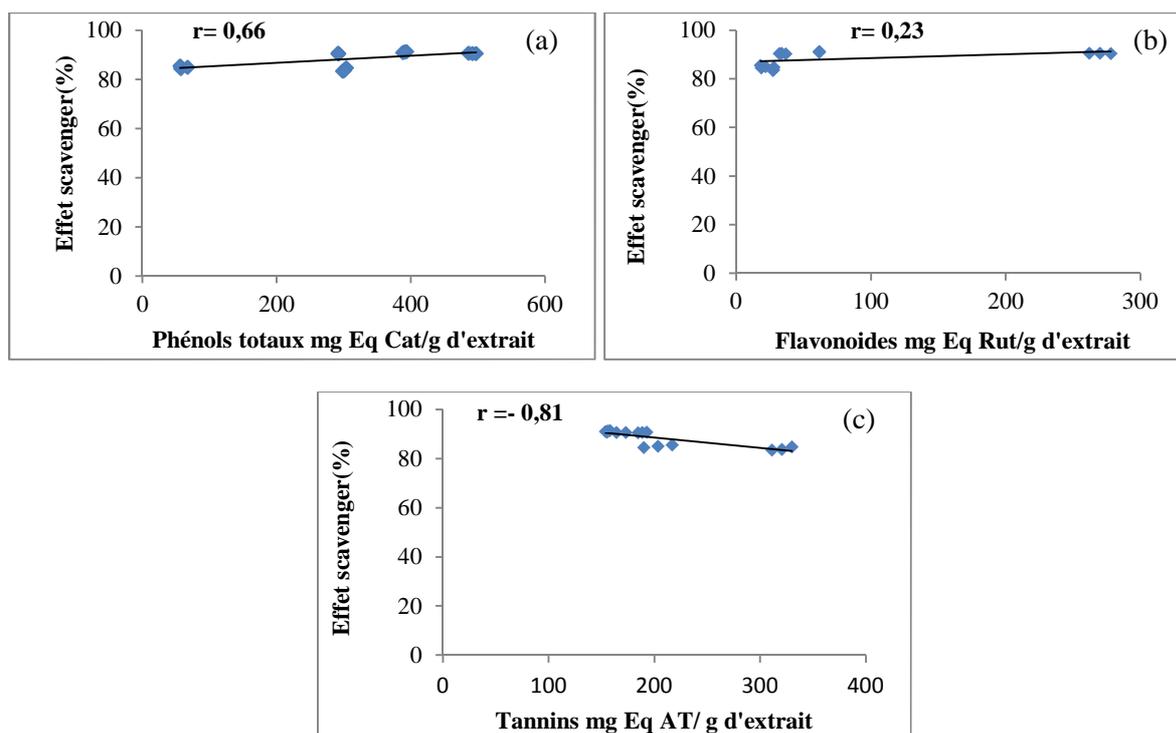


Figure N°11: Corrélation entre l'activité scavenging du radical cationique ABTS^{•+} et la teneur (a) phénol totaux (b) en flavonoïde et (c) en tannins des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

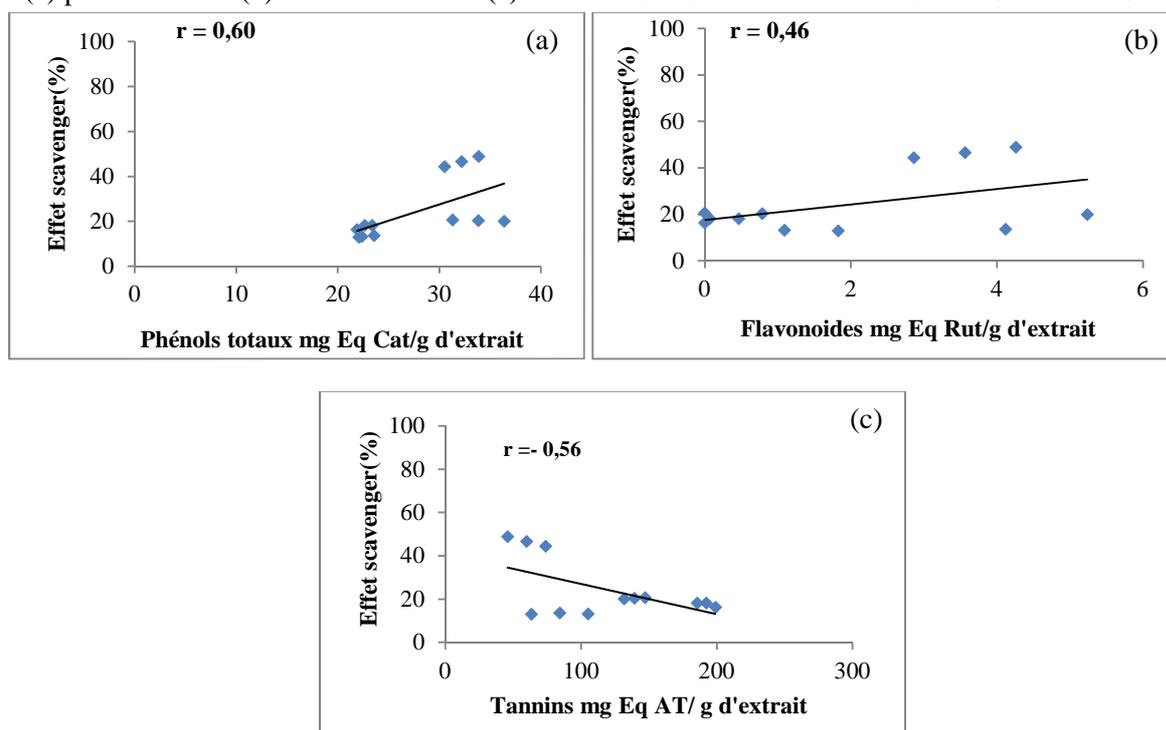


Figure N°12: Corrélation entre l'activité scavenging du radical cationique ABTS^{•+} et la teneur (a) phénol totaux (b) en flavonoïde et (c) en tannins des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* .

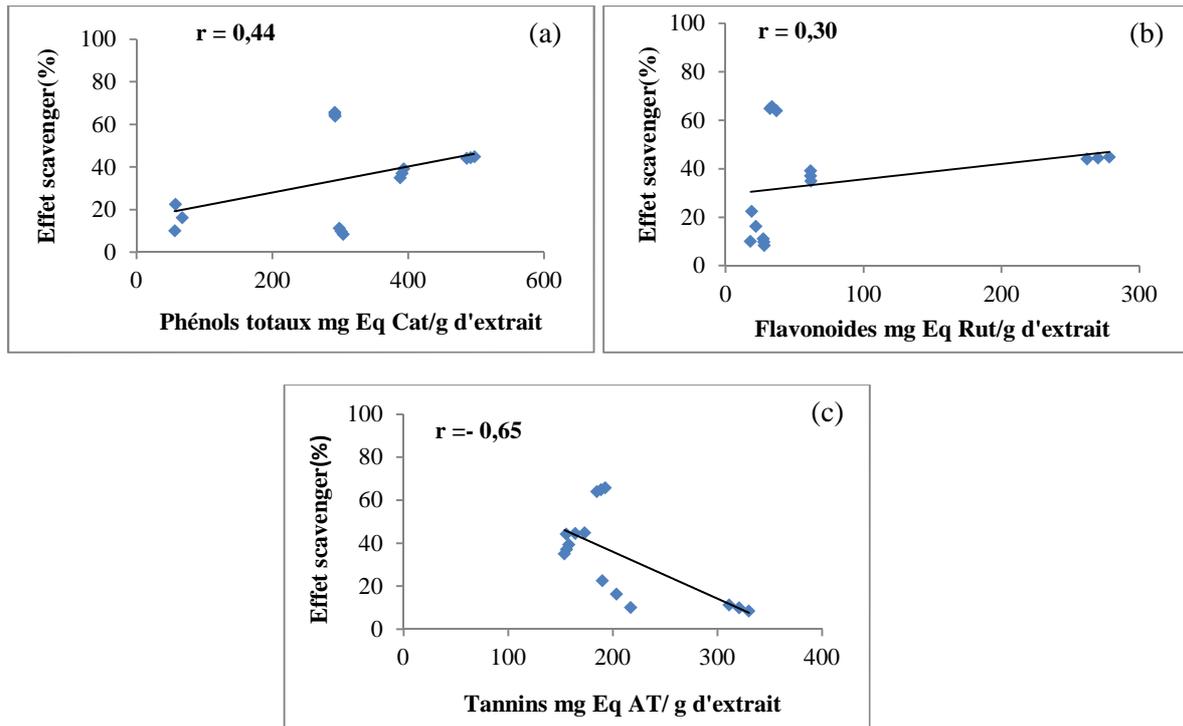


Figure N°13: Corrélation entre l'activité scavenging de l'anion superoxyde et la teneur (a) phénol totaux (b) en flavonoïde et (c) en tannins des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

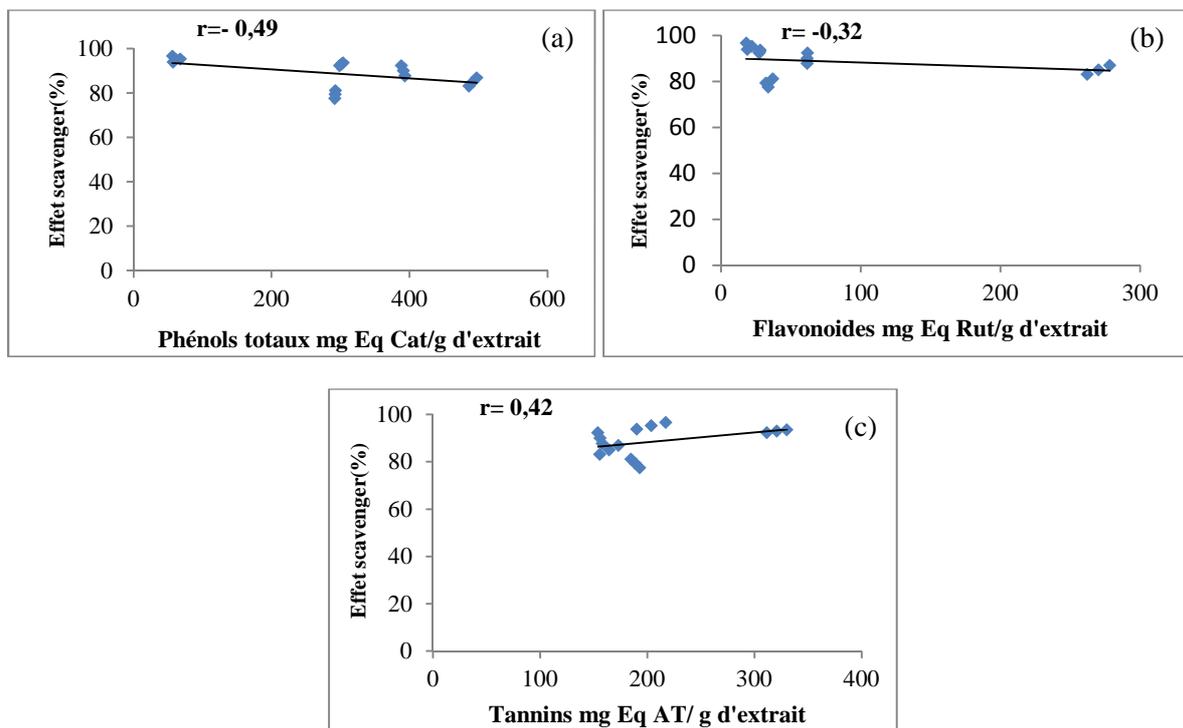


Figure N°14: Courbes de corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et la teneur (a) phénol totaux (b) en flavonoïde et (c) en tannins des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

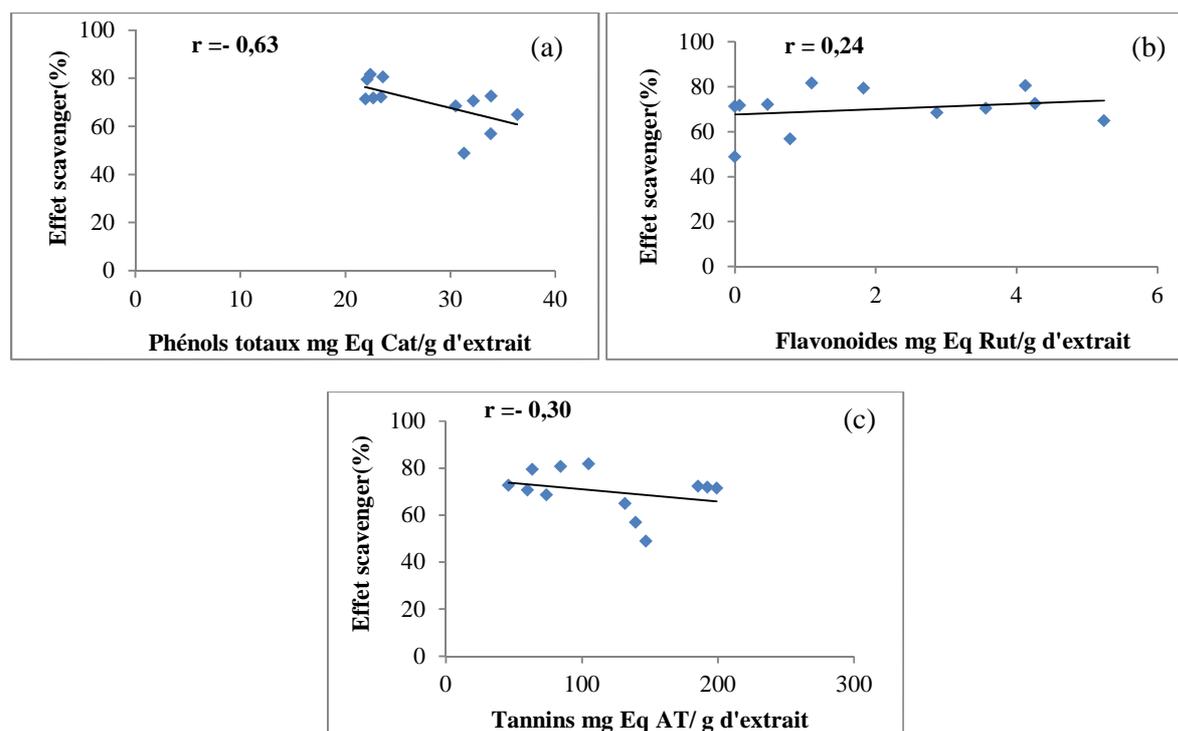


Figure N°15: Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et la teneur (a) phénol totaux (b) en flavonoïde, (c) en tannins des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*

Annexe 4

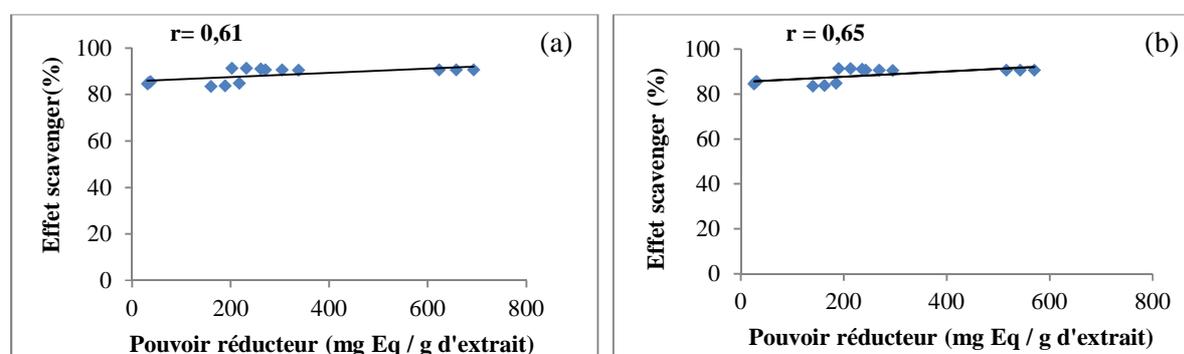


Figure N°16: Corrélation entre les activités scavenging du radical cationique $ABTS^{+}$ et pouvoir réducteur (FRAP) en équivalent (a) acide ascorbique, (b) acide caféique des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

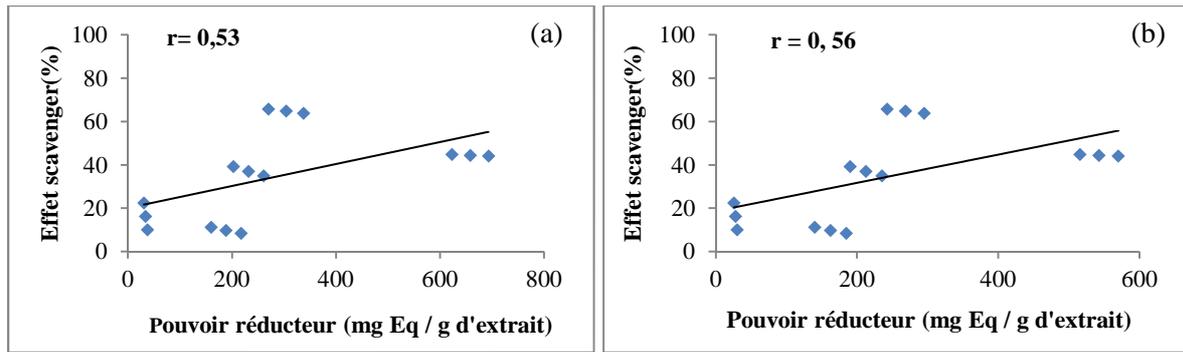


Figure N°20: Corrélation entre l'activité scavenging de l'anion superoxyde et le pouvoir réducteur (FRAP) en équivalent (a) acide ascorbique, (b) acide caféique des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

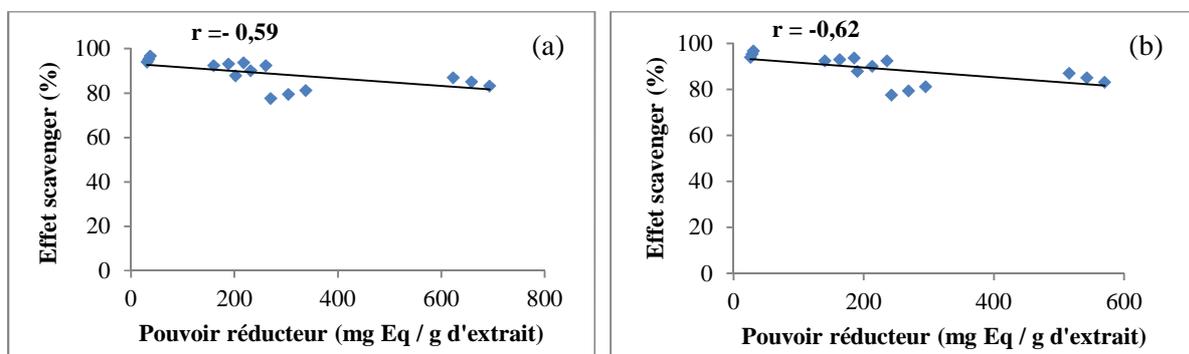


Figure N°21 : Corrélation entre l'activité scavenging de l'anion superoxyde et le pouvoir réducteur (FRAP) en équivalent (a) acide ascorbique, (b) acide caféique, des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*

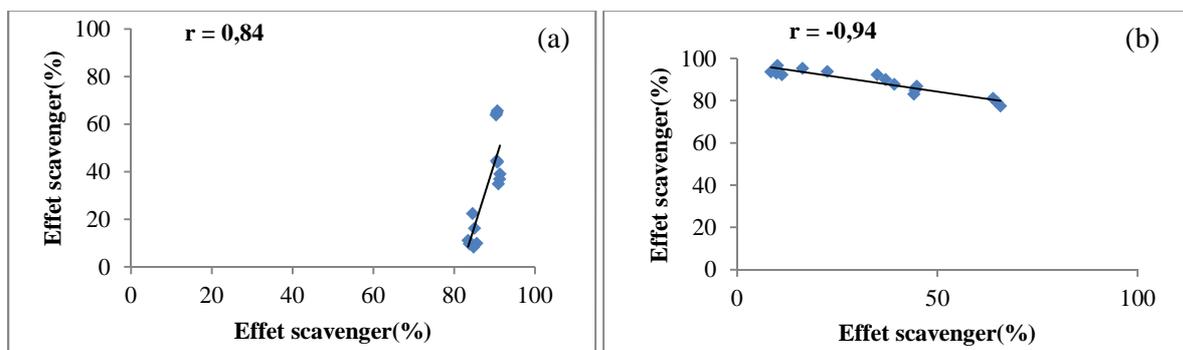


Figure N°22: Corrélations entre les activités des extraits de feuilles ; (a). effets scavenger de anion superoxyde et effets scavenger de l' ABTS⁺⁺ (b) effets scavenger de anion superoxyde et effets scavenger de monoxyde d'azote.

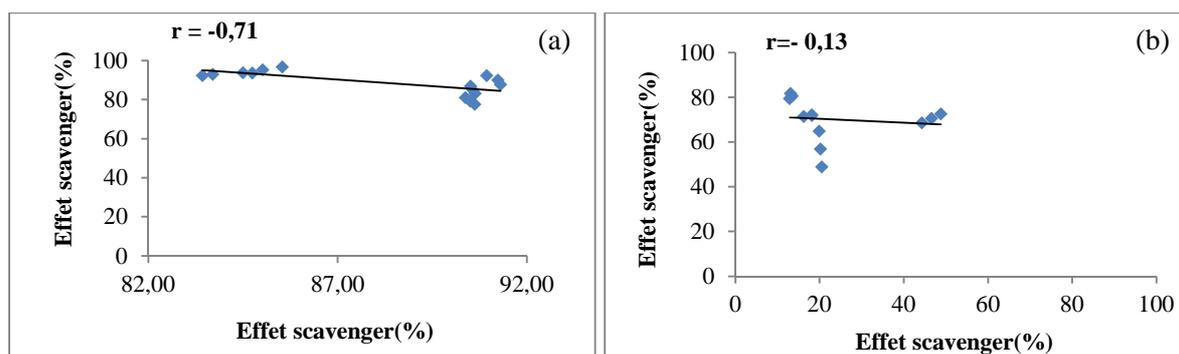


Figure N°17 : Corrélations entre les activités scavenging du radical cationique ABTS^{•+} et de monoxyde d'azote (a) des extraits de feuilles (b) des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*

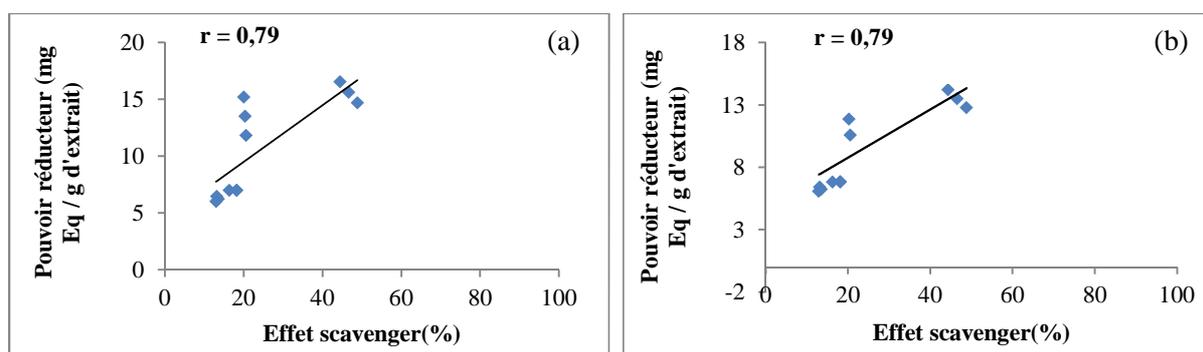


Figure N°18: Corrélation entre les activités scavenging du radical cationique ABTS^{•+} et pouvoir réducteur (FRAP) en équivalent (a) acide ascorbique, (b) acide caféique des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*

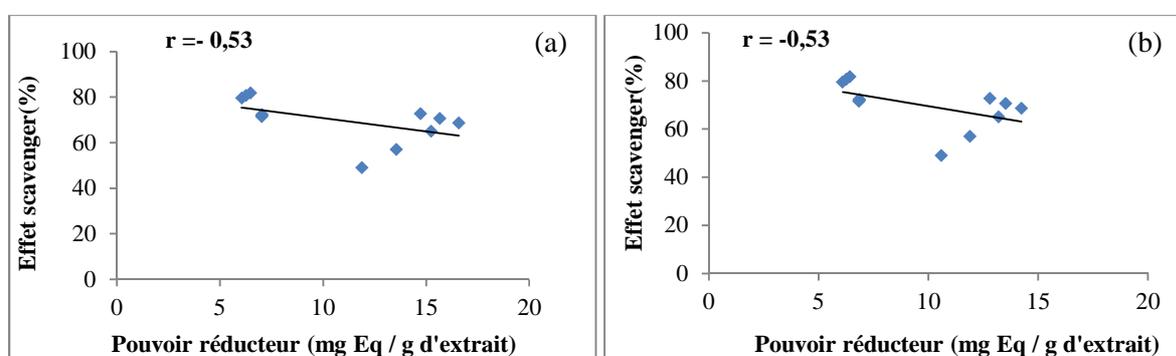


Figure N°19: Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et le pouvoir réducteur (FRAP) en équivalent (a) acide ascorbique, (b) acide caféique des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*

Résumé

Ce travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydant des extraits et fractions des feuilles et des graines d'une plante médicinale locale, il s'agit de *Pistacia lentiscus*. Les résultats du dosage des composés phénoliques de ces extraits a révélé une richesse de ceux des feuilles en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, alors que ceux des graines n'ont montré que des teneurs appréciables en tannins. Les extraits aqueux des feuilles ont exhibé les meilleures activités antioxydant où l'extrait aqueux du chloroforme enregistre un pouvoir réducteur de 657,86 mg Eq A Asc/g d'extrait, et la meilleure activité antiradicalaire contre l'ABTS^{•+} (IC₅₀ = 1 µg/ml), alors que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle présente l'effet scavenger le plus élevé contre l'anion superoxyde (IC₅₀=37,99 µg/ml). Les extraits des graines enregistrent de faibles pouvoir réducteur et scavenging du radical ABTS^{•+} dont le meilleur effet est de 46,58%, exhibé par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, cependant, aucun effet contre le O₂⁻ n'a été obtenu par les extraits de graines. Quant à l'activité scavenging du ·NO, les extraits de graines ont montré d'excellents résultats à 100µg/ml, l'extrait aqueux acétate d'éthyle et l'extrait ethanologique manifestent les meilleures activités (IC₅₀ = 1,56 et 2,42 µg/ml, respectivement), comparativement à celles des molécules de référence utilisées. Pour les feuilles, les extraits organiques de chloroforme et acétate d'éthyle enregistrent les valeurs d'IC₅₀ de 2,71 et de 4,40µg/ml, respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographiques sur colonne des extraits actifs des graines et des feuilles a révélé les mêmes fractions actives pour tous les tests antioxydant à l'exception du test anti-·NO, ayant révélé une bonne activité plus au moins proche entre toutes les fractions que ce soit celles des extraits de feuilles ou celles des graines. La caractérisation des fractions actives par CCM, a révélé leur diversité en métabolites secondaires dont les composés phénoliques et les terpènes, qui sont à l'origine de diverses activités biologiques.

Mots clés : *Pistacia lentiscus*, pouvoir réducteur (FRAP), activité anti-radicalaire (ABTS^{•+}, O₂⁻, ·NO), fractions, caractérisation, CCM

Abstract

This study aimed to evaluate the antioxidant activity of extracts and chromatographic fractions leaves and seeds of *Pistacia lentiscus*, a local medicinal plant. Results concerning the content of phenolic compounds reveal that the leaves extracts are the richest in total phenols, flavonoids and tannin, whereas those of seeds showed only appreciable amounts of tannins. Leaves aqueous extracts exhibited the best antioxidant activity, when aqueous chloroform extract register reducing capacity of 657.86 mg Eq A Asc/g extract, and the best antiradical activity against ABTS^{•+} (IC₅₀=1 µg/ml), Moreover aqueous extract of ethyl acetate showed the highest scavenging effect against O₂⁻ (IC₅₀= 114,84 µg/ml), Whereas seeds extracts have a weak reducing activities and no scavenging effect against O₂⁻, aqueous extract of ethyl acetate exhibited the best scavenging activity against ABTS^{•+} with 46,58%. Seeds extracts showed excellent scavenging activity against ·NO (100µg/ml), where aqueous of ethyl acetate and ethanolic extracts showed lower IC₅₀ (1,56 et 2,42 µg/ml) than standards. In the meantime, leaves organic extracts of chloroform and ethyl acetate register IC₅₀ 2,71 and 4, 40µg/ml, respectively. Fractionation of active extracts allowed the isolation of fractions responsible for antioxidant activity. The characterization of the active fractions by TLC, revealed their diversity of secondary metabolites such as phenolic compounds and terpenes, involved in various biological activities.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, reducing power (FRAP), antiradical activity (ABTS^{•+}, O₂⁻, ·NO), fraction, characterization, TLC

ملخص

يهدف هذا العمل لتقييم النشاطات المضادة للأوكسدة للمستخلصات و الأجزاء الكروماتوجرافية لأوراق و بذور *Pistacia lentiscus* نبة طبية محلية. كشفت نتائج تقييم المركبات الفينولية عن غنى مستخلصات الأوراق مقارنة بالبذور. المستخلصات المائية للأوراق أظهرت أفضل الأنشطة المضادة للأوكسدة: مستخلص الكلوروفورم أظهر أكبر قدرة إرجاع (PARF)، وأفضل قدرة مضادة للجذر ABTS^{•+} (IC₅₀ = 1 ميكغ/مل)، في حين أن المستخلص أصيظاط الإيثيل له تأثير أعلى ضد O₂⁻ (IC₅₀ = 37,99 ميكغ/مل). مستخلصات البذور أظهرت أفضل الأنشطة المضادة للأوكسدة، بحيث أفضل قدرة مضادة للجذر ABTS^{•+} بلغت 46,5% سجلت للمستخلص أصيظاط الإيثيل. بالإضافة لم تسجل أي قدرة ضد O₂⁻. أما بالنسبة لتقييم القدرة المضادة لـ ·NO، أظهرت مستخلصات البذور نتائج ممتازة بتركيز 100 ميكغ/مل، والمستخلص أصيظاط الإيثيل والإيثانول أظهرت أفضل النتائج (IC₅₀ = 1,56 و 2,42 ميكغ/مل). مستخلصات العضوية الكلوروفورم والإيثيل للأوراق سجلت قيم 2,71 و 4,40 ميكغ/مل، على التوالي.

تقييم النشاطات المضادة للأوكسدة للأجزاء الكروماتوجرافية CCM للأوراق والبذور أظهر نفس الأجزاء الفعالة المضادة للأوكسدة (قدرة الإرجاع. القدرة المضادة للجذور عدا ·NO)، وأظهرت نتائج CCM غنى هذه النبتة من حيث المركبات الفينولية و التربينية التي تعتبر مسؤولة عن أنشطة بيولوجية مختلفة.

مفتاح الكلمات

Pistacia lentiscus, أكبر قدرة الإرجاع (FRPA), قدرة مضادة للجذور (ABTS^{•+}, O₂⁻, ·NO), الأجزاء الكروماتوجرافية, CCM.

