

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de Biologie

Laboratoire de recherche des Produits

Naturels (LAPRONA)

MÉMOIRE

Présenté par

BELHOCINE Ikram & NABIB Imane

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie Fondamentale

Thème

**Étude phytochimique et biologique des extraits de
*Pistacia atlantica***

Soutenu le 26/09/2020, devant le jury composé de :

Présidente	Mme. ATIK-BEKKARA F.	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU N.	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	Mr. BELYAGOUBI L.	M.C.A	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019 - 2020



Remerciements

Nous remercions avant tout **ALLAH** le tout-puissant, pour nous avoir donné la santé, la force, la volonté, la patience et le courage d'effectuer ce modeste travail.

Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire de Recherche des Produits Naturels (LAPRONA), sous la direction de **Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**.

Tout d'abord, nous tenons plus particulièrement nos sincères remerciements à **Mr. BELYAGOUBI Larbi**, Maître de Conférences Classe A, à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, pour avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail de recherche malgré sa responsabilité au niveau du département, grâce à son intérêt pour son soutien scientifique et sa méthode dans la discussion et le développement de ce sujet est grâce à ses précieux conseils, sa gratitude, sa gentillesse, et surtout sa patience, tous au long de ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à **Mme. ATIK-BEKKARA Fawzia**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions profondément **Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, membre de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement la doctorante **Mme. BENMAHIEDDINE Assia**, à l'Université de Tlemcen pour l'énorme contribution qu'elle a apportée dans ce travail, surtout durant la période de pratique. Nous vous remercions de nous transmîtes la rigueur nécessaire à la réussite des essais, et surtout merci pour votre gentillesse.

Sans oublier de remercier tous les membres du laboratoire (LAPRONA) surtout la doctorante **GHELLAI Imane** et le doctorant **BOUTRIF Otmane**.

Enfin, nous exprimons nos reconnaissances à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à accomplir ce modeste travail.

Dédicaces

*Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui
j'ai donné la
force et la patience d'accomplir ce Modeste travail. Je veux dédier cet humble
travail à :*

*Mes chers parents, pour leurs sacrifices, leur amour et leurs prières tout au
long de mes études.*

Mon grand-père et mes grandes mères

*Mes chères frères Mounir et Farouk pour leurs encouragements permanents,
et leur soutien moral.*

*Ma chère sœur Hadjar pour son appui et encouragement, que dieux vous
protège.*

Mon binôme

Tous mes amis

Ikram

Dédicaces

À l'aide d'ALLAH, J'ai réussi à compléter ce modeste travail que je dédie du

fond de mon cœur à :

Mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Mon grand père et mes grandes mères.

Ma sœur Chaimae et mon frère Abdelkader.

Tous les membres de ma famille.

Mon binôme.

Mes amies et mes camarades de la promotion.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du

moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

Imane

Table des matières

Introduction générale.....	2
Partie matériel et méthodes	
I. Matériel végétal.....	6
I.1. Objectifs du travail.....	6
I.2. Choix du matériel végétal.....	6
I.3. Situation géographique de la station d'échantillonnage.....	7
I.4. Séchage et broyage des échantillons.....	7
II. Préparation des extraits et dosage phytochimiques.....	8
II.1. Préparation des extraits bruts.....	8
II.2. Préparation de l'extrait brut des anthocyanes	9
II.3. Préparation de l'extrait hydrolysé des anthocyanes.....	9
II.4. Dosage phytochimiques.....	9
II.4.1. Dosage des phénols totaux.....	9
II.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	10
II.4.3. Dosage des tanins condensés.....	11
II.4.4. Dosage des anthocyanes.....	11
III. Étude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien	12
III.1. Étude du pouvoir antioxydant.....	12
III.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT).....	12
III.1.2. Réduction de fer.....	12
III.1.3. Test du piégeage du radical libre DPPH	13
III.1.4. Test du blanchiment de β -carotène.....	14
III.2. Étude du pouvoir antimicrobien.....	15
III.2.1. Souches testées.....	15
III.2.2. Préparation de l'inoculum.....	15
III.2.3. Ensemencement	16
III.2.3.1. Méthode de diffusion sur gélose.....	16
III.2.3.2. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB et CMF).....	17
III.3. Analyse statistique.....	20

Partie résultats et discussion

I. Rendements et dosages des composés phénoliques.....	22
I.1. Étude phytochimique.....	22
I.1.1. Rendement des extraits bruts de <i>P. atlantica</i>	22
I.1.2. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés	23
I.1.3. Dosage des anthocyanes dans les fruits.....	24
II. Étude de l'activité antioxydante.....	25
II.1. Capacité antioxydante totale (CAT).....	25
II.2. Réduction de fer	26
II.3. Piégeage du radical libre DPPH.....	27
II.4. Test du β -carotène.....	28
III. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes.....	29
III.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques).....	29
III.2. Méthode en milieu liquide.....	32
Conclusion et perspectives.....	35
Références bibliographiques.....	37

Liste des abréviations

BHA : Butylhydroxyanisole

BMH : Bouillon Mueller-Hinton

BS : Bouillon Sabouraud

CAT : capacité antioxydante totale (*Total antioxidant capacity*)

CMB : concentration minimale bactéricide

CMF : concentration minimale fongicide

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthyle Sulfoxyde

DPPH : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAA : Équivalents d'acide ascorbique

EAG : Équivalents d'acide gallique

EC : Équivalent de catéchine

EC₅₀ : concentration inhibitrice à 50 %, (The efficient concentration) : La concentration efficace

EQ : Équivalents de quercétine

FRAP : ferric reducing antioxidant power

GMH : Gélose Mueller-Hinton

GS : Gélose Sabouraud

INT : *p*-iodonitrotétrazolium

MS : matière sèche

UFC : unité formant colonie

Liste des figures

Figure 1 : Les parties de la plante utilisées dans cette étude.....	6
Figure 2 : Situation géographique du site de la récolte (Encarta, 2007).....	7
Figure 3 : Les parties broyées de <i>P. atlantica</i>	8
Figure 4 : Etapes d'obtention des extraits bruts des bourgeons mâles et femelles et les grains de pollen.....	8
Figure 5 : Spectrophotomètre de type SPECORTD 200 Plus.....	10
Figure 6 : Plaque 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.....	18
Figures 7 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations.....	29
Figures 8 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations.....	30
Figure 9 : Effet antimicrobien de l'extrait hydrolysé des anthocyanes sur les bactéries.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques de station d'étude.....	7
Tableau 2 : Souches utilisées dans tests d'activité antimicrobienne.....	15
Tableau 3 : Concentrations et masses de l'extrait brut des anthocyanes de <i>P. atlantica</i> dans les puits.....	19
Tableau 4 : Concentrations et masses de l'extrait hydrolysé des anthocyanes de <i>P. atlantica</i> dans les puits.....	19
Tableau 5 : Rendement en pourcentage des extraits bruts de <i>P. atlantica</i>	22
Tableau 6 : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits bruts de <i>P. atlantica</i>	23
Tableau 7 : Propriétés antioxydants des extraits bruts de <i>P. atlantica</i>	25
Tableau 8 : Concentrations CMI et CMB des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes sur les souches testées.....	32

الملخص

من أجل تثمين أجزاء مختلفة من نبات *Pistacia atlantica* ، تم اختيار البراعم الذكورية والأنثوية وحبوب اللقاح والأنثوسيانين من الثمار غير الناضجة عن طريق قياس مستويات المركبات الفينولية وتقييم خصائص مضادات الأكسدة، ثم النظر في دراسة النشاط المضاد للميكروبات للأنثوسيانين.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أفضل مردود وجد عند براعم الذكور بنسبة $(2.828 \pm 30.60 \%)$ مع العلم أن المستخلصات الخام من براعم الذكور والإناث كانت غنية بالفينولات الكلية (636.8312 ± 4.7285 et 4.1016 ± 0.5379 et 6.0223 ± 0.6240 mg) و العفص المكثف (648.9711 ± 4.8013 mg EAG/g MS) (EC/g MS) على التوالي، في حين أن مستخلص الخام لحبوب اللقاح كان غنيا بالفلافونيدات (15.5341 ± 1.2002 mg EC/g MS) وكان محتوى الأنثوسيانين المسجل في الثمار غير الناضجة 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$.

كشفت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلص الخام من براعم الذكور لديه أفضل قدرة إجمالية لمضادات الأكسدة (115.0790 ± 3.3804 mg EAA/g MS). من ناحية أخرى، فإن النشاط المضاد للجذور الأكثر إثارة للاهتمام بترتيب 0.1702 ± 0.014 mg/mL يعود للمستخلص الخام للبراعم الأنثوية. فيما يتعلق بالأنثوسيانين، أظهرت المستخلصات المائية والخام قدرات كبيرة لتقليل الحديد $EC_{50} = 0.029 \pm 0.002$ et 0.054 (± 0.0018 mg/mL) على التوالي، وتثبيط تبيض البيتا كاروتين $EC_{50} = 0.026 \pm 0.003$ et 0.0808 ± 0.025 (mg/mL) على التوالي.

بالنسبة للنشاط المضاد للميكروبات، كانت سلالات *B. cereus* و *M. luteus* و *B. subtilis* هي الأكثر حساسية لمستخلصات الأنثوسيانين المائية والخام مع أقل تركيز CMI يساوي 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

الكلمات المفتاحية: *Pistacia atlantica* ، البراعم ، حبوب اللقاح ، الثمار غير الناضجة ، الدراسة الكيمونباتية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات.

Résumé

A fin de valoriser les différentes parties de la plante *Pistacia atlantica*, les bourgeons mâles et femelles, les grains de pollen et les anthocyanes des fruits immatures ont été sélectionnés en quantifiant les teneurs en composés phénoliques et en évaluant les propriétés antioxydantes. L'étude de l'activité antimicrobienne des anthocyanes a été envisagée.

Les résultats obtenus ont révélé le meilleur rendement (30.60 ± 2.828 %) chez les bourgeons mâles. Notant que les extraits bruts des bourgeons mâles et femelles étaient riches en phénols totaux (636.8312 ± 4.7285 et 648.9711 ± 4.8013 mg EAG/g MS) et en tanins condensés (4.1016 ± 0.5379 et 6.0223 ± 0.6240 mg EC/g MS) respectivement, alors que l'extrait brut des grains de pollen était riche en flavonoïdes (15.5341 ± 1.2002 mg EC/g MS). La teneur en anthocyanes enregistrée dans les fruits immatures était de 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$.

L'étude du pouvoir antioxydant a dévoilé que l'extrait brut des bourgeons mâles détient la meilleure capacité antioxydante totale (115.0790 ± 3.3804 mg EAA/ g MS). Par contre, l'activité anti-radicalaire la plus intéressante de l'ordre de 0.1702 ± 0.0140 mg/ mL est marquée par l'extrait brut des bourgeons femelles. Concernant les anthocyanes, les extraits hydrolysés et brut ont présenté des capacités importantes à réduire le fer ($\text{EC}_{50} = 0.029 \pm 0.002$ et 0.054 ± 0.0018 mg/mL, respectivement) et à inhiber le blanchiment du β -carotène ($\text{EC}_{50} = 0.026 \pm 0.003$ et 0.0808 ± 0.025 mg/mL, respectivement).

Pour l'activité antimicrobienne, les souches *B. cereus*, *M. luteus* et *B. subtilis* étaient les plus sensibles aux extraits hydrolysés et brut des anthocyanes avec une concentration de CMI la plus faible de 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

Mots clés : *Pistacia atlantica*, Bourgeons, Grains de pollen, Fruits immatures, Etude phytochimique, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne.

Abstract

To enhance the different parts of *Pistacia atlantica* plant, the male and female buds, pollen grains and anthocyanins of unripe fruits were selected by quantifying the levels of phenolic compounds and evaluating antioxidant properties. The study of antimicrobial activity of anthocyanins was investigated.

The results showed that the best yield ($30.60 \pm 2.828\%$) was in male buds. Noting that the crude extracts of male and female buds were rich in total phenols (636.8312 ± 4.7285 and 648.9711 ± 4.8013 mg GAE/g DM) and condensed tannins (4.1016 ± 0.5379 and 6.0223 ± 0.6240 mg CE/g DM) respectively, while the crude extract of pollen grains was rich in flavonoids (15.5341 ± 1.2002 mg CE/g DM). The anthocyanin content recorded in unripe fruit was 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$.

The study of antioxidant power revealed that the crude extract of male buds has the best total antioxidant capacity (115.0790 ± 3.3804 mg AAE/g DM). On the other hand, the most interesting anti-radical activity was marked by the crude extract of female buds in the range of 0.1702 ± 0.0140 mg/mL. For anthocyanins, hydrolyzed and crude extracts had a significant reducing capacity ($\text{EC}_{50} = 0.029 \pm 0.002$ and 0.054 ± 0.0018 mg/mL, respectively), and an important inhibitory capacity in the β -carotene bleaching test ($\text{EC}_{50} = 0.026 \pm 0.003$ and 0.0808 ± 0.025 mg/mL, respectively). For antimicrobial activity, *B. cereus*, *M. luteus* and *B. subtilis* strains were most sensitive to hydrolyzed and crude extracts of anthocyanins with the lowest MIC concentration of 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Pistacia atlantica*, Buds, Pollen Grains, Unripe fruits, Phytochemical study, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

Introduction générale

Le genre *Pistacia* (Anacardiaceae) comprenant plus de 11 espèces est largement réparti du sud-ouest de l'Asie au nord-ouest de l'Afrique (Samavati et Adeli, 2014). Outre l'Iran, il pousse dans différents pays comme le Pakistan, la Grèce, la Turquie et l'Afrique du Nord (Yousfi et al., 2009).

En Algérie, il existe trois espèces sauvages de *Pistacia*: *P. atlantica* Desf. ssp. *atlantica* qui présente une forte variabilité morphologique (Belhadj et al., 2008), *P. lentiscus* L. et moins fréquemment *P. terebinthus* L (Ait Said et al., 2011).

Pistacia atlantica est une plante médicinale et occupe une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Cette espèce est connue pour ses activités antioxydante (Rezaie et al., 2015 ; Ben Ahmed et al., 2016 ; Hasheminya et Dehghannya, 2020), antimicrobienne (Sharifi et al., 2012 ; Hatamnia et al., 2014 ; Rigane et al., 2017 ; Tahir et al., 2019), anti-inflammatoire (Bozorgi et al., 2013 ; Minaiyan et al., 2015), antipyrétique, antidiabétique (Hashemnia et al., 2015 ; Ben Ahmed et al., 2018), cytotoxique, anticancéreuse (Rezaei et al., 2012 ; Rahman, 2018 ; Eghbali-Feriz et al., 2018), activité antiproliférative et anticholinestérase (Achili et al., 2020). D'autres travaux antérieurs ont reporté l'utilisation de cette plante comme antiseptique, antifongique, antivirale et contre certaines maladies abdominales (Ghalem et Mohamed, 2009 ; Daoudi et al., 2013 ; Sifi et Yousfi, 2019).

Les fruits et la résine de cette plante ont été utilisés pour le traitement de nombreuses maladies comme par exemple: les troubles gastro-intestinaux supérieurs et inférieurs, la dyspepsie (Rezaei et al., 2012; Tanideh et al., 2014), l'ulcère de l'estomac (Zarshenas et al., 2012 ; Saber-Tehrani et al., 2013), les vomissements (Belhadj, 2002), la diarrhée (Yousfi et al., 2002 ; Adams et al., 2009), les infections de la gorge, les calculs rénaux, la jaunisse, l'asthme, la paralysie, les accidents vasculaires cérébraux, le tétanos, les convulsions, les tremblements et les maux de tête (Daoudi et al., 2013 ; Mahjoub et al., 2018) et l'eczéma (Bozorgi et al., 2013 ; Peksel et al., 2013). Les fruits sont aussi efficaces pour la cicatrisation des plaies, la gale, les fissures des lèvres et la chute des cheveux. (Yousfi et al., 2005 ; Mahjoub et al., 2018). La résine est un renforçateur des tissus des gencives et est utile pour les fractures osseuses et les troubles musculo-squelettiques. Le fruit a été utilisé pour les maux de dos en raison de ses propriétés analgésiques (Mahjoub et al., 2018).

En Algérie, les fruits de *Pistacia atlantica* sont des drupes comestibles ovales et aplaties, ils sont riches en huile dense très énergétique. Ils ont été nommés ElKhodiri par les populations algériennes, en raison de sa couleur vert foncé à sa maturité.

Le mélange des dattes écrasées et l'huile de *P. atlantica* est consommé avec le lait. L'huile est également utilisée comme substitut du beurre en raison de son goût similaire. Concernant les grains, ils sont séchés et broyés pour être mélangés avec de l'eau sucré sous forme des boulettes (**Belhadj, 2001**).

L'analyse phytochimique de différentes parties de la plante a été l'objet de quelques études. En effet, les extraits de fruits ont montré la présence d'acides gras, de stéroïdes, d'acides phénoliques, des flavonoïdes et des flavones (**Kawashty et al., 2000 ; Benhassaini et al., 2007 ; Topçu et al., 2007 ; Yousfi et al., 2009**), des gallotanins (**Wei et al., 2002 ; Zhao et al., 2005**) et des phénols simples tels que l'acide gallique et l'acide ρ -coumarique (**Benhammou et al., 2008**). Les extraits des feuilles et des racines contiennent des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins (**Bozorgi et al., 2013 ; Ben Ahmed et al., 2017 ; Toul et al., 2017**). D'autres groupes chimiques caractérisent l'huile des fruits du pistachier de l'Atlas : les triterpénoïdes, les acides gras insaturés comme les acides oléique (46-51%), linoléique (27.5-30%), palmitique (24 %), palmitoléique (1.23–5.73 %), stéarique (1.48–2.61 %), linoléique (0.95–1.5 %), les stéroïdes et les triglycérides (**Yousfi et al., 2005 ; Benhassaini et al., 2007 ; Saber-Tehrani et al., 2013**). Cependant, les huiles essentielles de différentes parties de *P. atlantica* (fruits, feuilles) étaient constitués principalement des monoterpènes comme les hydrocarbures, le myrcène, le sabinène, le p-cymène et le terpinène-4-ol (**Barrero et al., 2005 ; Tzakou et al., 2007 ; Sifi et al., 2015 ; Benabdallah et al., 2017**), l'oléorésine riche en monoterpènes hydrocarbonés où l' α -pinène et limonène représentent les composants majeurs dans cette plante (**Delazar et al., 2002 ; 2004 ; Barrero et al., 2005 ; Benhassaini et al., 2008 ; Benabdallah et al., 2017**).

Les monoterpènes hydrocarbonés tels l' α -pinène + α -thujène (4.54 - 66.61%) et le spathuléol (0.46 – 32.64%) représentent constituants majeurs suivie par les sesquiterpènes dans les feuilles de *P. atlantica* (**Gourine et al., 2010**). Hispolone 2 est un nouvel antioxydant naturel a été isolé à partir de l'extrait méthanolique et identifier comme un composé principal (**Yousfi et al., 2009**).

L'activité du piégeage des radicaux DPPH des extraits des fruits et des feuilles de *P. atlantica* dépendait des teneurs en phénol et en flavonoïdes (**Malekzadeh et al., 2015**).

Introduction générale

L'extrait des feuilles de *P. atlantica* est constitué plus de treize composés phénoliques, appartenant aux acides hydroxy-benzoïques et aux gallotannins, qui sont responsable de l'inhibition des enzymes clés du diabète -2 (sept composés contre α -amylase et six composés contre α -glucosidase) et aussi huit composés contre l'hypertension par l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine -1(ACE-1) (**Ben Ahmad et al., 2018**). D'autres travaux ont révélé la présence des composés phénoliques et les dérivés de myricétine, de kaempférol, de quercétine, la naringénine, la catéchine, l'acide caféique, l'apigénine, l'acide benzoïque, la rutine, l'épicatéchin et l'acide gallique et ses dérivés dans les feuilles de *P. atlantica* (**Amri et al., 2018 ; Benamar et al., 2018 ; Nachvak et al., 2018 ; Achili et al., 2020**). Récemment, l'étude sur l'huile des fruits non mûrs de *P. atlantica* était caractérisée par sa richesse en acide linoléique ($31.63\% \pm 3.64\%$) et en composés phénoliques (2.51 mg pour 100 g d'huile) (**Bentireche et al., 2019**).

D'après nos recherches, il n'y a pas des travaux réalisés sur les bourgeons mâles, femelles et les grains de pollens ainsi que les anthocyanes des fruits de *P. atlantica*. Pour cela nous avons voulu valoriser ces différentes parties citées en quantifiant les teneurs en composés phénoliques et en évaluant les propriétés antioxydantes. L'étude de l'activité antimicrobienne des anthocyanes est aussi envisagée.

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Objectifs du travail

Pistacia atlantica est une plante utilisée traditionnellement dans le traitement de nombreuses maladies telles que l'eczéma, la paralysie, la diarrhée, le diabète, l'asthme et les maux d'estomac. Notre travail est un suivi de plusieurs études de nos collègues dans le laboratoire de recherche des Produits Naturels sur cette espèce. Pour cela, nous avons essayé de valoriser les bourgeons mâles et femelles et les grains de pollens. L'interprétation et discussion des résultats des travaux antérieurs portant sur l'extraction, le dosage et les propriétés antioxydantes des anthocyanes à partir des fruits immatures de cette plante ont été aussi envisagées.

I.2. Choix du matériel végétal

La récolte des bourgeons mâles, femelles et les grains de pollen de la plante *P. atlantica* a été effectuée dans la station Oudjlida de la Wilaya de Tlemcen pendant le mois de février 2020. Tandis que la récolte des fruits immatures a été effectuée dans la station Ain Fezza (Wilaya de Tlemcen) pendant le mois de juin 2016 (Travail antérieur).

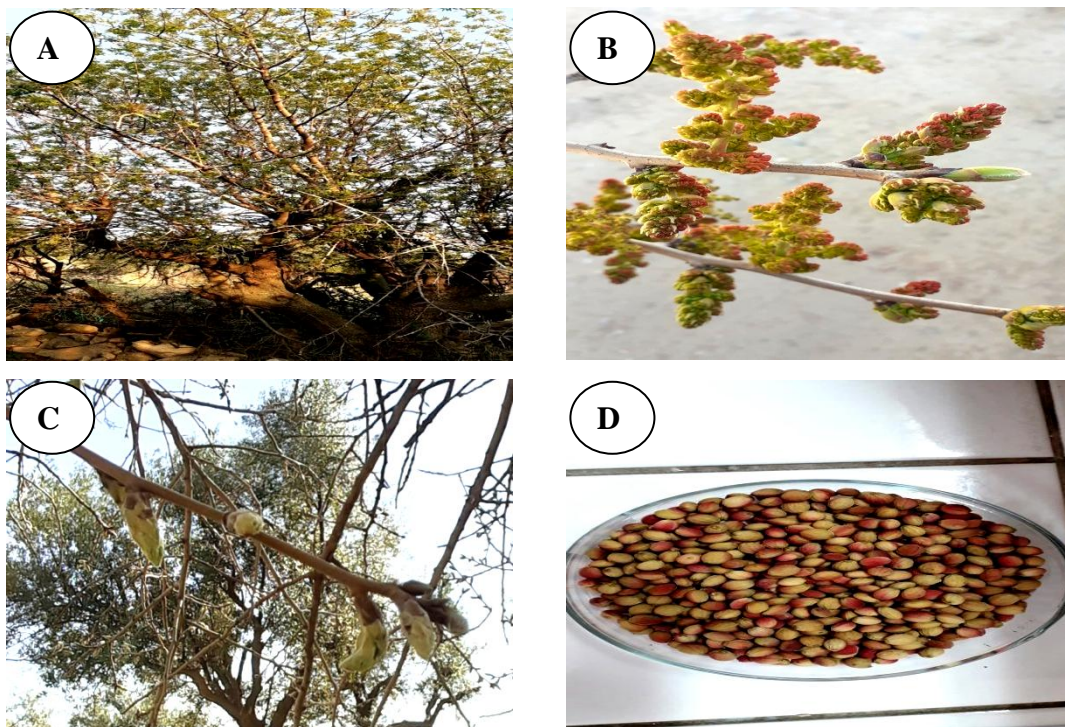


Figure 1 : Les parties de la plante utilisées dans cette étude.

A : Arbre de *P. atlantica* ; **B** : Bourgeons mâles ; **C** : Bourgeons femelles ; **D** : Fruits immatures.

I.3. Situation géographique de la station d'échantillonnage

Les caractéristiques géographiques de la station d'étude de notre récolte sont représentées dans le **tableau 1** et la (**Figure 2**).

Tableau 1 : Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques de station d'étude

Station	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	Etage bioclimatique
Oudjlida (Tlemcen)	2°23'	47°4'	500	Semi-aride tempéré
Ain Fezza (Tlemcen)	1°17'	34°55'	730	Semi-aride tempéré

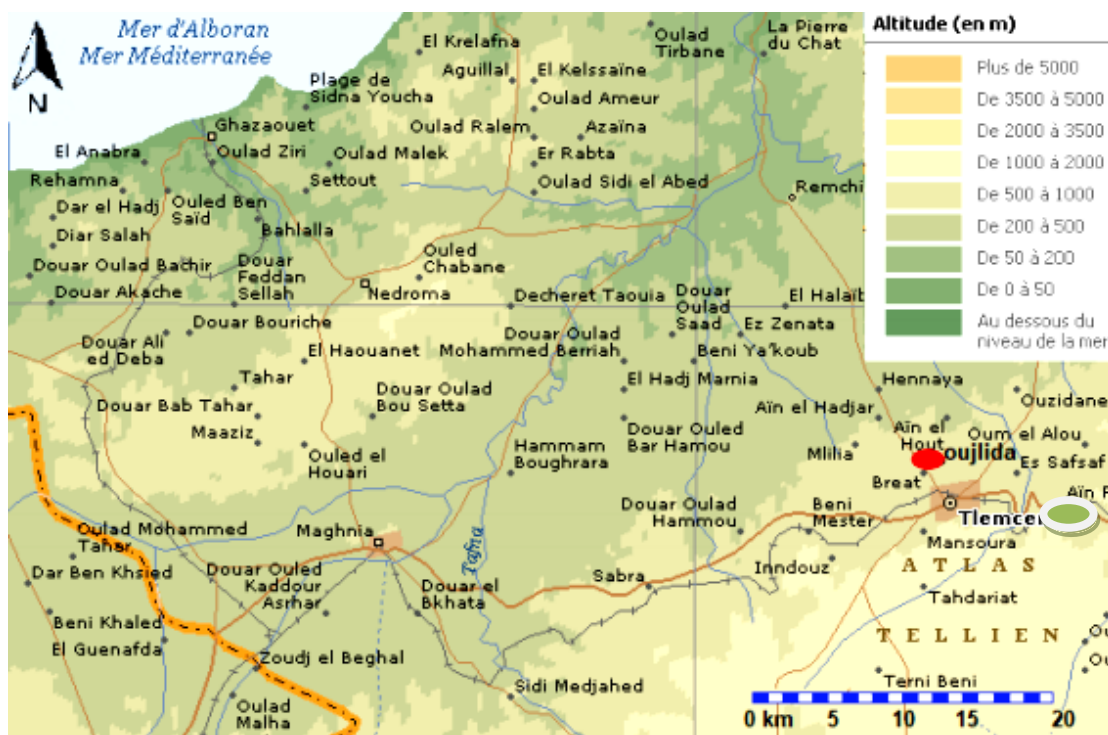


Figure 2: Situation géographique du site de la récolte (Encarta, 2007).

● : Oudjlida ○ : Ain Fezza

I.4. Séchage et broyage des échantillons

Les bourgeons mâles et femelles de *P. atlantica* ont été séchés dans un endroit aéré et à l'abri de la lumière à une température ambiante. Les grains de pollen sont extraits à partir des bourgeons mâles par tamisage. Après séchage, les bourgeons mâles et femelles ont été broyés afin d'obtenir une poudre, puis conservés au congélateur dans des flacons en verre (**Figure 3**).

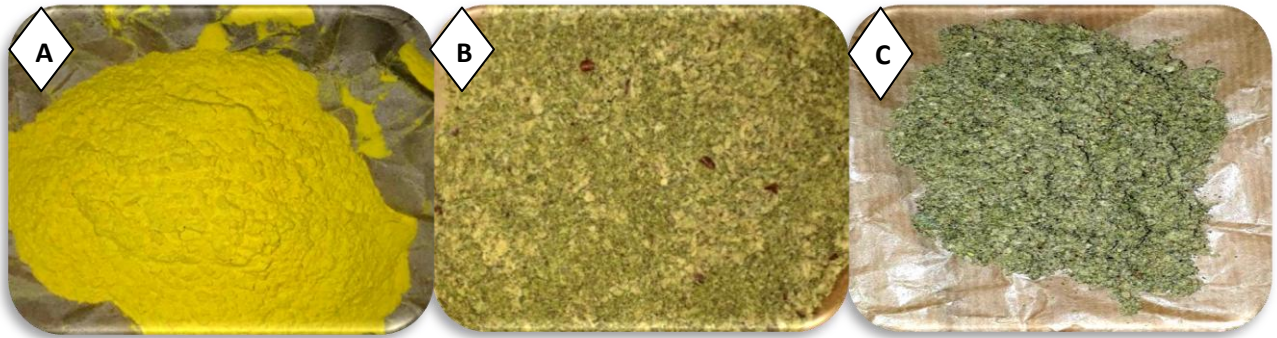


Figure 3 : Les parties broyées de *P atlantica*. (A) : Grains de pollen ; (B) : Bourgeons mâles ; (C) : Bourgeons femelle.

II. Préparation des extraits et dosage phytochimiques

II.1. Préparation des extraits bruts

Les extraits hydro-méthanoliques sont obtenu en ajoutant 2 g de chaque parties (bourgeons mâles, bourgeons femelles et des grains de pollen) de *P. atlantica* à 60 mL d'un mélange méthanol/eau distillée (70 % /30 %) (Bekkara *et al.*, 1998). Les mélanges sont bien agités et laissés macérer pendant 24 h à température ambiante et à l'abri de la lumière, après on les filtre sur du papier filtre de diamètre 150 mm. Ensuite, les filtrats obtenus sont évaporés à sec à 50 °C en utilisant un évaporateur rotatif de type **HAHNVAPORH S-2005V-N**. Les extraits secs sont pesés et récupérés par Diméthyle Sulfoxide (DMSO) (3 mL pour les bourgeons mâles, 4 mL pour les bourgeons femelles et 3.5 mL pour les grains de pollen), puis conservés dans des tubes à hémolyse à 4.5 °C jusqu'à leur utilisation. (Figure 4).

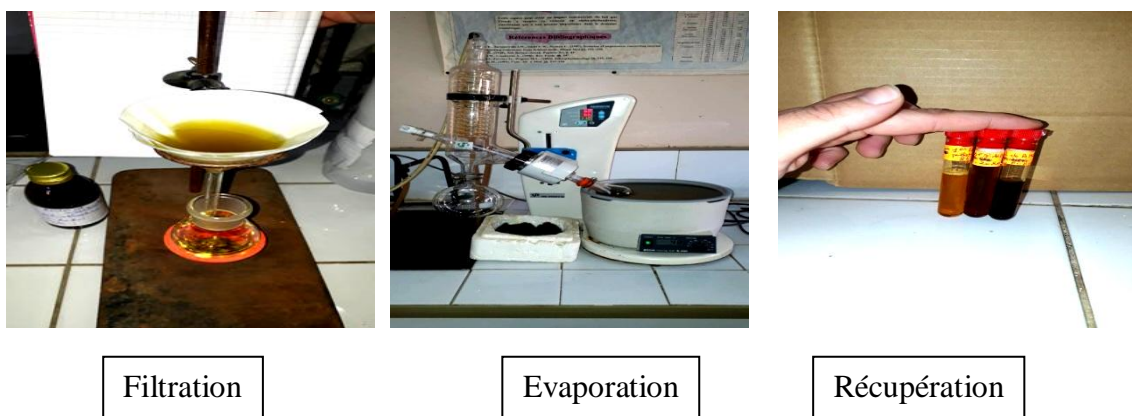


Figure 4 : Etapes d'obtention des extraits bruts des bourgeons mâles et femelles et les grains de pollen.

II.2. Préparation de l'extrait brut des anthocyanes

Après dégraissage des fruits, une quantité de 2.5 g de la poudre est macérée dans 12.5 mL (HCl/ MeOH ; v/v ; 0.1%) pendant 72 h. Après filtration, le filtrat est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif de type **HAHNVAPOR HS-2005V-N**, puis pesé et récupéré dans 3 mL de méthanol.

II.3. Préparation de l'extrait hydrolysé des anthocyanes

L'hydrolyse acide se fait selon la technique décrite par (**Chaovanalikit *et al.*, 2004**) avec une légère modification. Un volume de 3 mL d'extrait des anthocyanes est mélangé avec 15 mL HCl (2N), puis le mélange est placé dans le bain marie pendant 1h 30 min à 100 °C. Après refroidissement, un lavage avec l'acétate d'éthyle a été procédé en utilisant l'ampoule à décanter pour récupérer la phase organique qui est formée par les aglycones.

- **Calcul du rendement d'extraction**

Les rendements des extraits sont obtenus selon la formule suivant :

$$\mathbf{R\ (\%) = ((P_E - P_0) / P) \times 100}$$

Où **R** : Rendement exprimé en % ; **PE** : Poids du ballon après évaporation ; **P0** : Poids du ballon avant évaporation ; **P** : Masse de la poudre.

II.4. Dosage phytochimiques

Les extraits hydro-méthanoliques obtenus des bourgeons mâles, femelles et des grains de pollen de *P. atlantica* sont analysés pour quantifier les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés. Le dosage des anthocyanes a été fait sur l'extrait brut des anthocyanes des fruits.

II.4.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux est déterminé par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de (**Singleton et Rossi, 1965**). Le réactif est réduit lors de l'oxydation de phénol, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène, l'absorption est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm.

Une prise de 200 μL de l'extrait dilué a été introduite dans des tubes à essais, puis 1000 μL du réactif du Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 800 μL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5% sont additionnés. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min à l'abri de la lumière et à une température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765nm contre le blanc à l'aide d'un spectrophotomètre **SPECORD 200 Plus** (Figure 5). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif afin d'exprimer les teneurs en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG /g MS). Les expériences sont répétées trois fois.



Figure 5: Spectrophotomètre de type **SPECORD 200 Plus**.

II.4.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est déterminé en utilisant la technique de (**Zhishen et al., 1999**). Une quantité de 500 μL de l'extrait dilué est mélangée avec 1500 μL d'eau distillée, suivi par 150 μL de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5%. Après 5 min, 150 μL de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % est ajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 μL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance est déterminée à 510 nm contre le blanc à l'aide d'un **spectrophotomètre SPECTROD 200 Plus**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS). Les expériences sont répétées trois fois.

II.4.3. Dosage des tanins condensés

La quantité des tanins condensés est déterminée par la méthode de vanilline en milieu acide (**Julkunen-titto, 1985**). Cette méthode est basée sur la capacité de vanilline en présence d'HCl à réagir avec les tanins, l'absorbance est mesurée à 550 nm.

Un volume de 50 μL de l'extrait dilué est ajouté à 1500 μL de la solution vanilline/méthanol (4%) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μL de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre le blanc à l'aide d'un **spectrophotomètre SPECORD 200 Plus**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalents de la catéchine par gramme de la matière sèche (mg EC/g MS). Les expériences sont répétées trois fois.

II.4.4. Dosage des anthocyanes

La détermination de la teneur en anthocyanes a été effectuée selon la méthode de (**Wagner, 1979**). Une masse de 0.1 g de matière sèche végétale est macéré dans 10 mL du méthanol acidifié (Méthanol/ HCl : 99/1 ; V/V). L'extrait est maintenu à 25 °C pendant 24 h dans l'obscurité. Après la centrifugation à 4000 g pendant 5 min à température ambiante, la lecture de l'absorbance du surnageant se fait à une longueur d'onde de 550 nm. Pour calculer la quantité d'anthocyanines, nous avons utilisé le coefficient d'extinction 33 000 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ et le contenu en anthocyanes a été exprimé en $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche.

III. Étude des pouvoirs antioxydant et antimicrobien

III.1. Étude du pouvoir antioxydant

Nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits des bourgeons mâles et femelles, des grains de pollen et les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes de *P. atlantica* par 4 tests : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH, la réduction de fer et le β -carotène.

III.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

Ce test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdate Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo(V) à pH acide. Dans notre étude, la méthode adoptée est celle de (Prieto *et al.*, 1999).

Un volume de 300 μL de l'extrait dilué a été ajouté à 3 mL de solution de réactif (acide sulfurique 0.6M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les tubes ont été fermés et incubés à 95 °C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 mL de la solution CAT et 0.3 mL de l'eau distillée et il a été incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide ascorbique comme contrôle positif. Les valeurs de la CAT sont exprimées en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS). Les expériences sont répétées trois fois.

III.1.2. Réduction de fer

Cette technique a été basée sur la capacité de l'extrait testé à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) selon la méthode d'Oyaizu (1986). Des dilutions ont été préparées. Un volume de 500 μL de chaque dilution a été mélangé avec 1250 μL d'une solution tampon (0.2 M, pH=6.6) et 1250 μL de solution du ferricyanure de potassium [1% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$]. Le mélange a été incubé pendant 30 min à 50 °C, puis l'acide trichloroacétique à 10 % (1250 μL) a été ajouté. Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min, un volume du surnageant (1250 μL) a été mélangé avec l'eau distillée (1250 μL) et une solution fraîchement préparée de FeCl_3 (250 μL , 0.1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif.

La concentration EC_{50} est un indice utilisé pour comparer la capacité réductrice de l'extrait par rapport au contrôle positif. Elle est définie comme la concentration des antioxydants nécessaires à la réduction de 50% de la concentration initiale du ferricyanure de potassium.

III.1.3. Test du piégeage du radical libre DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrasyl)

Cette méthode permet de mesurer la capacité des antioxydants à réduire le radical DPPH sous sa forme non radicalaire (hydrazine), en acceptant un atome d'hydrogène selon (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Un volume de 50 μ L de différentes concentrations de l'extrait est ajouté à 1950 μ L de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/L) fraîchement préparée. Après incubation à l'abri de la lumière pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μ L du méthanol avec 1950 μ L de la solution méthanolique du DPPH à la même concentration utilisée. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Les pourcentages d'inhibition (%) du radical DPPH sont calculés à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (I \%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où A_C : représente l'absorbance du contrôle négatif ; A_E : représente l'absorbance de l'échantillon.

Pour comparer l'efficacité de ces extraits avec celle de l'acide ascorbique, nous avons calculé la concentration efficace EC_{50} (Efficient Concentration value) qui est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH à 50 %. Ce paramètre est déterminé en traçant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

III.1.4. Test du blanchiment de β -carotène

La capacité antioxydante est déterminé par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et des hydroperoxydes conjugués résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Anusuya *et al.*, 2012). Dans ce test, la méthode du (Sun et Ho, 2005) a été adoptée pour évaluer les capacités des extraits des bourgeons mâles et femelles, des grains de pollen et des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes de *P. atlantica* à inhiber le blanchiment de β -carotène. Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissous dans 10 mL du chloroforme. 1 mL de cette solution est prélevé dans un flacon contenant 200 mg de Tween 20 et 20 μ L d'acide linoléique. Cette solution est évaporée par un évaporateur rotatif jusqu'à ce que l'odeur du chloroforme disparaisse. Ensuite, un volume de 100 mL de l'eau distillée est ajouté au flacon et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, 200 μ L de différentes concentrations des extraits est ajouté à 4 mL de l'émulsion β -carotène/acide linoléique. Après avoir agité doucement, l'absorbance a été lue immédiatement ce qui correspond à $t = 0$ min à 470 nm contre le blanc contenant l'émulsion sans β -carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un bain marie pendant 120 min à 50 °C. Le témoin négatif est constitué par 200 μ L du méthanol au lieu de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse. L'absorption est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 470 nm après 120 min. Tous les échantillons sont répétés trois fois.

L'activité antioxydante exprimée en pourcentage d'inhibition (%) de l'extrait brut est évaluée en employant la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = [A_{E120} - A_{C120} / A_{C0} - A_{C120}] \times 100$$

Où : A_{E120} : Absorbance de l'échantillon après incubation de 120 min ; A_{C0} : Absorbance du contrôle négatif à t_0 ; A_{C120} : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 120 min.

La valeur EC_{50} est définie comme étant la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

III.2. Étude du pouvoir antimicrobien

III.2.1. Souches testées

L'étude de l'activité antimicrobienne des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes a été effectuée contre les souches de références mentionnées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Souches utilisées dans tests d'activité antimicrobienne.

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg	MNHN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAPSAB
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 25921	LAPRONA
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	MNHN
<i>Candida albicans</i>	Levure	CIP 444	LAPSAB
<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231	LAPRONA

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (**Paris**) ; **LAPRONA** : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen) ; **LAPSAB** : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie Synthèse et Activité Biologique.

III.2.2. Préparation de l'inoculum

- ✓ Une pré-culture des souches microbiennes et préparée dans le Bouillon B.M.H pour les bactéries et le bouillon B.S pour les levures afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance.
- ✓ Après 18-24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48 h d'incubation à 30 °C pour les levures, la turbidité est ensuite ajustée au standard McFarland 0.5 avec un colorimètre, ce qui correspond à $\approx 10^8$ UFC/mL pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm) et $\approx 10^6$ UFC /mL pour les levures (D.O = 0.08 à 0.1 / λ 625 nm).
- ✓ L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien le milieu (B.M.H ou B.S) stérile s'il est trop chargé.
- ✓ L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum (**Rahal, 2008 ; Vitali et al., 2016**).

III.2.3. Ensemencement

Les boîtes de Pétri sont coulées à une épaisseur de 4 mm, car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un résultat erroné. Ensuite, les boîtes sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant l'ensemencement afin d'éliminer l'humidité.

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ✓ L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- ✓ Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ✓ Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois (**Rahal, 2008**).

III.2.3.1. Méthode de diffusion sur gélose

Des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre sont stérilisés à l'autoclave puis imprégnés de 10 µL de chaque extrait (brut, hydrolysé). Ces disques sont déposés à la surface de la gélose (G.M.H pour les bactéries et G.S pour les levures) préalablement ensemencée en surface avec la suspension microbienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C pendant environ 2 h pour permettre une pré-diffusion des molécules bioactives contenant dans les extraits.

Des disques d'ampicilline (10 µg) et de chloramphénicol (30 µg) ont été utilisés comme des contrôles positifs pour les bactéries et des disques d'amphotéricine B (100 µg) et de la nystatine (100 µg) pour les *Candida*.

Un contrôle négatif est également effectué en utilisant un disque de papier chargé avec 10 µL de l'eau distillée stérile pour vérifier l'activité possible de ce solvant contre les microorganismes testés.

L'incubation des boîtes est faite à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les *Candida* (**NCCLS, 1997; CLSI, 2015**).

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition. Deux répétitions sont effectuées pour chaque charge.

III.2.3.2. Détermination des concentrations inhibitrices (CMI et CMB et CMF)

La méthode de dilution en milieu liquide permet de déterminer les concentrations CMI, CMF et CMB d'inhibition de la croissance microbienne par les extraits.

La CMI ou Concentration Minimale Inhibitrice est définie comme la plus faible concentration de l'extrait inhibant toute croissance de micro-organismes visible à l'œil nu (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2019**).

La concentration minimale bactéricide (ou fongicide) (CMB ou CMF) est définie comme étant la concentration minimale d'extrait ne laissant pas de microorganismes survivantes de l'inoculum après incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2019**).

La méthode de micro-dilution en bouillon a été utilisée pour déterminer la CMI selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (**NCCLS, 2001**). Tous les tests ont été effectués dans le bouillon B.M.H pour les bactéries et le bouillon B.S pour les levures.

Des dilutions en série sont préparées dans une microplaque à fond en U (plaque à microtitration) de 96 puits dans la gamme de concentration choisie : 100000 µg/mL à 0.047 µg/mL pour l'extrait brut des anthocyanes et 50000 µg/mL à 0.023 µg/mL pour l'extrait hydrolysé des anthocyanes (**Figure 6 et Tableau 3 et 4**).

Tout d'abord, nous mettons 100 µL de bouillon B.M.H (ou B.S) dans les puits. Ensuite, nous déposons 100 µL de l'extrait dans le puits 2, ensuite 100 µL dans le puits 3 et puis effectuons les dilutions successives (100 µL de puits 3 dans puits 4 et ainsi de suite). De plus, on met 100 µL de la suspension bactérienne (ou fongique) dans les puits 1 puis 3 à 22 pour obtenir un volume final de 200 µL avec une concentration finale de microorganismes de $\approx 5 \times 10^5$ UFC/mL. Il faut impérativement désinfecter la micropipette à l'alcool pour éviter les problèmes de contamination et il est important d'homogénéiser le tube contenant la souche en le passant au vortex avant de l'ajouter dans les puits (**Abedini, 2013**).

Les microplaques des bactéries et des *C. albicans* ont été incubées respectivement pendant 24 h à 37°C et pendant 48 h à 30°C.

La lecture est faite soit visuellement ou bien par essai colorimétrique en utilisant du réactif *p*-iodonitrotétrazolium (INT) (Sigma) à 0.4 mg/mL qui est ajouté (40 µL) dans les puits. La lecture est effectuée après ré-incubation de la microplaque à 37°C pendant 30 min. Les puits dont la croissance a eu lieu présentent une couleur rouge.

La CMI est définie comme la plus faible concentration inhibitrice de l'extrait par laquelle le microorganisme ne démontre pas une croissance visible (ou démontre une coloration jaune avec le réactif INT).

Matériel et méthodes

Pour déterminer la CMB, on prélève 10 μ L des puits contenant la CMI et les concentrations supérieures de la CMI, qu'on ensemence sur des milieux de culture solide (G.M.H ou G.S) et on incube les boîtes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ pendant 24 h. Le lendemain, on peut déterminer grâce à cette culture la CMB.



Figure 6 : Plaque 96 puits pour la détermination des paramètres CMI et CMB.

Tableau 3 : Concentrations et masses de l'extrait brut des anthocyanes de *P. atlantica* dans les puits.

Numéro de puits	1	2	3	4	5	6	7	...	22
Concentration dans le puits (µg/mL)	TC	TCE	100000	50000	25000	12500	6250	..	0.047
Masse de l'extrait sec (µg)/puits	/	/	100000	50000	25000	12500	6250	..	0.047

TC : témoin de culture ; TCE : Témoin de la couleur de l'extrait brut des anthocyanes.

Tableau 4 : Concentrations et masses de l'extrait hydrolysé des anthocyanes de *P. atlantica* dans les puits.

Numéro de puits	1	2	3	4	5	6	7	..	22
Concentration dans le puits (µg/mL)	TC	TCE	50000	25000	12500	6250	3125	..	0.023
Masse de l'extrait sec (µg)/puits	/	/	50000	25000	12500	6250	3125	..	0.023

TC : Témoin de culture ; TCE : Témoin de la couleur de l'extrait hydrolysé des anthocyanes.

III.3. Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne obtenues sont exprimées par une moyenne \pm l'écart type en utilisant l'Excel 2007. L'analyse du pouvoir antioxydant est faite par le logiciel Microcal Origine 6.

Résultats et discussion

I. Rendements et dosages des composés phénoliques

I.1. Étude phytochimique

I.1.1. Rendement des extraits bruts de *P. atlantica*

L'extraction par macération de 2g de la matière végétale sèche (bourgeons mâles et femelles, et les grains de pollen), et extrait brut des anthocyanes à partir des fruits immatures de *P. atlantica* (2.5g), nous a permis de déterminer le rendement de chaque extrait. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Rendement en pourcentage des extraits bruts de *P. atlantica*.

Extraits		Rendement (%)
Grains de pollen	EBGP	29.71 ± 4.327
Bourgeons mâles	EBBM	30.60 ± 2.828
Bourgeons femelles	EBBF	28.065 ± 5.388
Extrait brut des anthocyanes	EBA	16.408 ± 1.182

Nous remarquons que l'extrait brut des bourgeons mâles a enregistré le rendement le plus élevé de 30.6 ± 2.828%, suivi par l'extrait brut des grains de pollen (29.71 ± 4.327%) et des bourgeons femelles (28.065 ± 5.388%), tandis que l'extrait brut des anthocyanes a révélé un rendement faible de 16.408 ± 1.182%.

D'après nos recherches, il n'ya pas des travaux portant sur les bourgeons mâles et femelles et les grains de pollen ainsi que les anthocyanes des fruits. Pour cela, nous avons estimé nécessaire de comparer nos résultats avec d'autres études.

Des travaux réalisés par **Belyagoubi et al. (2016)** et **Benhammou et al. (2014)** sur les extraits méthanoliques des fruits de *P. atlantica* ont révélé des rendements de l'ordre de 36.40 % et 33.43 ± 2.70%, respectivement et qui sont proches à nos résultats.

D'après **Rezaie et al. (2015)**, les rendements des extraits méthanolique et aqueux des fruits de *P. atlantica* sont de 13.48 % et 17.62 %, respectivement. En **2016**, **Abdenbi et ces collaborateurs** ont trouvé un rendement de l'extrait aqueux égal à 48.34%.

En ce qui concerne les rendements des anthocyanes, **Zitouni et al. (2016)** ont rapporté un rendement proche à nos résultats pour les fruits de *P. lentiscus* de l'ordre de 17.343 ± 0.895%.

I.1.2. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés

Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés sont calculés en utilisant des équations de la régression linéaire. Les courbes d'étalonnage sont exprimées successivement en mg équivalents d'acide gallique pour les phénols totaux ($y = 2.916 x$; $R^2 = 0.9978$) et en mg équivalents de catéchine pour les flavonoïdes ($y = 5.140 x$; $R^2 = 0.9911$) et les tanins condensés ($y = 0.1161 x$; $R^2 = 0.9968$) (Belyagoubi-Benhammou *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits bruts de *P. atlantica*.

Extraits		Phénols totaux (mg EAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EC/g MS)	Tanins condensée (mg EC/g MS)
Grains de pollen	EBGP	402.451 ± 11.3728	15.5341 ± 1.2002	0.8125 ± 0.2588
Bourgeons mâles	EBBM	636.8312 ± 4.7285	10.5099 ± 0.4600	4.1016 ± 0.5379
Bourgeons femelles	EBBF	648.9711 ± 4.8013	7.1656 ± 0.0619	6.0223 ± 0.6240

EBBM : Extrait brut des bourgeons mâles ; **EBBF** : Extrait brut des bourgeons femelles ; **EBGP** : Extrait brut des grains de pollen ; **MS** : matière sèche ; **EAG**: équivalents d'acide gallique ; **EC**: équivalents de catéchine.

D'après ce **tableau 6**, la teneur en phénols totaux des bourgeons femelles (648.9711 ± 4.8013 mg EAG/g MS) est plus élevée que ceux révélés dans les bourgeons mâles (636.8312 ± 4.7285 mg EAG/ g MS) et les grains de pollen (402.451 ± 11.3728 mg EAG/ g MS).

Les teneurs les plus élevées des flavonoïdes ont été enregistrées chez les grains de pollens (15.5341 ± 1.2002 mg EC/ g MS) et les bourgeons mâles (10.5099 ± 0.4600 mg EC/g MS), tandis que les bourgeons femelles (6.0223 ± 0.6240 mg EC/ g MS) et les grains de pollen (4.1016 ± 0.5379 mg EC/g MS) ont révélé des teneurs élevées en tanins condensés.

D'après **Belyagoubi-Benhammou *et al.* (2014)** et **Rezaie *et al.* (2015)**, les extraits des fruits ont montré des teneurs en phénols totaux de l'ordre de 285.95 ± 10.25 et 149.00 ± 0.00 mg EAG/g MS, respectivement. En outre, les travaux réalisés par **Toul *et al.* (2017)** ont rapporté des teneurs en phénols de 233.946 ± 6.205 mg EAG/g MS pour les bourgeons et 255.789 ± 4.733 mg EAG/g MS pour les feuilles. Ces résultats mentionnés précédemment ont exhibé des teneurs significativement élevées qui restent moins importantes par rapport à nos extraits concernant les bourgeons mâles et femelles.

Des travaux récents sur les extraits des feuilles de *P. atlantica* ont marqué des valeurs de 108 mg EAG/g MS et 58.61 ± 19.22 mg EAG/g d'extrait réalisés par **Khiya et al. (2019)** et **Nouioua et Gaamoune. (2019)**, respectivement.

Toul et al. (2017) ont reporté des teneurs élevées en flavonoïdes pour les bourgeons (24.623 ± 0.252 mg EC/ g MS), les feuilles (22.683 ± 0.693 mg EC/ g MS) et les fruits (6.866 ± 0.539 mg EC/ g MS). **Belyagoubi-Benhammou et al. (2014)** et **Hatammia et al. (2015)** ont trouvé des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de 12.44 ± 0.25 mg EC/ g MS et de 3.45 mg EC/g MS dans les extraits des fruits. Concernant les feuilles de *P. atlantica*, certains auteurs ont trouvé des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de 33.52 ± 2.04 µg EC/ mg d'extrait (**Peksel et al., 2013**) et 126.4 mg d'équivalents de quercétine/g d'extrait (mg EQ / g) (**Khiya et al., 2019**).

Une étude réalisée par **Ben Ahmed et al. (2017)** sur les feuilles des pieds mâles et femelles de *P. atlantica* a montré des teneurs en tanins condensés de 1.10 ± 0.22 et 3.19 ± 0.94 mg EC/ g MS. Ces teneurs restent moins importantes que celles rapportées par nos bourgeons mâles et femelles. En ce qui concerne l'étude faite par **Toul et al. (2016)**, ils ont rapporté une teneur en tanins condensés des bourgeons de l'ordre de 48.615 ± 0.141 mg EC/g MS, tandis que la teneur des fruits était proche à celle trouvée dans les extraits des bourgeons mâles et femelles de notre étude.

En outre, les extraits des feuilles ont marqué des teneurs de 11.805 ± 0.307 et 29.13 mg EC/g MS dans les travaux réalisés par **Toul et al. (2016)** et **Khiya et al. (2019)**.

1.1.3. Dosage des anthocyanes dans les fruits

La teneur en anthocyanes dans les fruits de *P. atlantica* est de l'ordre de 0.468 ± 0.052 µmol/g.

Peu de travaux ont été réalisés sur les anthocyanes des fruits de cette plante.

Peksel et al. (2010) ont constaté que la teneur en anthocyanes dans les feuilles fraîches était de 0.296 ± 0.024 et 0.488 ± 0.039 mmol/ g pour les extraits du méthanol et d'acétate d'éthyle de *P. atlantica*, respectivement.

D'après **Mohammadi et al. (2019)**, les teneurs en anthocyanes dans la coque (122 µg/g MS) et le noyau (40 µg/g MS) des fruits de *P. atlantica* sont nettement élevées par rapport à nos résultats. Pour l'espèce *P. vera*, le cyanidine-3-galactoside est le principal anthocyanine présent dans les noyaux avec une teneur de 22.1 µg/kg (**Bellomo et Fallico, 2007**).

II. Étude de l'activité antioxydante

Dans ce travail, quatre méthodes ont été exploitées pour estimer l'activité antioxydante des extraits des bourgeons mâles et femelles, des grains de pollen et des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes de l'espèce *Pistacia atlantica* qui sont : la capacité antioxydante totale (CAT) ; le piégeage du radical libre (DPPH) ; la réduction du fer (FRAP) et le β -carotène.

Les résultats obtenus sont reportés dans le **tableau 7**.

Tableau 7: Propriétés antioxydants des extraits bruts de *P. atlantica*.

Extraits	EC ₅₀ (mg/mL)			
	CAT (mg AAE/g MS)	Réduction de fer	DPPH	β -carotène
EBBM	115.0790±3.3804	0.0938 ± 0.0036	0.2023±0.0227	0.5336 ± 0.1413
EBBF	98.0542±0.7793	NR	0.1702±0.0140	NR
EBGP	50.7927±0.9776	0.3423 ± 0.0275	1.5245±0.1308	0.6237± 0.1553
EBA	57.644 ± 2.364	0.054±0.0018	0.257±0.0015	0.0808±0.025
EHA	70.165 ± 5.037	0.029±0.002	0.519±0.024	0.026±0.003
AA		0.063 ± 0.02	0.0906±0.0023	
BHA				0.028±0.005

EBBM : Extrait brut des bourgeons mâles ; **EBBF** : Extrait brut des bourgeons femelles ; **EBGP** : Extrait brut des grains de pollen ; **EBA** : Extrait brut des anthocyanes ; **EHA** : Extrait hydrolysé des anthocyanes ; **AA** : Acide ascorbique ; **BHA** : Butylhydroxyanisole ; **NR** : Test non réalisé.

II.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des trois extraits étudiés est exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/g MS) à partir d'une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'acide ascorbique comme référence ($y=4.6717x$; $R^2=0.986$) (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2014**). Le résultat obtenu est mentionné dans le **tableau 7**.

L'extrait brut des bourgeons mâles a marqué l'activité la plus élevée avec une valeur de 115.0790 ± 3.3804 mg AAE/g MS, suivi par l'extrait brut des bourgeons femelles 98.0542 ± 0.7793 mg AAE/g MS. L'extrait brut et hydrolysé des anthocyanes des fruits, et les grains de pollen ont révélé les valeurs suivantes : 70.165 ± 5.037 ; 57.644 ± 2.364 ; 50.7927 ± 0.9776 mg AAE/g MS, respectivement.

Certains travaux ont été réalisés sur d'autres parties de *P. atlantica*. Ces travaux ont montré des valeurs de CAT de l'ordre de 36.197 ± 0.624 et 24.318 ± 0.036 mg EAA/mg MS, respectivement, dans les extraits des bourgeons et des fruits (Toul *et al.*, 2016). En ajoutant que Belyagoubi-Benhammou *et al.* (2014) ont évalué la CAT de l'extrait méthanolique des fruits de *P. atlantica* et ils ont trouvé une valeur de 45.51 ± 1.63 mg EAA/g MS. L'extrait méthanolique des feuilles de *P. atlantica* a enregistré une teneur de CAT de 70.809 mg d'équivalent d'acide gallique/g MS (Khiya *et al.*, 2019). En outre, Zitouni *et al.* (2016) ont constaté que la CAT des extraits méthanolique des anthocyanes des feuilles et des fruits de *P. lentiscus* atteint respectivement environ 33.532 ± 2.491 et 18.061 ± 0.394 (mg AAE/g MS).

II.2. Réduction de fer

La détermination de la capacité réductrice est basée sur la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence des extraits de *P. atlantica*. Pour évaluer et comparer l'efficacité des extraits à réduire le fer, nous avons calculé la concentration EC_{50} à une valeur d'absorbance égale à 0.5 de chaque extrait étudié.

D'après les valeurs enregistrées dans le **tableau 7**, nous constatons que les extraits hydrolysé et brut des anthocyanes des fruits ont des capacités réductrices plus élevées avec des concentrations EC_{50} de 0.029 ± 0.002 et 0.054 ± 0.0018 mg/mL. Ces deux extraits restent très intéressantes devant l'acide ascorbique ($EC_{50}=0.063 \pm 0.02$ mg/mL) qui est utilisé comme contrôle positif. Par contre les extraits bruts des bourgeons mâles (EBBM) et des gains de pollen (EBGP) ont des capacités réductrices moins importantes avec des concentrations EC_{50} de 0.0938 ± 0.0036 et 0.3423 ± 0.0275 mg/mL.

Selon la bibliographie, le pouvoir réducteur de cette espèce a été confirmé par plusieurs chercheurs, surtout sur les fruits et les feuilles. Hatamnia *et al.* (2014) et Toul *et al.* (2017) ont montré que les extraits bruts méthanoliques des fruits de *P. atlantica* ont des capacités réductrices de 0.320 ± 0.010 et 0.334 ± 0.003 mg/mL, respectivement. Ces résultats sont proches du notre extrait brut des grains de pollen (EBGP). D'autres travaux réalisés par Belyagoubi-Benhammou *et al.* (2014) et Belyagoubi *et al.* (2016) ont mentionné des effets réducteurs de 0.13 ± 0.001 mg/ml et de 0.16 ± 0.00 mg/mL pour les extraits méthanolique et aqueux des fruits, respectivement.

En parallèle, les études réalisées en 2010, en 2017 et en 2019 par **Peksel et al.** ; **Toul et al.** et **Khiya et al.**, respectivement ont signalé que le pouvoir réducteur égale à 0.055 ± 0.001 mg/mL pour l'extrait brut des feuilles, à 0.132 ± 0.001 et 0.015 ± 0.001 mg/mL pour les extraits méthanoliques des bourgeons et des feuilles et à 0.07 mg/mL pour l'extrait méthanolique des feuilles. Par ailleurs, les extraits des tanins des fruits, des bourgeons et des feuilles de *P. atlantica* ont des pouvoirs réducteurs de 0.127 ± 0.001 , 0.245 ± 0.006 et 0.021 ± 0.001 mg/mL (**Toul et al., 2016**). Comparativement à l'espèce *Pistacia lentiscus*, les résultats de **Zitouni et al. (2016)** sur les extraits méthanoliques des anthocyanes des feuilles et des fruits ont enregistré des concentrations EC₅₀ de l'ordre de 0.088 ± 0.000 et 0.122 ± 0.000 mg/mL, respectivement. Ces résultats restent faibles devant nos résultats sur les extraits hydrolysé et brut des anthocyanes des fruits.

II.3. Piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation de l'effet du piégeage des radicaux libres a été faite par la méthode des radicaux libres, en utilisant le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle qui forme une solution de couleur violette, il perde sa couleur en réagissant avec les antioxydants. La perte de couleur et la diminution de l'absorbance sont corrélées à la teneur en antioxydant de l'extrait (**Barreca et al., 2016**). D'après les résultats résumés dans le **tableau 7**, nous pouvons voir que les extraits les plus actifs sont les extraits méthanoliques des bourgeons femelles, des bourgeons mâles et l'extrait brut des anthocyanes avec des concentrations EC₅₀ de 0.1702 ± 0.0140 , 0.2023 ± 0.0227 et 0.257 ± 0.0015 mg/mL, respectivement. Pour les autres extraits, les EC₅₀ obtenues sont de 0.519 ± 0.024 et 1.5245 ± 0.1308 mg/mL pour l'extrait hydrolysé des anthocyanes et l'extrait méthanolique des grains de pollen.

Par manque de la littérature sur les parties étudiées, nous avons estimé nécessaire de comparer nos résultats avec d'autres parties de *P. atlantica*.

Les travaux de **Toul et al. (2016)** sur l'extrait des tanins des bourgeons et **Toul et al. (2017)** sur l'extrait méthanolique de la même partie ont montré que ces deux extraits possèdent un pouvoir antioxydant important à piéger le radical DPPH avec une concentration EC₅₀ égale à 0.143 ± 0.005 et 0.097 ± 0.001 mg/mL, respectivement. En 2018, **Amri et al.** ont révélé des valeurs de EC₅₀ de 162.6 ± 17.26 et 135.6 ± 16.07 µg / mL pour les extraits des pieds mâles et femelles de *P. atlantica*.

Ces valeurs sont presque similaires à nos extraits des bourgeons mâles et femelles. Des travaux récents réalisés par **Achili et al. (2020)** ont prouvé que les feuilles de *P. atlantica* ont un pouvoir anti-radicalaire très élevé de l'ordre de 2.87 ± 0.16 µg/mL.

Les travaux de **Zitouni et al. (2016)** sur les extraits méthanoliques des anthocyanes des feuilles et des fruits de *P. lentiscis* ont démontré des concentrations EC_{50} de l'ordre de 0.102 ± 0.005 et 0.380 ± 0.030 mg/mL, respectivement.

II.4. Test du β -carotène

Dans ce test l'activité anti-radicalaire des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (une décoloration), étant donné que ce test est basé sur un système d'émulsion des lipides dans l'eau.

Parmi tous les extraits analysés, comme le montre **le tableau 7**, les extraits hydrolysé et brut des anthocyanes des fruits de *P. atlantica* ont montré l'activité la plus élevée avec des valeurs de $EC_{50} = 0.026 \pm 0.003$ et 0.0808 ± 0.025 mg/mL, respectivement. De plus, les extraits bruts des bourgeons mâles (0.5336 ± 0.1413 mg/mL) et des gains de pollen (0.6237 ± 0.1553 mg/mL) étaient également faibles devant le BHA ($EC_{50} = 0.028 \pm 0.005$ mg / mL).

Les résultats de ce test dans notre investigation sont comparés avec différentes études antérieures portant sur les feuilles et les fruits de *P. atlantica*.

D'après **Peksel et al. (2010) et (2013)**, les extraits méthanoliques et aqueux des feuilles ont montré des capacités plus importantes à inhiber le blanchiment du β -carotène avec des concentrations EC_{50} de 0.600 ± 0.050 et de 0.400 ± 0.040 mg/mL, respectivement.

Egalement, d'autres travaux ont montré des valeurs EC_{50} de l'ordre de 0.415 ± 0.02 , 1.624 ± 0.004 et 0.313 ± 0.009 mg/mL pour l'extrait des tanins des fruits, des bourgeons et des feuilles de *P. atlantica* (**Toul et al., 2016**). En 2017, les mêmes auteurs ont illustré des valeurs EC_{50} de 0.091 ± 0.012 , 0.064 ± 0.029 et 0.110 ± 0.001 mg/mL pour l'extrait méthanolique brut des fruits, des bourgeons, et des feuilles de *P. atlantica*. (**Toul et al., 2017**). Pour *P. lentiscis*, les extraits méthanoliques des anthocyanes des feuilles et des fruits ont enregistré des valeurs EC_{50} de 0.603 ± 0.122 et 0.104 ± 0.005 mg/mL, respectivement. (**Zitouni et al., 2016**).

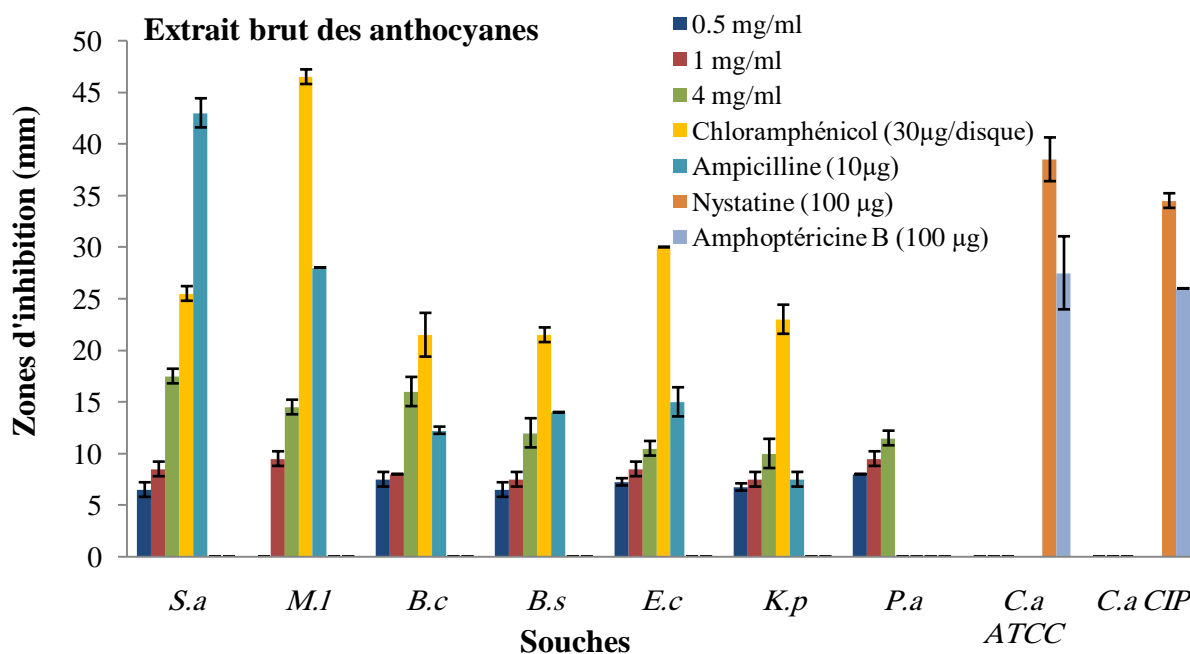
III. Étude de l'activité antimicrobienne des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes

III.1. Méthode de diffusion en milieu gélosé (Méthode des disques)

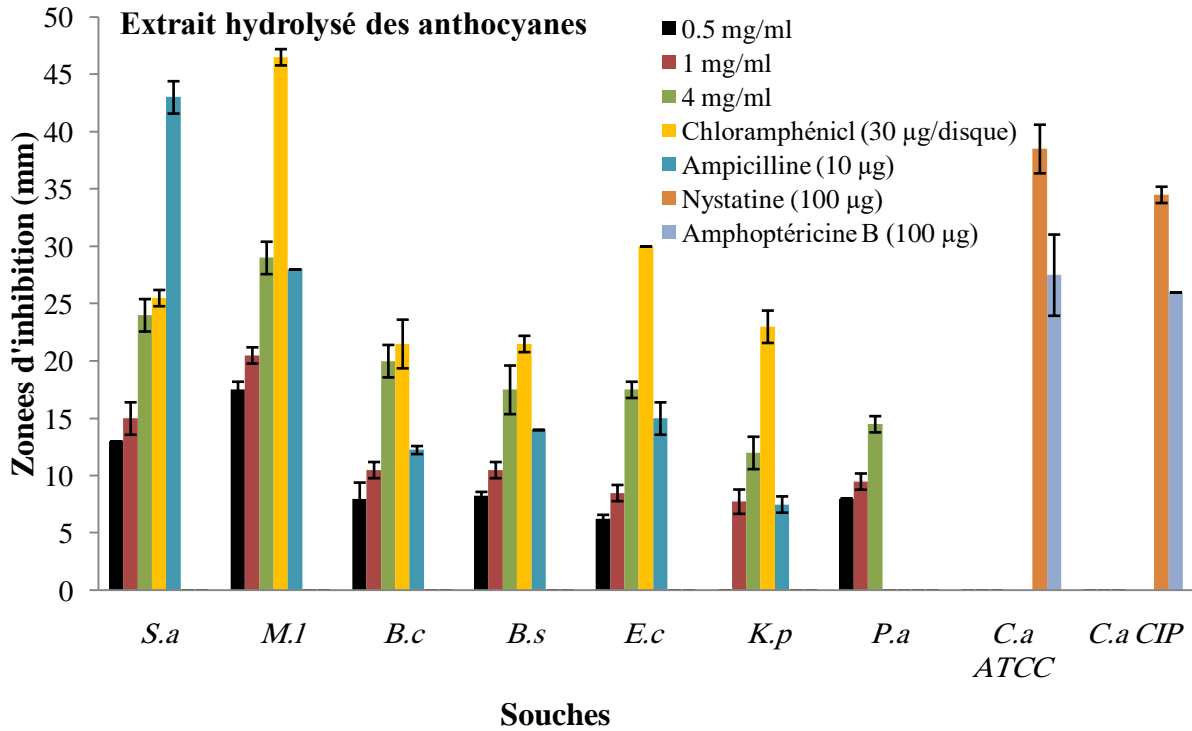
La méthode de diffusion des disques nous a permis de démontrer le pouvoir antimicrobien des extraits des fruits immatures de *P. atlantica* de la station d'Ain Fezza via sept souches bactériennes et deux levures *C. albicans* ATCC et *C. albicans* CIP.

En effet, les charges des disques par les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes ont été prises dans l'ordre de 0.5 mg/disque, 1 mg/disque, 4 mg/disque.

Les diamètres des zones d'inhibition relatifs à l'activité antimicrobienne des différentes charges des extraits des fruits sont présentés dans les **figures 7, 8, 9**.



Figures 7 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations.



Figures 8 : Moyennes des diamètres des zones d’inhibition des différentes souches (en mm), avec des différentes concentrations

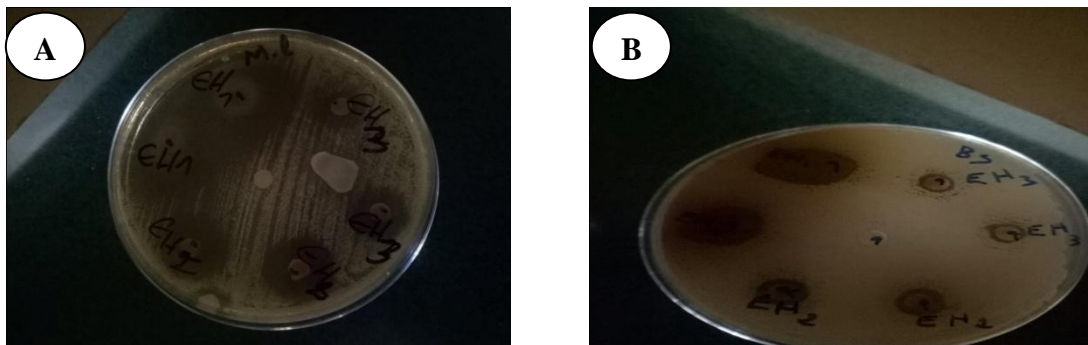


Figure 9 : Effet antimicrobien de l’extrait hydrolysé des anthocyanes sur les bactéries.

A : *Micrococcus luteus* B : *Bacillus subtilis*.

D'après nos résultats illustrés dans les **figures 7 et 8**, nous remarquons que l'extrait hydrolysé est plus actif et il a enregistré généralement une activité antimicrobienne élevée par rapport à l'extrait brut. Les zones d'inhibition les plus importantes sont dotées pour les souches : *S. aureus* (24 mm) et *M. luteus* (29 mm). Tandis que les zones d'inhibition marquées dans l'extrait brut ont atteint 18 et 17 mm pour *S. aureus* et *B. cereus* à la charge 4 mg/ disque.

Les souches bactériennes (*S. aureus*, *M. luteus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* et *K. pneumoniae*) ont enregistré des zones d'inhibition élevées comprises entre (21 et 47 mm) vis-à-vis du chloramphénicol par rapport à celles représentées avec les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes à la charge 4 mg/ mL. En outre, toutes les souches bactériennes se sont montrées sensibles à l'ampicilline avec des diamètres variés entre 13 et 43 mm à l'exception de *B. cereus*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

En ce concerne *P. aerogenosa*, il est notable que cette souche a une résistance aux antibiotiques testés, cependant elle a marqué des zones d'inhibition avec des diamètres considérables de 12 et de 15 mm pour les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes, respectivement à la charge 4 mg/mL. Au contraire, ces deux extraits n'ont montré aucune activité antifongique sur les souches testées.

D'après nos recherches, il n'ya pas des travaux portants sur cette activité des anthocyanes de *P. atlantica*, pour cela nous voulons comparer nos résultats avec d'autres études sur la famille chimique des anthocyanes.

Selon les travaux de **Lacombe et al. (2012)**, l'extrait des anthocyanes du bleuet (*Vaccinium angustifolium*) possède une activité plus efficace contre *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes* avec des zones d'inhibition de 17.8 mm et 19.7 mm, respectivement.

Les anthocyanes de pommes de terre violettes (*Solanum tuberosum*) brutes et cuites ne présentaient aucunes activités antimicrobiennes contre les trois souches utilisées, à savoir *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. cereus*, mais à 100 mg d'anthocyanines d'extrait cuit, *E. coli* a enregistré une zone d'inhibition égale 8.2 mm. (**Ombra et al., 2015**).

En ajoutant, l'extraction de cyanine à partir de goyave du chili (*Ugni molinae*) a formé une zone d'inhibition d'environ 20 mm contre *E. Coli* (**Junqueira-Goncalves et al., 2015**).

D'après **Llvisaca et al. (2018)**, l'extrait anthocyanique du fruit de *Vaccinium* avait une zone d'inhibition de 20 mm contre *Salmonella typhimurium*.

Une autre étude a montré que les anthocyanes extraits des carottes noire ont révélé des effets inhibiteurs sur la croissance à la fois des bactéries Gram-négatives (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. freundii*) et Gram-positives (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis* et *E. faecalis*) (**Koosha et Hamedi, 2019**).

III.2. Méthode en milieu liquide

Les résultats obtenus de la sensibilité des micro-organismes par les extraits des fruits immatures de *P. atlantica* par la méthode de micro-dilution sont représentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Concentrations CMI et CMB des extraits brut et hydrolysé des anthocyanes sur les souches testées.

Souches	Extrait brut des anthocyanes (100 µg /ml)		Extrait hydrolysé des anthocyanes (50 µg/ml)	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Bacillus cereus</i>	3125	50000	781.25	62500
<i>Bacillus subtilis</i>	781.25	50000	25000	50000
<i>Staphylococcus aureus</i>	6250	12500	25000	50000
<i>Micrococcus luteus</i>	6250	6250	781.25	781.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25000	>100000	12500	12500
<i>Echerichia coli</i>	12500	>100000	12500	12500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6250	12500	12500	12500

Selon les résultats enregistrés dans le **tableau 8**, les valeurs de la CMI débutent de 0.781 mg/mL jusqu'à 25 mg/mL, tandis que les valeurs de la CMB débutent de la même valeur mais dépassant 100 mg/mL dans l'étude des dilutions 1/2 en série dans les microplaques à 96 puits.

Nous remarquons que la CMI de l'extrait hydrolysé est de 0.781 mg/mL contre *B. cereus* et *M. luteus* et aussi contre *B. subtilis* avec l'extrait brut des anthocyanes des fruits immatures.

Les valeurs de CMB contre *M. luteus* sont de 0.781 et 6.25 mg/mL avec les extraits hydrolysés et brut des anthocyanes. Pour les souches à Gram-négatif, les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes ont révélé des effets antimicrobiennes plus faibles sur *E. coli* et *K. pneumoniae* avec des concentrations de CMB très élevés (> 100 mg/mL) et des concentrations de CMI de 12.5 et 25 mg/mL, respectivement.

En comparant avec la littérature, les souches fongiques *Debaryomyces hansenii*, *Trichosporon cutaneum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri* et *Rhodotorula rubra* ont montré une résistance totale à l'extrait des anthocyanes de la canneberge (Cisowska *et al.*, 2011).

D'après Rand *et al.* (2011), les anthocyanes du chou rouge (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) ont montré une activité inhibitrice contre *Salmonella typhimurium*, avec une CMI de 400 mg/mL et une CMB de 500 mg/mL.

L'extrait des anthocyanes des bleuets (*Vaccinium angustifolium*) ont enregistré des valeurs de CMI de 34.75 et 17.40 mg/mL et des valeurs de CMB de 69.50 et 34.75 mg/mL contre *S. typhimurium* et *L. monocytogenes*, respectivement (**Lacombe et al., 2012**).

Selon les travaux de **Wafa et al. (2017)** et **Ma et al. (2019)**, les CMI de l'extrait des anthocyanes des grenades (*Punica granatum*) étaient de 40 µg/mL et 10.75 à 12.5 mg/mL pour *E. coli* et *Salmonella*, respectivement.

❖ Relation entre les dosages phytochimiques et les activités biologiques

D'après les résultats de notre étude, nous notons que les extraits des bourgeons mâles et femelles récoltés de la station Oudjlida, possèdent des activités antioxydantes importantes par rapport aux extraits des grains de pollens de la même station et les extraits brut et hydrolysé des anthocyanes de la station Ain Fezza.

Cette activité est due probablement à la forte teneur en composés phénoliques tels que les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensés. Ces résultats ont été confirmé par plusieurs travaux où le pouvoir antioxydant des extraits des fruits peut être attribué à leur grande quantité en flavonoïdes et en phénols totaux (**Malekzadeh et al., 2015 ; Rigane et al., 2017**). Selon les études de **Ben Ahmed et al. (2017) ; Benamar et al. (2018) ; Tahir et al. (2019)**, la variation des teneurs en composés phénoliques de *P. atlantica* est corrélée avec plusieurs paramètres à savoir la région, la saison, le stade de croissance, le solvant et méthode d'extraction et la partie de plante étudiée. En plus, les composés chimiques et la nature des solvants peuvent jouer un rôle dans l'activité antimicrobienne, cela est évident dans le contraste entre l'extrait hydrolysé qui monte une activité importante que celle de l'extrait brut.

Il est noté que les anthocyanes possèdent un effet antimicrobien, mais ce dernier varie selon la concentration, la souche microbienne et l'espèce de la plante (**Demirbas et al., 2017 ; Sun et al., 2018**).

Parmi les molécules anthocyanines qui possèdent ces activités biologiques : le cyanidine 3-glucoside, la delphinidine 3-galactoside, le cyanidine 3,5-di-O-glucoside, la pélargonidine 3,5-di-O-glucoside, le cyanidine 3-galactoside, la delphinidine 3-arabinoside, la pélargonidine 3-O-glucoside, le cyanidine 3-O-glucoside, le malvidine 3-O-glucoside et le petunidine 3-O-glucoside (**Cisowska et al., 2011 ; Lee et al., 2011 ; Pertuzatti et al., 2016 ; Dzhanfezova et al., 2020 ; Zhou et al., 2020**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

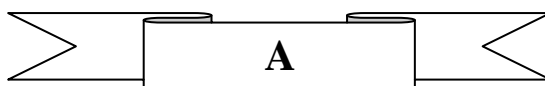
Sur la base de ces résultats, nous avons conclu que les extraits bruts des bourgeons mâles, femelles et des grains de pollen de *Pistacia atlantica* récoltés de la station d'Oudjlida de la wilaya de Tlemcen se caractérisaient par leurs teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés qui reflètent la forte propriété antioxydante.

Les anthocyanes extraits des fruits immatures de cette plante ont révélé une très bonne activité antioxydante significative par différentes méthodes à savoir : capacité antioxydante totale (CAT), réduction de fer (FRAP), activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) et l'inhibition du blanchiment du β -carotène, ainsi qu'une activité antimicrobienne modérée selon le type de la souche.

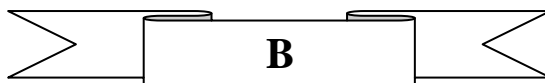
Cette étude fournira une base pour de futures études. Il serait intéressant :

- d'identifier les autres constituants des composés phénoliques de cette plante.
- d'étudier les activités anti-tyrosinase, antiproliférative et anticholinestérase *in vitro*.
- de tester les anthocyanes contre d'autres souches de microorganismes (bactéries, champignons, parasites, virus, Covid 19) et aussi de les identifier.
- d'utiliser ces extraits comme des antioxydants naturels dans les industries agro-alimentaires pour préserver l'oxydation des denrées alimentaires et pharmaceutiques pour prévenir ou réduire la progression des maladies liées à la surproduction de radicaux libres, telles que les maladies cardiovasculaires et cancer.

Références bibliographiques



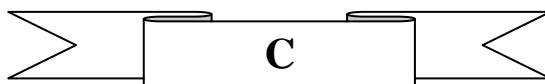
- 1) **Abdenbi, A., Touati, B., Bouazza, M., Tail, N., Boutercha, M. (2016).** Antibacterial activity and physicochemical characteristics of *Pistacia atlantica* extracts. *Der Pharma Chemica*, 8(12): 162-168.
- 2) **Abedini, A. (2013).** Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae) sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II-France.
- 3) **Achili, I., Amrani, A., Bensouici, C., Gül, F., Altun, M., Demirtas, I., Benayache, S. (2020).** Chemical constituents, antioxidant, anticholinesterase and antiproliferative effects of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. extracts. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11: 00-00.
- 4) **Adams, M., Zimmermann, S., Kaiser, M., Brun, R., Hamburger, M. (2009).** A protocol for HPLC-based activity profiling for natural products with activities against tropical parasites. *Natural product communications*, 4(10): 1377 – 1381.
- 5) **Ait Said, S., Fernandez, C., Greff, S., Derridj, A., Gauquelin, T., Mevy, J. P. (2011).** Inter-population variability of leaf morpho-anatomical and terpenoid patterns of *Pistacia atlantica* Desf. ssp. *atlantica* growing along an aridity gradient in Algeria. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(4): 397-405.
- 6) **Amri, O., Zekhnini, A., Bouhaimi, A., Tahrouch, S., Hatimi, A. (2018).** Anti-inflammatory activity of methanolic extract from *Pistacia atlantica* Desf. leaves. *Pharmacognosy Journal*, 10(1): 71-76.
- 7) **Anusuya, N., Gomathi, R., Manian, S. (2012).** Evaluation of basellarubra L., Rumexne palensis spreng. and Commelina ben- ghalensis l. for antioxidant activity. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(3): 714–20.



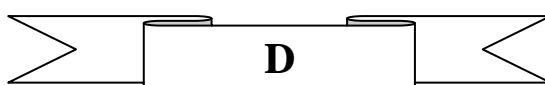
- 8) **Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Rome, S. (1998).** Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two viciafabadiffeting in their seed tannin content, and study of their seed and root pheolic exudation. *Journal Plant and Soil*, 203: 27–36.

- 9) Barreca, D., Laganà, G., Leuzzi, U., Smeriglio, A., Trombetta, D., Bellocco, E. (2016). Evaluation of the nutraceutical, antioxidant and cytoprotective properties of ripe pistachio (*Pistachia vera* L. variety Bronte) hulls. *Food Chemistry*, 196: 493–502.
- 10) Barrero, A. F., Herrador, M.M., Arteaga, J.F., Akssira, M., Mellouki, F., Belgarrabe, A., Blázquez, M.A. (2005). Chemical composition of the essential oils of *Pistacia atlantica*. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1): 52–54.
- 11) Belhadj, S. (2001). Les pistacheraies algériennes : Etat actuel et dégradation. 11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. *Zaragoza : Ciheam-iamz*, 107-109.
- 12) Belhadj, S. (2002). Geographical distribution of *Pistacia atlantica* Desf. in Algeria. *In III International Symposium on Pistachios and Almonds*, 591: 499-503.
- 13) Belhadj, S., Derridj, A., Auda, Y., Gers, C., Gauquelin, T. (2008). Analyse de la variabilité morphologique chez huit populations spontanées de *Pistacia atlantica* en Algérie. *Botany*, 86(5): 520-532.
- 14) Bellomo, M.G., Fallico, B. (2007). Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 352–359.
- 15) Belyagoubi, L., Belyagoubi-Benhammou, N., Atik-Bekkara, F., Coustard, J.M. (2016). Effects of extraction solvents on phenolic content and antioxidant properties of *Pistacia atlantica* Desf fruits from Algeria. *International Food Research Journal*, 23(3): 948-953.
- 16) Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Atik-Bekkara, F. (2014). Phenolic contents and activities *in vitro* of some selected algerian plants. *Journal of medicinal plant research*, 8(40): 1198-1207.
- 17) Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Gismondi, A., Di Marco, G., Canini, A., Atik-Bekkara, F. (2019). GC/MS analysis, and antioxidant and antimicrobial activities of alkaloids extracted by polar and a polar solvents from the stems of *Anabasis articulata*. *Journal of Medicinal Chemistry Research*, 28: 754–767.
- 18) Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Heyden, Y.V. (2016). Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers. *Microchemical journal*, 128: 208-217.

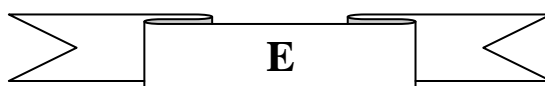
- 19) Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Heyden, Y. V. (2017). Seasonal, gender and regional variations in total phenolic, flavonoid, and condensed tannins contents and in antioxidant properties from *Pistacia atlantica* ssp. Leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 1185–1194.
- 20) Ben Ahmed, Z., Yousfi, M., Viaene, J., Dejaegher, B., Demeyer, K., Mangelings, D., Heyden, Y.V. (2018). Potentially antidiabetic and antihypertensive compounds identified from *Pistacia atlantica* leaf extracts by LC fingerprinting. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 149: 547-556.
- 21) Benabdallah, F. Z., Kouamé, R. O., El Bentchikou, M., Zellagui, A., Gherraf, N. (2017). Études ethnobotanique, phytochimique et valorisation de l'activité antimicrobienne des feuilles et de l'oléorésine dupistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*. Desf.). *Phytothérapie*, 15(4): 222-229.
- 22) Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur, M. (2018). Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 24(3): 229-244.
- 23) Benhammou, N., Bekkara, F. A., Panovska, T. K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 22-28.
- 24) Benhassaini, H., Bendahmane, M., Benchalgo, N. (2007). The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2): 121–124.
- 25) Benhassaini, H., Bendeddouche, F. Z., Mehdadi, Z., Romane, A. (2008). GC/MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp *atlantica* from Algeria. *Natural Product Communications*, 3(6): 929–932.
- 26) Bentireche, F., Guenane, H., Yousfi, M. (2019). Fatty Acids, the Unsaponifiable Matter, and Polyphenols as Criteria to Distinguish *Pistacia atlantica* Unripe Fruit Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(8): 903-910.
- 27) Bozorgi, M., Memariani, Z., Mobli, M., Salehi Surmaghi, M. H., Shams-Ardekani, M. R., Rahimi, R. (2013). Five *Pistacia* species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*) : a review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 1-33.



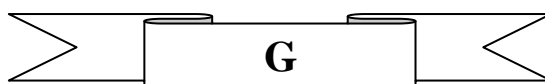
- 28) Chaovanalikit, A., Thompson, M. M., Wrolstad, R. E. (2004). Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 848–852.
- 29) Cisowska, A., Wojnicz, D., Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as Antimicrobial Agents of Natural Plant Origin. *Natural Product Communications*, 6(1): 149 -156.
- 30) CLSI. (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; *Approved standard Twelfth Edition*. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.



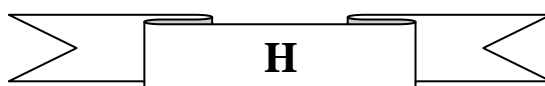
- 31) Daoudi, A., Boutou, H., Ibijbjen, J., Zair, T., Nassiri, L. (2013). Etude ethnobotanique du pistachier de l'Atlas, *Pistacia atlantica*, dans la ville de Meknes (Maroc). *Science Lib*, 5.
- 32) Delazar, A., Nazemyieh, H., Modarresti, M., Afshar, J. (2002). Study on essential oil obtained from oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*. *Pharmaceutical Sciences, Journal of Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences*, 2: 27–38.
- 33) Delazar, A., Reid, R.G., Sarker, S.D. (2004). GC–MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(1): 24–27.
- 34) Demirbas, A., Yilmaz, V., Ildiz, N., Baldemir, A., Ocsoy, I. (2017). Anthocyanins-rich berry extracts directed formation of Ag NPs with the investigation of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Molecular Liquids*, 248: 1044-1049.
- 35) Dzhanfezova, T., Barba-Espin, G., Muller, R., Joernsgaard, B., Hegelund, J.N., Madsen, B., Larsen, D.H., Vega, M.M., Toldam-Andersen, T.B. (2020). Anthocyanin profile, antioxidant activity and total phenolic content of a strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) genetic resource collection. *Food Bioscience*, 36: 100620.



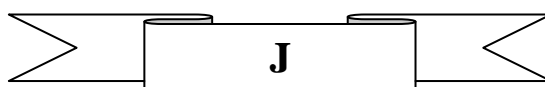
- 36) Eghbali-Feriz, S., Taleghani, A., Al-Najjar, H., Emami, S. A., Rahimi, H., Asili, J., Tayarani-Najaran, Z. (2018). Anti-melanogenesis and anti-tyrosinase properties of *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* extracts on B16F10 murine melanoma cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(6): 533-545.



- 37) Ghalem, B. R., Mohamed, B. (2009). Bactericidal activity of *Pistacia atlantica*. Desf mastic gum against certain pathogens. *African Journal of Plant Science*, 3(1): 13-15.
- 38) Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Industrial Crops and Products*, 31(2): 203–208.

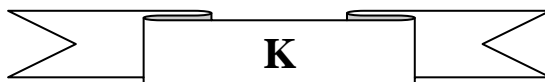


- 39) Hasheminya, S. M., Dehghannya, J. (2020). Composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* hulls' essential oil. *Food Bioscience*, 34: 100510.
- 40) Hashemnia, M., Nikousefat, Z., Yazdani-Rostam, M. (2015). Antidiabetic effect of *Pistacia atlantica* and *Amygdalus scoparia* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Comparative Clinical Pathology*, 24: 1301-1306.
- 41) Hatamnia, A. A., Rostamzad, A., Hosseini, M., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., Malekzadeh, P., Aminzadeh, B. M. (2015). Antioxidant capacity and phenolic composition of leaves from 10 Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) genotypes. *Natural Product Research*, 30(5): 600-604.
- 42) Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food Chemistry*, 145: 306-311.

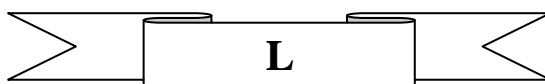


- 43) Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, (33): 213-217.

- 44) **Junqueira-Gonçalves, M. P., Yáñez, L., Morales, C., Navarro, M., Contreras, R. A., Zúñiga, G. E. (2015).** Isolation and characterization of phenolic compounds and anthocyanins from murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of antioxidant and antibacterial activity. *Molecules*, 20(4): 5698-5713.



- 45) **Kawashty, S. A., Mosharrafa, S. A. M., El-Gibali, M., Saleh, N. A. M. (2000).** The flavonoids of four Pistacia species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9): 915-917.
- 46) **Khiya, Z., Oualcadi, Y., Gamar, A., Amalich, S., Berrekhis, F., Zair, T., EL hilali, F. (2019).** *In vitro* Evaluation of Antioxidant Activity of the Methanol and Ethanol Extracts of *Pistacia atlantica* Desf from Morocco. *Phytothérapie*, 17(6): 321-333.
- 47) **Koosha, M., Hamedi, S. (2019).** Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties. *Progress in Organic Coatings*, 127: 338–347.



- 48) **Lacombe, A., Wu, V. C. H., White, J., Tadepalli, S., Andre, E. E. (2012).** The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food microbiology*, 30(1): 124-131.
- 49) **Lee, J. H., Lee, H. J., Chung, M. G. (2011).** Anthocyanin compositions and biological activities from the red petals of Korean edible rose (*Rosa hybrida* cv. Noblered). *Food Chemistry*, 129(2): 272-278.
- 50) **Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., Cevallos Cevallos, J. M. (2018).** Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food science & nutrition*, 6(4): 934-942.



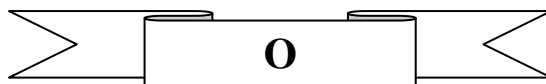
M

- 51) Ma, Y., Ding, S., Fei, Y., Liu, G., Jang, H., Fang, J. (2019). Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control*, 106: 106712.
- 52) Mahjoub, F., Rezayat, K. A., Yousefi, M., Mohebbi, M., Salari, R. (2018). *Pistacia atlantica* Desf. A review of its traditional uses, phytochemicals and pharmacology. *Journal of medicine and life*, 11(3): 180-186.
- 53) Malekzadeh, P., Hatamnia, A. A. H., Nourollahi, K. (2015). Total phenolic content and antioxidant activity of fruit and leaf of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) in Ilam province. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 6 (1): 1543-1549.
- 54) Minaiyan, M., Karimi, F., Ghannadi, A. (2015). Anti-inflammatory effect of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* volatile oil and gum on acetic acid-induced acute colitis in rat. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(2): 1-12.
- 55) Mohammadi, B., Maboud, H. E., Seyedi, S. M. (2019). Nutritional value and antioxidant properties of hull and kernel in *Pistacia atlantica* and *Pistacia khinjuk* fruits. *Journal of food science and technology*, 56(8): 3571-3578.

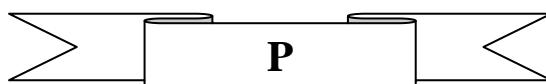


N

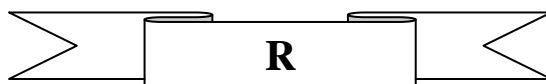
- 56) Nachvak, S. M., Hosseini, S., Nili-Ahmadabadi, A., Dastan, D., Rezaei, M. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* from Awraman. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 7(3): 222-230.
- 57) NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (1997). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA, M27-A.
- 58) NCCLS “National Committee for Clinical Laboratory Standards”. (2001). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement, M100- S11, Wayne, PA, USA.
- 59) Nouioua, W., Gaamoune, S. (2019). Antioxidant and Antibacterial Activities Valorisation of Two Extracts of *Pistacia atlantica* Desf. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 7(3): 147–150.



- 60) Ombra, M. N., Fratianni, F., Granese, T., Cardinale, F., Cozzolino, A., Nazzaro, F. (2015).** *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of purple potato extracts (*Solanum tuberosum* cv Vitelotte noire) following simulated gastrointestinal digestion. *Natural product research*, 29(11): 1087-1091.
- 61) Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44: 307–15.

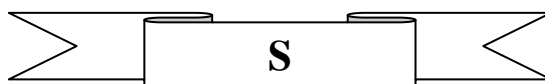


- 62) Peksel, A., Arisan, I., Yanardag, R. (2013).** Radical scavenging and anti-acetylcholinesterase activities of aqueous extract of wild Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) leaves. *Food Science and Biotechnology*, 22(2): 515–522.
- 63) Peksel, A., Arisan-Atac, I., Yanardag, R. (2010).** Evaluation of antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of the extracts of *Pistacia atlantica* Desf. Leaves. *Journal of food biochemistry*, 34(3): 451-476.
- 64) Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rebello, L. P. G., Gómez-Alonso, S., Duarte, R. M. T., Duarte, M. C. T., Godoy, H. T., Hermosín-Gutiérrez, I. (2016).** Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC–DAD–ESI–MSn and multivariate analysis. *Journal of functional foods*, 26: 506-516.
- 65) Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phospho-molybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337–341.



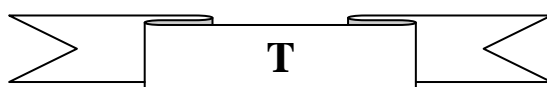
- 66) Rahal, K. (2008).** Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Échelle Nationale selon les recommandations de l'OMS. 5ème Edition. Ed *Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Algérie*.
- 67) Rahman, H. S. (2018).** Phytochemical analysis and antioxidant and anticancer activities of mastic gum resin from *Pistacia atlantica* subspecies *kurdica*. *OncoTargets and therapy*, 11: 4559–4572.

- 68) Rand, R. H., Ahmed, S. A., Law, S. V., Fatimah, A. B., Faridah, A., Fatemeh, J., Zamberi, S. (2011). Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*, 5: 96-106.
- 69) Rezaei, P. F., Fouladdel, S., Hassani, S., Yousefbeyk, F., Ghaffari, S. M., Amin, G., Azizi, E. (2012). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1054-1059.
- 70) Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., Golmohamadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food chemistry*, 173: 577-583.
- 71) Rigane, G., Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Ben Salem, R., Nasr, Z. (2017). Phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from *Pistacia atlantica*. *Natural Product Research*, 31(6): 696-699.



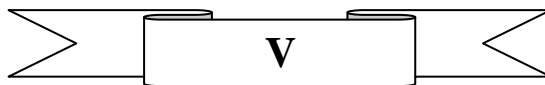
- 72) Saber-Tehrani, M., Givianrad, M. H., Aberoomand-Azar, P., Waqif-Husain, S., Jafari Mohammadi, S. A. (2013). Chemical composition of Iran's pistacia atlanticacold-pressed oil. *Journal of Chemistry*, 2013: 2090-9063.
- 73) Samavati, V., Adeli, M. (2014). Isolation and characterization of hydrophobic compounds from carbohydrate matrix of *Pistacia atlantica*. *Carbohydrate polymers*, 101: 890-896.
- 74) Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci Technol Int*, 4: 391-399.
- 75) Sharifi, M. S., Ebrahimi, D., Hibbert, D. B., Hook, J., Hazell, S. L. (2012). Bio-activity of natural polymers from the genus pistacia : avalidated model for their antimicrobial action. *Global journal of health science*, 4(1): 149-161.
- 76) Sifi, I., Dzoyem, J.P., Ouinten, M., Yousfi, M., McGaw, L.J., Eloff, J.N. (2015). Antimycobacterial, antioxidant and cytotoxicactivities of essential oil of gall of *Pistacia atlantica* Desf. From Algeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3): 150-155.
- 77) Sifi, I., Yousfi, M. (2019). Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de galles du Pistachier de l'Atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) en Algérie. *Phytothérapie*, 17(4): 175-183.

- 78) Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *The American Journal Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
- 79) Sun, T., Ho, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743-749.
- 80) Sun, X. H., Zhou, T. T., Wei, C. H., Lan, W. Q., Zhao, Y., Pan, Y. J., Wu, V. C. (2018). Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin rich Chinese wild blueberry extract on various foodborne pathogens. *Food Control*, 94: 155-161.



- 81) Tahir, N. A., Ahmed, J. O., Azeez, H. A., Palani, W. R. M., Omer, D. A. (2019). Phytochemical, antibacterial, antioxidant and phytotoxicity screening of the extracts collected from the fruit and root of wild mt. Atlas mastic tree (*Pistacia atlantica* subsp. *Kurdica*). *Applied ecology and environmental research*, 17(2): 4417-4429.
- 82) Tahir, N.A., Azeez, H.A., Hama Amin, H.H., Rashid, J.S., Omer, D.A. (2019). Antibacterial activity and allelopathic effects of extracts from leaf, stem and bark of Mt. Atlas mastic tree (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) on crops and weeds. *International Allelopathy Foundation Journal*, 46 (1): 121-132.
- 83) Tanideh, N., Masoumi, S., Hosseinzadeh, M., Safarpour, A. R., Erjaee, H., Koochi-Hosseiniabadi, O., Rahimikazerooni, S. (2014). Healing effect of pistacia atlantica fruit oil extract in acetic Acid-induced colitis in rats. *Iranian journal of medical sciences*, 39(6): 522-528.
- 84) Topçu, M., Ay, A., Bilici, C., Sarıkurkcu, M., Ozturk, A., Ulubelen, A. (2007). New flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3): 816–822.
- 85) Toul, F., Belyagoubi-Benhammou, N., Zitouni, A., Atik-Bekkara, F. (2017). Antioxidant activity and phenolic profile of different organs of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* from Algeria. *Natural Product research*, 31(6): 718–723.
- 86) Toul, F., Belyagoubi-Benhammou, N., Zitouni, A., Ghembaza, N., Atik-Bekkara, F. (2016). *In-vitro* antioxydant effects of tannin extracts of *Pistacia atlantica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(1): 1000-06.

- 87) Tzakou, O., Bazos, I., Yannitsaros, A. (2007). Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. From Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5): 358–362.



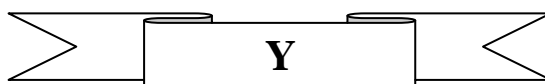
- 88) Vitali, L.A., Beghelli, D., Biapa-Nya, P.C. (2016). Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(6): 775–786.



- 89) Wafa, B. A., Makni, M., Ammar, S., Khannous, L., Hassana, A. B., Bouaziz, M., Es-Safi, N. E., Gdoura, R. (2017). Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. *International journal of food microbiology*, 241: 123-131.

- 90) Wagner, G.J. (1979). Content and Vacuole/Extravacuole Distribution of Neutral Sugars, Free Amino Acids, and Anthocyanin in Protoplasts. *Plant Physiology*, 1104: 64–88.

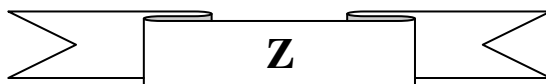
- 91) Wei, T., Sun, H., Zhao, X., Hou, J., Hou, A., Zhao, Q., Xin, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallicotannin, pistafolia A. *Life Sciences*, 70(16): 1889-1899.



- 92) Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Duhem, B., Gaydou, E. M. (2009). Isolation and characterization of a new hispolone derivative from antioxidant extracts of *Pistacia atlantica*. *Phytotherapy Research*, 23(9): 1237-1242.

- 93) Yousfi, M., Nadjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydou, E.M. (2005). Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* fruit growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(2): 93–96.

- 94) Yousfi, M., Nedjmi, B., Bellal, R., Bertal, D. B., Palla, G. (2002). Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 10(79): 1049-1050.



- 95) Zarshenas, M. M., Arabzadeh, A., AJDARI, T. M., Kordafshari, G., Zargaran, A., Mohagheghzadeh, A. (2012). Application of herbalexudates in traditional Persian medicine. *Galen Medical Journal*, 1(2): 78-83.
- 96) Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T., Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1725(1): 103-110.
- 97) Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on super oxide radicals. *Food Chem*, 64(4): 555-559.
- 98) Zhou, L., Xie, M., Yang, F., Liu, J. (2020). Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 117: 108621.
- 99) Zitouni, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Ghembaza, N., Toul, F., Atik-Bekkara, F. (2016). Assessment of Phytochemical Composition and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaf, Stem, Fruit and Root of *Pistacia lentiscus* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(4): 627-633.

الملخص

من أجل تقييم أجزاء مختلفة من نبات *Pistacia atlantica* ، تم اختيار البراعم الذكورية والأنثوية وحبوب اللقاح والأنثوسيانين من الثمار غير الناضجة عن طريق قياس مستويات المركبات الفينولية وتقييم خصائص مضادات الأكسدة، ثم النظر في دراسة النشاط المضاد للميكروبات للأنثوسيانين. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أفضل مردود وجد عند براعم الذكور بنسبة (2.828 ± 30.60 %) مع العلم أن المستخلصات الخام من براعم الذكور والإناث كانت غنية بالفينولات الكلية (648.9711 ± 4.8013 mg EAG/g MS و 636.8312 ± 4.7285) و العنصر المكثف (6.0223 ± 0.5379 et 4.1016 ± 0.5379 mg EC/g MS و 0.6240 ± 0.029) على التوالي، في حين أن مستخلص الخام لحبوب اللقاح كان غنيا بالفلافونيدات (15.5341 ± 1.2002 mg EC/g MS)، وكان محتوى الأنثوسيانين المسجل في الثمار غير الناضجة 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$. كشفت دراسة النشاط المضاد للأكسدة أن المستخلص الخام من براعم الذكور لديه أفضل قدرة إجمالية لمضادات الأكسدة (115.0790 ± 3.3804 mg EAA/g MS). من ناحية أخرى، فإن النشاط المضاد للجذور الأكثر إثارة للاهتمام بترتيب 0.1702 ± 0.014 mg/mL يعود للمستخلص الخام للبراعم الأنثوية. فيما يتعلق بالأنثوسيانين، أظهرت المستخلصات المائية والخام قدرات كبيرة لتقليل الحديد (0.054 ± 0.0018 mg/mL و 0.029 ± 0.002) على التوالي، وتنشيط نبيض البيتا كاروتين (0.0808 ± 0.025 mg/mL و 0.026 ± 0.003) على التوالي. بالنسبة للنشاط المضاد للميكروبات، كانت سلالات *B. cereus* و *M. luteus* و *B. subtilis* هي الأكثر حساسية لمستخلصات الأنثوسيانين المائية والخام مع أقل تركيز CMI يساوي 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

الكلمات المفتاحية : *Pistacia atlantica* ، البراعم ، حبوب اللقاح ، الثمار غير الناضجة ، الدراسة الكيمووبائية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات.

Résumé

A fin de valoriser les différentes parties de la plante *Pistacia atlantica*, les bourgeons mâles et femelles, les grains de pollen et les anthocyanes des fruits immatures ont été sélectionnés en quantifiant les teneurs en composés phénoliques et en évaluant les propriétés antioxydantes. L'étude de l'activité antimicrobienne des anthocyanes a été envisagée.

Les résultats obtenus ont révélé le meilleur rendement (30.60 ± 2.828 %) chez les bourgeons mâles. Notant que les extraits bruts des bourgeons mâles et femelles étaient riches en phénols totaux (636.8312 ± 4.7285 et 648.9711 ± 4.8013 mg EAG/g MS) et en tanins condensés (4.1016 ± 0.5379 et 6.0223 ± 0.6240 mg EC/g MS) respectivement, alors que l'extrait brut des grains de pollen était riche en flavonoïdes (15.5341 ± 1.2002 mg EC/g MS). La teneur en anthocyanes enregistrée dans les fruits immatures était de 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$. L'étude du pouvoir antioxydant a dévoilé que l'extrait brut des bourgeons mâles détient la meilleure capacité antioxydante totale (115.0790 ± 3.3804 mg EAA/ g MS). Par contre, l'activité anti-radical la plus intéressante de l'ordre de 0.1702 ± 0.0140 mg/ mL est marquée par l'extrait brut des bourgeons femelles. Concernant les anthocyanes, les extraits hydrolysé et brut ont présenté des capacités importantes à réduire le fer ($EC_{50} = 0.029 \pm 0.002$ et 0.054 ± 0.0018 mg/mL, respectivement) et à inhiber le blanchiment du β -carotène ($EC_{50} = 0.026 \pm 0.003$ et 0.0808 ± 0.025 mg/mL, respectivement). Pour l'activité antimicrobienne, les souches *B. cereus*, *M. luteus* et *B. subtilis* étaient les plus sensibles aux extraits hydrolysé et brut des anthocyanes avec une concentration de CMI la plus faible de 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

Mots clés : *Pistacia atlantica*, Bourgeons, Grains de pollen, Fruits immatures, Etude phytochimique, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne.

Abstract

To enhance the different parts of *Pistacia atlantica* plant, the male and female buds, pollen grains and anthocyanins of unripe fruits were selected by quantifying the levels of phenolic compounds and evaluating antioxidant properties. The study of antimicrobial activity of anthocyanins was investigated.

The results showed that the best yield ($30.60 \pm 2.828\%$) was in male buds. Noting that the crude extracts of male and female buds were rich in total phenols (636.8312 ± 4.7285 and 648.9711 ± 4.8013 mg GAE/g DM) and condensed tannins (4.1016 ± 0.5379 and 6.0223 ± 0.6240 mg CE/g DM) respectively, while the crude extract of pollen grains was rich in flavonoids (15.5341 ± 1.2002 mg CE/g DM). The anthocyanin content recorded in unripe fruit was 0.468 ± 0.052 $\mu\text{mol/g}$.

The study of antioxidant power revealed that the crude extract of male buds has the best total antioxidant capacity (115.0790 ± 3.3804 mg AAE/g DM). On the other hand, the most interesting anti-radical activity was marked by the crude extract of female buds in the range of 0.1702 ± 0.0140 mg/mL. For anthocyanins, hydrolyzed and crude extracts had a significant reducing capacity ($EC_{50} = 0.029 \pm 0.002$ and 0.054 ± 0.0018 mg/mL, respectively), and an important inhibitory capacity in the β -carotene bleaching test ($EC_{50} = 0.026 \pm 0.003$ and 0.0808 ± 0.025 mg/mL, respectively). For antimicrobial activity, *B. cereus*, *M. luteus* and *B. subtilis* strains were most sensitive to hydrolyzed and crude extracts of anthocyanins with the lowest MIC concentration of 781.25 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Pistacia atlantica*, Buds, Pollen Grains, Unripe fruits, Phytochemical study, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.