

Université Abou Bekr 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)

THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat LMD

Option : Nutrition et santé

Présentée par : M^{me} BENMAHIEDDINE Assia,

épouse ZENAGUI

Thème



Propriétés antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire des extraits des pieds mâle et femelle de différents organes de *Pistacia atlantica* récoltée de trois stations de la région de Tlemcen

Soutenue le 12/07/2023, devant le jury

Président : Mr CHABANE SARI D.

Professeur Université de Tlemcen

Examineur : Mme EL ZEREY-BELASKRI A

MCA Université d'Oran 1

Examineur : Mr BELYAGOUBI L.

MCA Université de Tlemcen

Directrice de thèse : Mme BELYAGOUBI-BENHAMMOU N.

Professeur Université de Tlemcen

Co-directeur de thèse : Mr DJEBLI N.

Professeur Université de Mostaganem

Année Universitaire 2022- 2023

Dédicaces

A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et tous leurs Sacrifices

Que dieu les garde et les protège.

A mon mari Fawzi et mes chers enfants

A mes frères et sœurs

A ma famille et belle famille

A mes amis

Remerciements

*Je remercie **ALLAH** tout puissant Pour m'avoir donné la patience et le courage de surmonter tous les obstacles auxquels j'ai fait face durant la réalisation de cette thèse.*

*Mes sincères remerciements s'adressent à Mr **CHABANE SARI Daoudi**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.*

Je tiens à exprimer mes remerciements et mon respect aux membres du jury :

*Je remercie infiniment Madame **EL ZEREY-BELASKRI** Asma, Maître de Conférences Classe A à l'Université d'Oran pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger cette thèse et d'être examinatrice, je la remercie pour son aide précieuse et ses conseils judicieux.*

*Que Monsieur **BELYAGOUBI Larbi**, Maître de Conférences Classe A, à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, reçoit mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger mon travail. Sa compétence et sa grande connaissance des techniques dans le domaine de Microbiologie m'ont été d'une grande utilité dans ce travail.*

*J'aimerais adresser ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse **Mme. BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, Professeur à l'Université de Tlemcen, Faculté SNV-STU, Département de Biologie, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, tout en me faisant bénéficier de son expérience, de ses compétences, de ses encouragements et surtout de son temps. Je tiens aussi à la remercier pour sa patience dans les moments difficiles et surtout ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.*

*D'autre part, j'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur **DJEBLI Noureddine**, Professeur à l'Université de Mostaganem et chercheur au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytothérapie, pour m'avoir fait l'honneur de co-diriger cette thèse, ainsi que de m'avoir offert la chance de réaliser mon travail concernant l'activité anti-inflammatoire au sein de son laboratoire de recherche. Je vous remercie pour votre accueil, votre aide, vos précieux conseils, et surtout pour vos grandes qualités humaines*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur **EL HACI Imad**, Enseignant-Chercheur au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques, Alger et membre du Laboratoire des Produits Naturels, pour son aide scientifique, ses précieux conseils, sa compétence et sa grande disponibilité.*

J'adresse également un grand merci à tous les membres du Laboratoire des produits Naturels, pour les conseils, les services rendus, et toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensemble.

*Ce travail n'aurait pu être mené sans l'aide précieuse du Laboratoire d'Analyse à l'université de Rome, Tor Vergata, Italie (Mr **GISMONDI Angelo**), du Laboratoire de pharmacognosie et phytothérapie, Mostaganem (Mme **AMARI Nesrine**) et du Laboratoire d'Anatomo-Pathologie, CHU, Tlemcen (Pr **DIB Malika**). Soyez assurée, de ma profonde reconnaissance.*

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Production scientifique

1. Publications

- **Assia Benmahieddine**, Nabila Belyagoubi-Benhammou, Larbi Belyagoubi, Asma El Zerey-Belaskri, Angelo Gismondi, Gabriele Di Marco, Antonella Canini, Nadjat Bechlaghem, Fawzia Atik Bekkara, Noureddine Djebli. Influence of plant and environment parameters on phytochemical composition and biological properties of *Pistacia atlantica* Desf. *Biochemical Systematics and Ecology* **2021**; 95: 104231. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2021.104231>.
- Larbi Belyagoubi, Bouchra Loukidi, Nabila Belyagoubi-Benhammou, Angelo Gismondi, Gabriele Di Marco, Alessia D'Agostino, Antonella Canini, **Assia Benmahieddine**, Karima Rouigueb, Dounia Ben Menni & Fawzia Atik-Bekkara. Valorization of Algerian Saffron: Stigmas and Flowers as Source of Bioactive Compounds. *Waste and Biomass valorization* **2021**; 12: 6671–6683. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01454-6>.
- Dounia Ben Menni, Nabila Belyagoubi-Benhammou, **Assia Benmahieddine**, Hanane Ben Menni, Angelo Gismondi, Valentina Monteleone, Gabriele Di Marco, Alessia D'Agostino, Antonella Canini, Houari Benamar, Fawzia Atik-Bekkara. Identification of Sterols from *Anabasis articulata* (Forssk.) Moq. (Chenopodiaceae) Growing in Algeria and Study of Their Potential Bioactivity. *Waste and Biomass Valorization* **2022**; <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01717-w>.
- Saida Hanane Zitouni-Nourine , Nabila Belyagoubi-Benhammou , Fatima El-Houaria Zitouni-Haouar , Omar Douahi, Faouzia Chenafi , Habiba Fetati , Siham Chabane Sari , **Assia Benmahieddine** , Chahinez Zaoui , Fatima Zohra Nadjat Mekaouche , Fawzia Atik Bekkara , Nadia Kambouche , Angelo Gismondi , Houari Toumi. *Echinops spinosissimus* Turra Root Methanolic Extract: Characterization of the Bioactive Components and Relative Wound Healing, Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Plants* **2022**; 11(3440):1-15. DOI: 10.3390/plants11243440.
- **Assia Benmahieddine**, Nabila Belyagoubi-Benhammou, Larbi Belyagoubi, Nesrine Ouda Amari, Asma El Zerey-Belaskri, Angelo Gismondi, Gabriele Di Marco, Antonella Canini, Salim Habi, Fawzia Atik Bekkara, Noureddine Djebli. Leaf-buds of *Pistacia atlantica*: a novel source of bioactive molecules with high anti-inflammatory, antioxidant, anti-tyrosinase and antimicrobial properties. (Soumis à la revue: *Physiology and Molecular Biology of Plant Journal*).

2. Communications internationales

- **Assia Benmahieddine**, Nabila Belyagoubi-Benhammou, Larbi Belyagoubi, Nouredine Djebli, El Zerey-Belaskri Asma, Angelo Gismondi, Gabriele Di Marco, Antonella Canini, Fawzia Atik Bekkara. "Influence of gender, organ type and harvest region on phytochemical content and antioxidant activity of root, leaf-bud and fruit extracts from *pistacia atlantica* subsp. *atlantica*". Séminaire international environnement et toxicologie (SINENTOX) 18-19 Février **2019**, Constantine, Algérie.
- Nabila Belyagoubi-Benhammou, **Assia Benmahieddine**, Larbi Belyagoubi, Asma el zerey-Belaskri, Fawzia Atik bekkara, Nouredine Djebli. « Étude phytochimique et biologique des extraits de *Pistacia atlantica* ». 6^{ème} MGIBR workshop internationale des plantes à parfum Aromatiques, Médicinales et condimentaires « Vertus et perspectives de développement », 21-22 Décembre **2020**, Tlemcen, Algérie.
- Dounia Ben Menni, Nabila Belyagoubi-Benhammou, **Assia Benmahieddine**. « Evaluation du pouvoir antioxydant et neuroprotectif de l'extrait des stéroïdes d'*Anabasis articulata* de la région de Béchar ». 6^{ème} MGIBR workshop internationale des plantes à parfum Aromatiques, Médicinales et condimentaires « Vertus et perspectives de développement », 21-22 Décembre **2020**, Tlemcen, Algérie.
- Otmane Boutrif, Nabila Belyagoubi-Benhammou, **Assia Benmahieddine**, Dounia Ben Menni, Fawzia Atik Bekkara. « Evaluation de l'activité antioxydante des fractions d'alcaloïdes d'*Anabasis articulata* ». 6^{ème} MGIBR workshop internationale des plantes à parfum Aromatiques, Médicinales et condimentaires « Vertus et perspectives de développement », 21-22 Décembre **2020**, Tlemcen, Algérie.

3. Communication nationale

- **Assia Benmahieddine**, Nabila Belyagoubi-Benhammou, Nouredine Djebli, Nesrine Ouda Amari, Angelo Gismondi, Valentina Monteleone, Gabriele Di Marco, Lorena Canuti, Antonella Canini, Fawzia Atik Bekkara. "Anti-inflammatory and antioxidant activities of hydro-methanolic extract from *Pistacia atlantica* Desf. leaf-buds". Doctoriales SNV, 08 Décembre **2018**, Tlemcen, Algérie.

الملخص

Pistacia atlantica هي نبتة طبية تحتل مكانا مهما في عالم الطب التقليدي. ومن أجل تثمين مختلف أجزاء النبتة، قمنا بدراسة بعض النشاطات البيولوجية (المضادة للأكسدة، مضادات الميكروبات، مضادات الالتهابات و مضادات التروزيانز) لمختلف المستخلصات التي أعدت من نبتة *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* وهذا وفقا لنوع الجنس، نوع الأعضاء (الجذور، البراعم والفواكه) ، الموقع الجغرافي ومرحلة نضج الفواكه. وتم تحديد محتويات متعدد الفينول عبر تقنيات قياس الطيف الضوئي. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة في المختبر من خلال تقييم القدرة الكلية لمقاومة الأكسدة CAT وتقنية DPPH.

بالإضافة إلى ذلك، فإن تحديد النشاط المضاد للميكروبات قد تم عن طريق الانتشار القرصي وتقنية التخفيف في وسط سائل. تم تقييم النشاط المضاد للالتهاب بواسطة نموذج الالتهاب الحاد، الناجم عن حقن الكاراجينين في الفئران. وأجريت دراسة نسيجية تكملية. كما قمنا بدراسة التركيب الكيميائي للمستخلصات المختارة بواسطة كروماتوغرافيا في المرحلة السائلة عالية الأداء (CLHP-DAD).

أظهرت النتائج أن البراعم تستحوذ على أعلى محتوى متعدد الفينول (9.84 ± 565.74 ملليغرام مكافئ من حمض الغاليك /غرام من المادة الجافة)، تليها مستخلصات الفواكه والجذور. وتراوحت تركيزات الفلافونويدات والمركبات العنصرية المتكثفة بين 0.03 ± 0.38 إلى 0.11 ± 1.92 مغ معادل حمض الكاتشين/غ من المادة الجافة، ومن 0.03 ± 0.37 إلى 0.94 ± 16.54 مغ معادل حمض الكاتشين/غ من المادة الجافة على التوالي.

فيما يتعلق بمعاينتي DPPH و CAT، تراوحت القيم بين 0.000 ± 0.038 و 0.114 ± 1.331 مغ/مل ومن 1.58 ± 0.06 إلى 2.58 ± 43.64 مغ/مل، على التوالي. أظهرت مستخلصات البراعم أعلى نشاط بيولوجي ضد البكتيريا المسببة للأمراض وانخفاض كبير في معدل الالتهاب و هذا من الساعة الأولى إلى الساعة السادسة، وذلك بصفة نسبية مع جرعة المستخلص المعطاة. وقد أكدت الدراسة النسيجية للأنسجة الملتهبة هذه النتائج. و تم تسجيل نفس النتائج بالنسبة لنشاط منع التروزيانز وذلك بقيمة 0.098 ± 0.000 مغ/مل. كشف التحليل الكيميائي للمستخلصات المختارة (CLHP-DAD) أن حمض الكافيك وحمض ثنائي ميثيل الأليل من حمض الكافيك موجودان بكمية معتبرة في مستخلص البراعم، في حين أن الروتين والهيدروكسيستيروسول كانا وفيرين في مستخلص الفاكهة الحمراء .

تشير الأدلة الحالية أن نبتة *Pistacia atlantica* من خلال ثرائها بالجزئيات النشطة بيولوجيًا، يمكن استخدامها في العلاج، والصناعة الغذائية ومستحضرات التجميل.

الكلمات المفتاحية: *Pistacia atlantica* ، التركيب الكيميائي، المركبات الفينولية ، النشاطات البيولوجية .

Résumé

Pistacia atlantica est une plante médicinale qui occupe une place appréciable dans le monde de la médecine traditionnelle. Afin de valoriser les différentes parties de la plante, nous nous sommes intéressés à étudier les propriétés biologiques (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire et anti-tyrosinase) des différents extraits préparés à partir de *P. atlantica* selon le genre, le type d'organe (racines, bourgeons et fruits), la situation géographique et le stade de maturation des fruits. Les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins condensés ont été déterminées par des techniques spectrophotométriques. L'activité antioxydante a été déterminée, *in vitro*, par les tests de la capacité antioxydante totale CAT et le piégeage du radical libre DPPH. Par ailleurs, la détermination de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques et celle des micro-dilutions en milieu liquide. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo* en réduisant l'œdème de la patte induit par le carraghénane chez les souris. Une étude histologique complémentaire a été effectuée. L'étude de la composition chimique des extraits sélectionnés a été réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP-DAD).

Les résultats obtenus ont montré que les extraits de bourgeons présentaient la teneur phénolique la plus élevée (565.74 ± 9.84 mg EAG/ g MS), suivis des extraits de fruits et de racines. Les teneurs en flavonoïdes et en tanins condensés variaient de 0.38 ± 0.03 à 1.92 ± 0.11 mg EC/g MS et de 0.37 ± 0.03 à 16.54 ± 0.94 mg EC/g MS, respectivement. Pour les tests de DPPH et de la CAT, les valeurs variaient de 0.038 ± 0.000 à 1.331 ± 0.114 mg/mL et de 1.58 ± 0.06 à 43.64 ± 2.58 mg/mL, respectivement. De plus, les extraits de bourgeons ont montré la bioactivité la plus élevée contre les bactéries pathogènes ainsi qu'une réduction significative de l'œdème, de la 1^{ère} heure à la 6^{ème} heure, et cela de manière dose-dépendante (150, 200 et 300 mg/kg). Les observations histologiques des tissus enflammés ont également confirmé ce résultat. Les extraits de bourgeon ont démontré une inhibition de l'activité de la tyrosinase, avec une CE_{50} de 0.098 ± 0.00 mg/mL de façon dose-dépendante. Par ailleurs, l'analyse CLHP-DAD a révélé que l'acide caféique et l'acide diméthyl-allyl caféique caractérisaient l'extrait de bourgeon, tandis que la rutine et l'hydroxytyrosol étaient abondants dans l'extrait des fruits rouges. Ces résultats suggèrent que *P. atlantica* par sa richesse en molécules bioactives peut être utilisé en thérapie, en agro-alimentaire et en cosmétique.

Mot clés : *Pistacia atlantica*; Composition chimique; Composés phénoliques; Activités biologiques.

Abstract

Pistacia atlantica is a medicinal plant that occupies an important place in the world of traditional medicine. In order to enhance the different parts of the plant, we have studied the biological properties (antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory) of the different extracts prepared from *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica*, according to gender, organ type (roots, buds and fruits), harvest region and stage of ripening.

The polyphenol contents, flavonoïds and condensed tannins were determined by spectrophotometric techniques. The antioxidant activity was determined *in vitro* by the evaluation of the total antioxidant capacity CAT and DPPH assay. In addition, the determination of the antimicrobial activity was carried out by diffusion on disks methods and micro-dilutions in liquid medium assay. The anti-inflammatory activity was evaluated *in vivo* by reducing carrageenan-induced hind paw edema in mice. A complementary histological study was performed. The chemical composition of the selected extracts was studied by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD).

The results showed that buds extracts exhibited the highest phenolic content (565.74 ± 9.84 mg equivalents of gallic acid (EGA)/g dry matter (DM)), followed by fruit and root extracts. The concentrations of flavonoïds and condensed tannins ranged from 0.38 ± 0.03 to 1.92 ± 0.11 mg catechin equivalents/g DM and from 0.37 ± 0.03 to 16.54 ± 0.94 mg EC/g DM, respectively. For DPPH and CAT assays, values ranged from 0.038 ± 0.000 to 1.331 ± 0.114 mg/mL and from 1.58 ± 0.06 to 43.64 ± 2.58 mg/mL, respectively. Besides, bud extracts showed the highest bioactivity against pathogenic bacteria and a significant reduction in edema, from the 1st to the 6th hour, in a dose-dependent manner (150, 200 and 300 mg/kg). Histological observations of inflammed tissues also confirmed these results. The plant preparation was then documented to inhibit tyrosinase activity, with an EC_{50} value of 0.098 ± 0.00 mg/mL in a dose-dependent manner. In addition, HPLC-DAD analysis revealed that caffeic acid and dimethyl-allyl caffeic acid characterized bud extract, while rutin and hydroxytyrosol were abundant in red fruit extract. Current evidence suggests that *Pistacia atlantica* by its richness in bioactive molecules can be used in therapy, food industry and cosmetic products.

Keywords: *Pistacia atlantica*; Chemical composition; Phenolic compounds; Biological activities.

Liste des figures

Figure 1. Photo du matériel végétale.....	10
Figure 2. Situation géographique des stations de collecte.....	12
Figure 3. Photos de microplaque à 96 puits utilisée dans la détermination de la CMI.....	18
Figure 4. Photo de mesure de l'œdème de la patte de souris par le pied de coulisse digital	20
Figure 5. Réalisation des coupes de prélèvement tissulaire à l'aide d'un microtome.....	22
Figure 6. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en phénols totaux des organes étudiés.....	30
Figure 7. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en flavonoïdes (Flv).	31
Figure 8. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en tanins condensés (TC).	32
Figure 9. Technique de diffusion en milieu gélosé par contact direct sur disque	33
Figure 10. Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB	37
Figure 11. Pourcentage d'augmentation de l'œdème (%AUG) des groupes traités par l'extrait des bourgeons et le diclofenac comme témoin.....	40
Figure 12. Pourcentage d'inhibition de l'œdème (%INH) des groupes traités et le diclofénac comme témoin	41
Figure 13. Observation au microscope optique des tissus des pattes de souris du groupe témoin et standard	42
Figure 14. Observation au microscope optique des tissus des pattes de souris des groupes traités par l'extrait	43
Figure 15. Activité anti-tyrosinase de l'extrait de bourgeon foliaire (HMLE)	44

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques géographiques et bioclimatiques du matériel étudié	11
Tableau 2. Origines des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien.....	16
Tableau 3. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits étudiés.....	27
Tableau 4. Teneurs en capacité antioxydante totale et CI50 du test du DPPH dans les extraits de <i>P. atlantica</i>	28
Tableau 5. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence d'extraits de bourgeons foliaires de <i>P. atlantica</i>	34
Tableau 6. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence d'extraits de racines de <i>P. atlantica</i>	35
Tableau 7. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence d'extraits de fruits de <i>P. atlantica</i>	36
Tableau 8. Concentrations CMI, CMB et CMF des extraits de bourgeons foliaires et des racines.....	38
Tableau 9. Concentrations CMI et CMB des extraits de fruits	39
Tableau 10. Temps de rétention et quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes, dans l'extrait des bourgeons d'arbre mâle de la station Saf-saf et de l'extrait de fruits rouges de la station Oudjlida par CLHP-DAD	45

Liste des abréviations

- AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AUG** : Pourcentage d'augmentation de l'œdème
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Hydrotoluène butylé
- BMH** : Bouillon Mueller-Hinton
- CAT** : Capacité antioxydante totale
- CLHP** : Chromatographie liquide à haute performance
- CMB** : Concentration minimale bactéricide
- CMF** : Concentration minimale fongicide
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- COX** : Cyclooxygénase
- DMSO** : Diméthyle Sulfoxide
- DPPH** : Radical 2.2 diphenyle-1- picrylhydrazyl
- EAA** : Équivalents d'acide ascorbique
- EAG** : Équivalents d'acide gallique
- EC** : Équivalents de catéchine
- EC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50 % ; La concentration efficace
- EQ** : Équivalents de quercétine
- EM** : Équivalents métabolites
- FLV** : Flavonoïdes
- GMH** : Gélose Mueller-Hinton
- GS** : Gélose Sabouraud
- INH** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème
- Ipl** : Injection intra-plantaire
- LOX** : Lipoxygénase
- MS** : Matière sèche
- NOS** : Oxyde nitrique synthase
- PF** : poids frais
- PT** : Phénols totaux
- TC** : Tanins condensés

Table des matières

<i>I. Remerciements</i>	
<i>II. Dédicace</i>	
<i>III. ملخص</i>	
<i>IV. Résumé</i>	
<i>V. Abstract</i>	
<i>VI. Production scientifiques</i>	
<i>VII. Liste des tableaux</i>	
<i>VIII. Liste des figures</i>	
<i>IX. Liste des abréviations</i>	
PREMIERE PARTIE	1
Introduction générale	1
DEUXIEME PARTIE	9
Matériels et Méthodes	9
I. Préparation des extraits et dosages des composés phénoliques	10
1. Collecte du matériel végétal	10
2. Situation géographique de la station d'échantillonnage.....	10
3. Préparation des extraits hydro-méthanoliques	13
4. Dosage des phénols totaux	13
5. Dosage des flavonoïdes	13
6. Dosage des tanins condensés	14
II. Evaluation du pouvoir antioxydant	14
1. Capacité antioxydante totale (CAT).....	14
2. Piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH')	14
III. Etude <i>in vitro</i> de l'activité antimicrobienne	15
1. Provenance des germes utilisés	15
2. Mise en culture des souches	16
3. Méthode de diffusion sur disque	16
4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI et CMB	17
IV. Etude <i>in vivo</i> de l'activité anti-inflammatoire	18
1. Matériel biologique	19
2. Matériel végétal.....	19
3. Etude toxicologique.....	19

4. Prétraitement par les extraits	19
5. Induction de l'inflammation.....	20
6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	20
6.1. Mesure de l'œdème	20
6.2. Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG).....	20
6.3. Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)	21
6.4. Etude histologique	21
6.4.1. Fixation	21
6.4.2. Décalcification	21
6.4.3. Déshydratation	21
6.4.4. Inclusion.....	22
6.4.5. Préparation de la coupe (microtomie).....	22
6.4.6. Réhydratation et coloration.....	22
6.4.7. Montage des lames.....	23
V. Etude de l'activité anti-tyrosinase.....	23
VI. Analyse chromatographique.....	23
VII. Analyse statistique.....	24
TROISIEME PARTIE.....	25
Résultats et interprétations	25
1. Détermination des teneurs en composés phénoliques	25
2. Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de <i>P. atlantica</i>	25
3. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de <i>P. atlantica</i>	33
4. Activité anti-inflammatoire	40
4.1. Toxicité aiguë	40
4.2. Œdème de la patte induit par la carragénine.....	40
4.3. Étude histologique	42
5. Activité inhibitrice de la tyrosinase.....	44
6. Analyse chromatographique CLHP-DAD	44
Discussion Générale	46
Conclusion.....	53
Références bibliographiques	55
Annexes	68

PREMIERE PARTIE

Introduction générale

La médecine traditionnelle est très répandue dans toutes les régions du monde et son usage ne cesse de croître dans les pays industrialisés. En Afrique, jusqu'à 80 % de la population a recours à la médecine traditionnelle (OMS, 2019)

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phytogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (Dobignard et Chatelain, 2010-2013), et plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques utilisées dans le traitement des maladies les plus connues telles que les maladies cardiovasculaires, gastriques, neurologiques et respiratoires (Miara et al., 2019). De ce fait, l'intérêt pour les antioxydants, les antimicrobiens et les anti-inflammatoires, particulièrement d'origine végétale, a considérablement augmenté ces dernières années.

Les études menées sur la pharmacopée traditionnelle Algérienne ont décrit plusieurs espèces, parmi lesquelles figure le pistachier de l'Atlas (ou *Pistacia atlantica* Desf).

Le genre *Pistacia* (famille des Anacardiaceae) comprenant au moins 11 espèces différentes (Zohary, 1952 ; Parfitt et Badenes, 1997) est largement réparti du sud-ouest de l'Asie au nord-ouest de l'Afrique (Samavati et Adeli, 2014). Cinq espèces du genre *Pistacia* sont présentes en Algérie et caractérisent l'environnement d'Afrique du Nord et le Moyen-Orient : *P. atlantica* Desf., *P. lentiscus* L., *P. terebinthus* L., l'hybride spontané *Pistacia x saportae* Burna et *P. vera* L. (Quezel et Santa 1963 ; El Zerey-Belaskri et al., 2013).

Pistacia atlantica Desf. est l'une des espèces sauvages les plus diffusées de ce taxon. En arabe, cette plante est appelée « Al Bottm » ou « El buttum al atlasi » pour la distinguer de *Pistacia terebinthus* qui est également appelé parfois « El butum » (El Zerey-Belaskri, 2016) ; toutefois, de nombreux noms vernaculaires sont connus dans les différentes régions où il pousse (par exemple btom, bettam, botma, battach, iggt, iqq, idj, tismelegt, tesemhalt) (Quezel et Santa, 1963 ; El Zerey-Belaskri, 2016). Ses feuilles sont larges, imparipennées, à rachis finement ailés, et à folioles lancéolées et abtuses au sommet caduques et chutent en automne, d'une couleur vert pâle, imparipennées, glabres et sessiles (El Zerey-Belaskri et Benhassaini, 2017). Les fleurs apparaissent en été, elles sont apétales, rougeâtres et petites en panicules axillaires (Quezel et Santa, 1963). Les fruits, dont l'appellation vernaculaire « El khodri », pour sa couleur vert foncée à maturité (Belhadj, 1999), ou « Tikouaouéche » au Maroc (Yaaqobi et al., 2009), ou « Godhime » par la population saharienne (Benarradj, 2010) sont des drupes comestibles légèrement ovales et aplaties, mesurant de 6 à 8 mm de long et de 5 à 6 mm de large à maturité, de couleur jaune au stade immature, qui change progressivement en rouge puis atteignent leur maturité au mois de septembre tout en ayant

une couleur vert foncée. L'écorce est lisse à l'âge jeune et squameux à un âge avancé (**Monjauze, 1980**), produit une résine mastic qui exsude naturellement de façon abondante par temps chaud (**Belhadj, 2001**).

P. atlantica possède un important rôle ethnobotanique dans la population locale où cette plante est utilisée dans la médecine traditionnelle depuis l'antiquité (**Benhassaini et al., 2003; El Zerey-Belaskri et Benhssaini, 2017**). Elle est riche en composés biologiquement actifs, tels que la glucogalline, l'acide gallique, l'acide galloylquinique, l'acide gentisique, l'acide galloylshikimique, le gallate de méthyle, l'acide quinique, l'acide digalloylquinique, l'acide digallique, le trigalloylglucose, le tétragalloylglucose et l'acide tétragalloylquinique (**Ben Ahmed et al., 2018**). Ces molécules appartiennent aux métabolites secondaires, dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais représentent une source considérable de molécules utilisables par l'homme dans différents domaines, tels que la pharmaceutique ou l'agro-alimentaire.

Les composés phénoliques peuvent assurer divers rôles dans:

- Interactions des plantes avec leur environnements biologique et physique (résistance aux UV, relations avec les bactéries, les champignons, etc.);
- Certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, ...);
- La conservation après récolte de certains végétaux ; les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelle, etc.);
- Les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus, boissons fermentées, etc.) (**Macheix et al., 2005**).

A côté de ces fonctions physiologiques au niveau du végétal, les composés phénoliques possèdent des effets biologiques très marqués tels que les effets antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires ainsi que dans le traitement de maladies telles que l'obésité, le cancer et le diabète (**Zhang et al., 2022**). Certaines activités biologiques importantes sont illustrées ci-dessous.

L'activité antioxydante dont le principe est la capacité des substances appelées des antioxydants, à neutraliser ou réduire les dommages causés par les radicaux libres dans un organisme, et ainsi permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des espèces réactives de l'oxygène (**Vansant, 2004**). Les antioxydants sont des substances qui se présentent à faible concentration par rapport au substrat oxydable et sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat.

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (**Cano et al., 2006**).

Un antioxydant peut agir par différentes manières (**Coene, 2004**) :

- ✓ Il peut arrêter la réaction en chaîne qui précède la multiplication des radicaux libres, grâce à la stabilité de la structure des antioxydants.
- ✓ Il peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci et en le préservant ainsi de l'oxydation.
- ✓ Il peut absorber l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur.
- ✓ Il peut aussi agir via la chélation avec des métaux, ce qui permet de ralentir les réactions de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer ferreux avec le peroxyde d'hydrogène selon une réaction d'oxydo-réduction).

Les principales sources d'antioxydants sont représentées généralement en deux groupes : les antioxydants d'origine endogène qui se compose de protéines, d'oligoéléments et d'enzymes tels que (La superoxyde dismutase, le glutathion- peroxydase...) et les antioxydants d'origine exogène ; ce qui signifie qu'elle provient de l'extérieur de l'organisme.

On distingue deux origines d'antioxydants exogènes, qui sont les médicaments comme les bêtabloquants, les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antihypertenseurs qui ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (**cavin, 1999**), et les antioxydants naturels d'origine nutritionnelle tels que l'acide ascorbique (vitamine C), les caroténoïdes et les polyphénols (flavonoïdes, tanins).

De nombreuses études ont montré que les polyphénols végétaux peuvent être utilisés comme antioxydants contre différentes maladies induites par le stress oxydatif (**Mandal et al., 2009; Pawlowska et al., 2019**). L'explication de ces bienfaits est la "théorie du piègeur biochimique", selon laquelle les composés polyphénoliques neutralisent les radicaux libres en formant des complexes chimiques stables, empêchant ainsi toute réaction ultérieure (**Sroka et Cisowski, 2003**).

Les composés phénoliques ont également démontré des activités antimicrobiennes, antifongiques et antivirales potentielles (**Chavez et al., 2006**), surtout que la résistance aux antibiotiques est devenue un grave problème de santé publique, touchant la plupart des agents antibactériens, et cela dans tous leurs champs d'action. Les antibiotiques perdent de leur

efficacité et les maladies que l'on croyait éradiquées ressurgissent. D'autre part, de nombreuses questions se posent à l'heure actuelle sur la toxicité des substances synthétiques. Or ces produits non seulement éliminent l'infection mais affaiblissent en même temps l'organisme qui par la suite aura des difficultés à recréer son propre système de défense. La diminution de l'efficacité des moyens de lutte impose à trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques, en synthétisant de nouveaux composés aux vertus bactéricides (**Alami et al., 2005**).

Les mécanismes d'action de ces composés sur les cellules bactériennes ont été attribués à leur capacité à supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne, tels que, l'inhibition de la formation de biofilm, la neutralisation des toxines bactériennes, la réduction de l'adhésion des ligands d'hôte, et montrent une synergie avec les antibiotiques (**Miklasinska-Majdanik et al., 2018**). La littérature rapporte que les polyphénols sont des substances antimicrobiennes efficaces vis-à-vis d'une large gamme de micro-organismes (**González-Segovia et al., 2008; Orhan et al., 2010 ; Othmane et al., 2019**) et ils ont de multiples cibles cellulaires et peuvent viser différentes fonctions et composants dans la cellule (**Boban et al., 2010**). **Cushnie et Lamb (2005)** ont rapporté que les mécanismes antibactériens de plusieurs flavonoïdes pourraient être attribués à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques, l'inhibition de la fonction de la membrane cytoplasmique, ou l'inhibition du métabolisme énergétique, en se complexant avec les protéines extracellulaires et avec la paroi bactérienne.

De plus les polyphénols s'avèrent d'excellents candidats pour développer de nouveaux antimicrobiens alimentaires et des agents de conservation (**Li et al., 2014**).

A cet égard, les fabricants de produits alimentaires ont été encouragés à utiliser des antioxydants naturels au lieu de composés synthétiques afin de maintenir les valeurs nutritionnelles de leur produits (**Balasundram et al., 2006**). Par exemple, les antioxydants synthétiques tels que l'hydrotoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) qui peuvent être inadéquats pour la consommation humaine ; car plusieurs recherches ont mentionné leurs propriétés toxiques pour la santé humaine et l'environnement (**Edziri et al., 2012**). Ils peuvent être remplacés par des extraits des végétaux, en particulier des polyphénols (**Moure et al., 2001**).

Les polyphénols peuvent aussi manifester un effet anti-inflammatoire. L'inflammation étant un phénomène de défense non spécifique répondant à une agression, et qui vise à maintenir l'intégrité du soi, elle agit pour éliminer les infections et favoriser la cicatrisation des plaies (**Liu et al., 2019**). Cette réponse, dénommée inflammation aigue est un phénomène bénéfique

pour l'organisme qui lui permet de récupérer son intégrité physiologique. L'aspect négatif de la réponse inflammatoire intervient quand cette dernière se persiste et devient une inflammation chronique. Dans ce cas la réaction inflammatoire doit être contrôlée par les médicaments (**Weill et Batteux, 2003**).

Les mécanismes humoraux et cellulaires de l'inflammation sont nombreux et complexes. Ils impliquent des facteurs de régulation tels que le facteur kappa B (NF-kappa B) ainsi que des substances de signalisation synthétisées par des cellules du système immunitaire telles que des cytokines et les prostaglandines (**Amri et al., 2018**). De nombreux facteurs peuvent être à l'origine du processus de l'inflammation ; les agents le plus souvent rencontrés sont : l'hypoxie (par ischémie le plus souvent); les agents physiques (les traumatismes, les brûlures, les radiations); les agents chimiques (les substances caustiques); les agents microbiens (par les exotoxines, les endotoxines des microbes, l'effet cytopathogène des virus); les réactions immunologiques (les maladies auto-immunes) (**Osadebe et al., 2003**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent un groupe hétérogène de substances qui permettent de réduire ou de supprimer les conséquences de la réaction inflammatoire, sans préjuger de l'étiologie, ni du mécanisme de celle-ci. Ils agissent en inhibant plus ou moins sélectivement les iso-enzymes de la cyclooxygénase (COX). Très largement utilisées en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgiques, antipyrétiques et pour certaines inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, ces molécules sont malheureusement à l'origine d'effets indésirables graves qui dépendent, ou non, de leur mécanisme d'action (**Tréchet et Jouzeau, 2014**).

Les glucocorticoïdes sont largement utilisés pour supprimer l'inflammation dans les maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes, qui sont toutes associées à une expression accrue des gènes inflammatoires (**Barnes, 1998**).

Ces deux types d'anti-inflammatoires conventionnelles, habituellement utilisés pour soulager les maladies inflammatoires, nécessitent un traitement à long terme et leur utilisation est souvent associée à de graves effets secondaires. Cela a conduit à la recherche de traitements d'alternatives. À cet égard, les métabolites secondaires de diverses plantes médicinales tels que les polyphénols se sont avérées être efficaces dans le traitement de l'inflammation (**Santangelo et al., 2007**). Ils agissent par régulation de l'activité cellulaire dans les cellules inflammatoires et en modulant les activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique (phospholipase A2, cyclooxygénase (COX)), lipoxygénase (LOX),

métabolisme de l'arginine (NOS), modulant la sécrétion d'autres molécules pro-inflammatoires (**Hussain et al., 2016**).

Il est à noter que les métabolites secondaires, comme les flavonoïdes possèdent également des activités biologiques très intéressantes, ce sont de puissants inhibiteurs de la tyrosinase (**Loizzo et al., 2012**). La tyrosinase (EC 1.14.18.1) est une enzyme ubiquitaire présente dans presque toutes les cellules. Elle catalyse deux réactions différentes. La monophénolase est responsable de l'orthohydroxylation des monophénols (comme la tyrosine) en o-diphénols (comme la L-DOPA, la 3-(3,4-dihydroxyphényl)-L-alanine); tandis que la diphénolase catalyse l'oxydation des o-diphénols (comme la L-DOPA) en o-quinones (comme la dopaquinone) (**Sanchez-Ferrer et al., 1995**). La dopaquinone peut être facilement convertie en dopachrome, un pigment orange à rouge. Un brunissement enzymatique défavorable des aliments d'origine végétale par la tyrosinase peut entraîner une diminution de la qualité nutritionnelle et la formation de composés toxiques (**Loizzo et al., 2012**).

La tyrosinase joue également un rôle critique dans la biosynthèse de la mélanine dans les mélanocytes et est considérée comme l'enzyme clé dans la coloration de la peau, des cheveux et des yeux (**Rescigno et al., 2002**). Dans l'agroalimentaire, la tyrosinase est connue comme l'enzyme responsable du changement de la couleur des fruits et de certains végétaux (brunissement). Ce phénomène est dû à l'oxydation de composés diphénoliques en quinone (**Lee, 2002**). L'inhibition de la tyrosinase est donc l'une des principales stratégies utilisées par l'industrie cosmétique pour obtenir des effets de blanchiment de la peau et de dépigmentation après un coup de soleil (**Kim et al., 2005**). Les molécules décrites comme inhibiteurs de la tyrosinase peuvent agir par différents mécanismes. Elles peuvent interférer avec la transcription de son gène, sa glycosylation, réduire le contrôle post-transcriptionnel, ou inhiber son activité par différentes modalités. Les molécules capables d'inhiber la tyrosinase sont de nature chimique très diverse. L'acide kojique est l'inhibiteur de tyrosinase le plus étudié, largement utilisé comme agent de blanchiment cosmétique et comme additif alimentaire pour prévenir la décoloration. Il représente un effet inhibiteur compétitif sur l'activité de la monophénolase et un effet inhibiteur mixte sur l'activité de la diphénolase de la tyrosinase des champignons (**Chang, 2009**) alors que pour les flavonoïdes, le mécanisme d'inhibition des bloqueurs de flavonol est principalement l'inhibition compétitive de la chélation de la monophénolase et du cuivre (**Chang, 2009**).

L'analyse phytochimique des différentes parties de la plante *P. atlantica* ont fait l'objet de quelques études. Les extraits des feuilles et des racines comportent des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins (**Bozorgi et al., 2013; Ben Ahmed et al., 2017; Toul et al.,**

2017). Des études sur les fruits de cette plante ont montré la présence des phénols simples tels que l'acide gallique et l'acide ρ -coumarique (Benhammou et al., 2008), d'acides gras, de stéroïdes, d'acides phénoliques, des flavonoïdes et des flavones (Kawashty et al., 2000 ; Benhassaini et al., 2007 ; Yousfi et al., 2009) et des gallotanins (Wei et al., 2002 ; Zhao et al., 2005). L'étude sur l'huile fixe des fruits de *P. atlantica* était caractérisée par sa richesse en triterpénoides, en 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). Toul et al., (2016) a rapporté que les extraits bruts des bourgeons contiennent plusieurs composés phénoliques tel que l'acide ferulique et l'acide ascorbique.

Ces différentes études phytochimiques prouvent que les extraits des espèces de *Pistacia* et leurs métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques, dont des activités antioxydantes, antimicrobiennes (Benhammou et al., 2008 ; Achili et al., 2020; Ben Ahmed et al., 2022), antitumorales (Hashemi et al., 2017), néphroprotectrices et anti-inflammatoires (Heidarian et al., 2017).

Jusqu'à nos jours, les scientifiques ne cessent de valoriser ce fameux arbre. Plusieurs travaux antérieurs de notre équipe au cours de dix années de recherche sur *P. atlantica* ont révélé que cette espèce est une source de composés phénoliques et que leurs teneurs varient selon les parties de la plante étudiées, Cependant peu d'études ont été réalisées sur la partie bourgeon de cette plante.

Pour cela, cette étude a été entreprise afin d'évaluer:

1- La variation de la teneur et de la nature des composés phénoliques dans les extraits de *P. atlantica*, en fonction de différents critères à savoir :

- Le genre (pied mâle et pied femelle).
- Le type d'organes (racine, bourgeon et fruit),
- La situation géographique (plusieurs stations ont été étudiées : Oudjlida, Safsaf, Ain-Fezza).
- Le stade de maturation des fruits (différents stades ont été pris en considération à savoir : le fruit immature, fruits rouge, fruit mûr).

2- L'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-tyrosinase *in vitro* ainsi que l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits.

DEUXIEME PARTIE

Matériel et méthodes

I. Préparation des extraits et dosages des composés phénoliques

1. Collecte du matériel végétal

Le matériel végétal (racines, bourgeons foliaires et fruits) a été récolté à partir de trois localités dans la wilaya de Tlemcen (Nord-ouest de l'Algérie) durant l'été 2016 (**Figure 1**).

L'espèce végétale récoltée a été identifiée par le Professeur EL ZEREY BELASKRI A. Université d'Oran (Algérie). Un spécimen d'herbier (No. 1784) a été préparé et déposé dans le Laboratoire des Produits Naturels du Département de Biologie, Université de Tlemcen (Algérie).

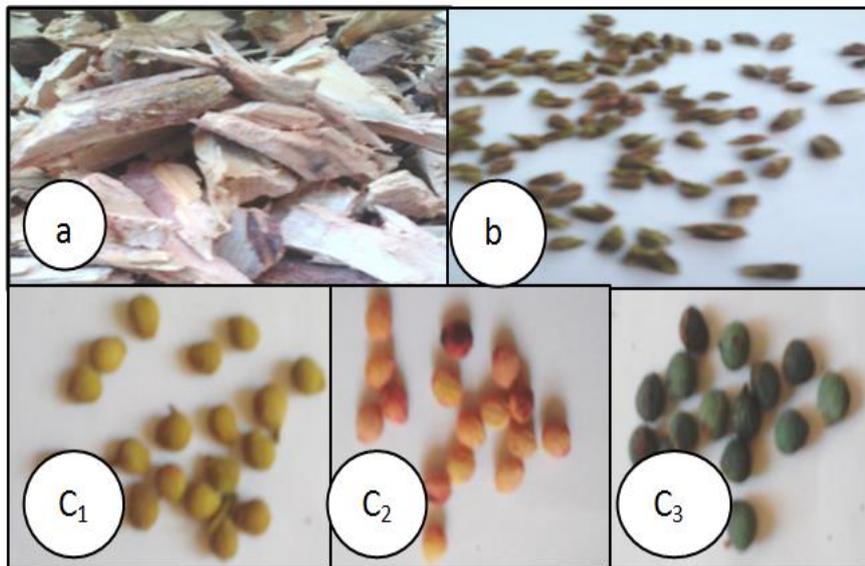


Figure 1. Photo du matériel végétal.

a : Racines, **b** : Bourgeons, **C₁** : fruits immatures, **C₂** : fruits rouges, **C₃** : fruits mûrs.

2. Situation géographique de la station d'échantillonnage

Les caractéristiques géographiques de la station d'étude de l'échantillonnage sont représentées dans le **tableau 1** et la **figure 2**.

Tableau 1. Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques du Matériel étudié

Station	Le sexe	Parties étudiées	Période de récolte	Site de récolte	Etage bioclimatique
Oudjlida (Tlemcen)	-Individu Mâle	Racine-bourgeon foliaire.	Juin Pour les fruits (Juin-juillet-Août)	Latitude: 34°55' 06.6" N Longitude : 1°20' 10.8"W Altitude: 500 m	Semi-aride tempéré
	Individu femelle	Racine-bourgeon foliaire-Fruit			
Safsaf (Tlemcen)	Individu Mâle	Racine-bourgeon foliaire.	Juin Pour les fruits (Juin-juillet-Août)	Latitude: 34°53' 59" N Longitude: 1°16' 33" W Altitude: 616 m	Semi-aride tempéré
	Individu femelle	Racine-bourgeon foliaire-Fruit			
Ain-Fezza (Tlemcen)	Individu Mâle	Racine-bourgeon foliaire.	Juin Pour les fruits (Juin-juillet-Août)	Latitude: 34°52' 45" N Longitude: 1°14' 18" W Altitude: 730 m	Semi-aride tempéré
	Individu femelle	Racine-bourgeon foliaire-Fruit			



Figure 2. Situation géographique des stations de collecte (Encarta, 2007).

3. Préparation des extraits hydro-méthanoliques

Les parties végétales ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant plusieurs jours. Après séchage, les racines, les bourgeons et les fruits sont broyés en poudre fine puis conservées pour des utilisations ultérieures.

Deux grammes de l'échantillon est mis en suspension dans 60 mL de mélange méthanol/eau (70/30 ; v/v), pendant 24 h, à température ambiante. Après filtration, le filtrat est évaporé, sous vide, à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif de type (HAHNVAPOR HS-2005V).

Le résidu sec est ensuite dissous dans 3 mL de méthanol (**Benhammou et al., 2009**).

4. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)** en utilisant le réactif du Folin–Ciocalteu. Un volume de 200 µL de chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 mL de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 mL de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min. L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux sont exprimées en milligramme (mg) équivalents d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS). Chaque échantillon est répété trois fois.

5. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Une quantité de 500 µL de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique dilués est ajoutée à 1500 µL de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µL de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µL de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µL d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des plantes médicinales est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g MS). Chaque échantillon est répété trois fois.

6. Dosage des tanins condensés

Les quantités des tanins condensés sont estimées en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50 μL de l'extrait est ajouté à 1500 μL de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) et puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 μL de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionné et laissé réagir à la température ambiante pendant 20 min. L'absorbance à 550 nm est mesurée contre un blanc. La concentration des tanins est estimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g à partir de la courbe d'étalonnage.

II. Evaluation du pouvoir antioxydant

Dans notre étude, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été réalisée par 2 tests à savoir : la capacité antioxydante totale (CAT) et le piégeage du radical libre DPPH'.

1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) aussi appelée la méthode de phosphomolybdate repose sur la réduction de Mo (VI) à Mo (V) par les composés antioxydants et la formation d'un complexe vert phosphate/Mo (V) à pH acide.

Un volume de 0.3 mL de chaque extrait est mélangé avec 3 mL de solution du réactif (acide sulfurique 0.6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4mM). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 mL de la solution du réactif et 0.3 mL du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon (**Prieto et al., 1999**).

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). Les expériences sont répétées 3 fois.

2. Piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH')

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH'). Ce dernier est un radical stable de couleur violacée qui absorbe dans le visible à une longueur d'onde de 515 à 520 nm (**Gazi et al., 2004**). Le DPPH' est décoloré en jaune lorsque l'électron célibataire s'apparie ; il est réduit à la forme d'hydrazine en acceptant un atome d'hydrogène (**Sanchez-Moreno, 2002**). Cette décoloration

est représentative de la capacité de l'extrait à piéger ce radical libre indépendamment de toutes activités enzymatiques (Djeridane et al., 2006).

L'effet des différents extraits de *P.atlantica* sur le DPPH^{*} est mesuré par la technique décrite par (Sanchez-Moreno et al., 1998). Un volume de 50 µL de différentes concentrations de chaque extrait (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL) est ajouté à 1.950 mL de la solution méthanolique du DPPH^{*} (0.025 g/l) fraîchement préparée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 50 µL du méthanol avec 1.950 mL d'une solution méthanolique du DPPH^{*} à la même concentration utilisée.

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

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

A_c : absorbance du contrôle négatif ; A_E : absorbance de l'échantillon.

La variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'extrait nous permet de calculer la concentration efficace (Inhibitory Concentration value : CI₅₀), qui est définie comme la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH^{*} à 50 %.

III. Etude *in vitro* de l'activité antimicrobienne

1. Provenance des germes utilisés

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur sept souches pathogènes. Les références de différentes souches utilisées sont représentées dans le **Tableau2**.

Tableau 2. Origines des souches utilisées pour l'étude du pouvoir antimicrobien.

<u>Microorganismes</u>		<u>Gram</u>	<u>Code</u>	<u>Origine</u>
Bacteries	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 8739	MNHN
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ATCC 27853	MNHN
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg	MNHN
	<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC 25921	LAPRONA
	<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 6538	MNHN
	<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC 19111	LAPRONA
Levure	<i>Candida albicans</i>		CIP 444	LABSAB

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

2. Mise en culture des souches

Les souches conservées sur gélose nutritive, sont revivifiées dans un bouillon nutritif à 37°C pour les bactéries et 30°C pour la levure pendant 24 à 48h puisensemencées sur boîte contenant des milieux afin de vérifier leur pureté. Après 24h d'incubation pour les bactéries, et les 48h pour la levure, un inoculum est préparées par ensemencement des souches sur des bouillons différents (Muller-Hilton pendant 24h pour les bactéries, et Sabouraud pendant 48h pour la levure) et cela pour obtenir une turbidité ajustée avec un spectrophotomètre à une densité optique entre 0.08 à 0.1 pour une longueur d'onde λ de 625 nm (NCCLS, 2001 ; Normes CLSI, 2006).

3. Méthode de diffusion sur disque

Afin de tester l'activité antimicrobienne des extraits, nous avons utilisé la méthode de diffusion à partir de disque imprégnés (NCCLS, 2001).

La technique de diffusion en milieu gélosé par contact direct, représente une appréciation qualitative de l'activité antimicrobienne qui peut être utilisée en étape préliminaire à des

études plus approfondies. L'aspect quantitatif sera ensuite estimé par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Normes CLSI, 2006**).

Le test consiste à l'ensemencement en surface en nappe de milieu gélosé (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure) en boîtes de Petrie par la suspension de microorganismes à tester (10^8 UFC/mL pour les bactéries et 10^6 UFC/mL pour la levure). Les disques de papier filtre Wattman de 6 mm de diamètre imprégnés de solutions d'extrait de plante à différentes concentrations sont déposés à la surface de la gélose (**Figure 3**). Les boîtes sont laissées 1 heure à $+4^\circ\text{C}$ puis retournées et incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C pour les bactéries et 30°C pendant 24 à 48 heures pour la levure. La croissance des germes se traduit par des colonies visibles à l'œil nu ou par un halo clair autour du disque. Le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm en incluant le disque.

En parallèle, les mêmes souches sont testées vis-à-vis l'ampicilline ($10\ \mu\text{g}/\text{disc}$) et la nystatine ($100\ \mu\text{g}/\text{disque}$) comme des contrôles positifs et le DMSO ($20\ \mu\text{L}/\text{disque}$) comme des contrôles négatifs (**Benmahieddine et al., 2021**)

4. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide/Fongicide (CMB)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait de la plante capable d'inhiber toute croissance microbienne (**Andrews, 2001**). Cela veut dire, qu'elle correspond à la concentration provoquant l'inhibition de la croissance d'une population bactérienne après 24 heures d'incubation. Cette technique mesure, un effet bactériostatique. Pour cela une gamme de concentrations (une dilution double (à un demi)) de chaque extrait sont mises en culture avec une suspension de bactéries ou de levures. La CMI et la CMB (CMF pour la levure) des différents extraits ont été déterminées par une méthode de microdilution en bouillon (**CLSI, 2016**). La technique nécessite la préparation d'une gamme de dilution en utilisant une plaque de microtitration à 96 puits (**Figure 3**). Les cultures de chaque souche sont préparées pendant 24h et les suspensions de micro-organismes sont ajustées dans un spectrophotomètre pour avoir une densité d'organismes finale de 10^6 UFC/ mL pour les bactéries et 10^4 UFC/ml pour les levures. Une dilution double (à un demi) a été réalisée dans la microplaque de 96 puits ($100\ \mu\text{L}/\text{puits}$) pour obtenir des dilutions d'extrait brut avec des concentrations allant de $0.009\ \text{mg}/\text{mL}$ à $5\ \text{mg}/\text{mL}$ ($5000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ à $9\ \mu\text{g}/\text{mL}$). De l'eau distillée stérile a été utilisée pour dissoudre les extraits de plantes. Le même volume de l'inoculum microbien des souches testées provenant d'une culture de bouillon pendant une nuit est ajouté dans les puits 3-12 pour donner une concentration finale de 5×10^5 UFC/ mL

dans chaque puits. Les deux premiers puits représentent les témoins : le premier contient le milieu de culture et l'inoculum (sans extrait) donc c'est le témoin de croissance positif, et le deuxième puits contient seulement l'extrait (sans micro-organismes) ce qui représente le témoin de croissance négatif. Après incubation, pendant 18-24 h à 37 °C (24-48 h pour *Candida*), la turbidité indiquait la croissance des micro-organismes.

La CMI est la plus faible concentration d'extrait de plante qui inhibe complètement la croissance visible du micro-organisme. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque dosage et les valeurs de CMI ont été exprimées en mg/ mL.

Une forte activité a été définie comme une CMI <5 mg/ mL. La CMI a été mesurée par une sous-culture de 10 µL de chaque puits sur une gélose Mueller Hilton (MHA) pour les bactéries ou Sabouraud Dextrose Agar pour *C. albicans*, après incubation à 37° C pendant 24 h (24-48 h pour la levure). Chaque test est répété trois fois (**Benmahieddine et al., 2021**).

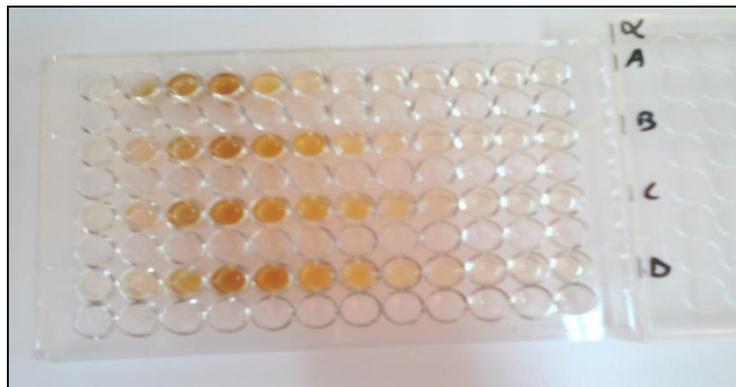


Figure 3. Microplaque à 96 puits utilisée dans la détermination de la CMI.

IV. Etude *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire

Afin de mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'extrait des bourgeons, un modèle d'inflammation aigüe a été sélectionné : test d'œdème inflammatoire de la patte chez la souris, induit par la carragénine, selon la méthode décrite par **Winter et al. (1962)**. Cette étude est basée sur la comparaison de la réduction de l'œdème plantaire après administration du produit de référence et du produit anti-inflammatoire à tester.

1. Matériel biologique

Pour l'expérience, des souris mâles de type albinos (NMRI) ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces animaux sont hébergés au niveau de l'animalerie de l'université de Mostaganem sous des conditions standard (température de $(20 \pm 2)^\circ \text{C}$; humidité relative de (60% à 70%) et une photopériode de 12 heures/ 12 heures). Après une période d'adaptation, les souris sont pesées, marquées et soumises à jeûne, une nuit avant l'expérimentation.

2. Matériel végétal

D'après les résultats des analyses phytochimiques et des activités biologiques testées, l'extrait des bourgeons a montré une meilleure activité antimicrobienne et un pouvoir antioxydant puissant par rapport aux autres extraits étudiés. Pour cela, cet extrait a été sélectionné pour évaluer son activité anti-inflammatoire *in vivo*.

3. Etude toxicologique

Il est indispensable d'étudier la toxicité des extraits testés avant d'entamer les activités biologiques *in vivo*. La toxicité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité chronique après administration répétée de la substance.

Le test de toxicité aiguë de l'extrait est évalué selon les directives de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (**OCDE-425, 2008**). Ce test consiste à administrer les doses expérimentales aux animaux en observant toute manifestation de toxicité tel que : l'augmentation dans l'activité (agitation), salivation, convulsion coma et mort. Ces observations sont faites régulièrement pendant 24 à 48h heures (**Paschapur et al., 2009**).

Le test est réalisé sur un effectif de 12 souris pesant 25 ± 5 g réparties en trois lots. Ces souris sont privées de nourriture et d'eau 12 heures avant la période d'expérimentation. Chaque lot reçoit par voie orale la solution à tester aux 3 doses utilisées ultérieurement dans l'essai anti-inflammatoire (150, 200 et 300 mg/Kg).

4. Prétraitement par les extraits

Une heure avant l'injection de la carragénine, un effectif de 30 souris pesant 25 ± 5 g est divisé selon l'extrait en cinq groupes, chaque groupe reçoit par voie orale les solutions expérimentales comme suit:

- **Groupe A (témoin)** (n=6) : une solution de NaCl (0.9%).

- **Groupe B (standard)** (n=6) : l'anti-inflammatoire de référence : diclofénac (50 mg/Kg) dissous dans du NaCl 0.9%.
- **Groupe C** (n=6) : l'extrait des bourgeons à la dose de 150 mg/Kg dissous dans du NaCl 0.9%.
- **Groupe D** (n=6) : l'extrait des bourgeons à la dose de 200 mg/Kg dissous dans du NaCl 0.9%.
- **Groupe E** (n=6) : l'extrait des bourgeons à la dose de 300 mg/Kg dissous dans du NaCl 0.9%.

5. Induction de l'inflammation

Une heure après l'administration des traitements, chaque animal reçoit par injection sub-plantaire dans la patte arrière droite, 0.1 ml d'une suspension de carragénine à 0.5% dissous dans du NaCl 0.9%.

6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

6.1. Mesure de l'œdème

Le diamètre de la patte a été mesuré, à l'aide d'un pied de coulisse digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant six heures. L'évolution de l'œdème de la patte a été déterminée chaque heure jusqu'à 6 heures.



Figure 4. Mesure de l'œdème de la patte de souris par le pied de coulisse digital.

6.2. Calcul du pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (Ndiaye et al., 2006) :

$$\% \text{ AUG} = (D_n - D_0) \times 100 / D_0$$

Où : D_n : diamètre de la patte la 1^{ère} heure après l'injection de la carragénine ; D_0 : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

6.3. Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante selon **Ndiaye et al. (2006)**.

$$\% \text{ INH} = (\% \text{ AUG}_{\text{témoin}} - \% \text{ AUG}_{\text{traité}}) \times 100 / \% \text{ AUG}_{\text{témoin}}$$

6.4. Etude histologique

A la fin des expérimentations, les souris sont anesthésiées au chloroforme, et les pattes sont prélevées afin de réaliser l'étude histologique, au niveau du service d'Anatomie-Pathologie du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.

Cette étude histologique est réalisée selon le protocole suivant :

6.4.1. Fixation

Après prélèvement, les pattes des souris sont fixées dans le formol (10%) afin de prévenir l'autolyse cellulaire et la putréfaction bactérienne.

6.4.2. Décalcification

Le tissu osseux contenu dans les pattes nécessite un traitement à l'aide d'agents chimiques permettant de chélater le calcium. Pour cela les pattes sont décalcifiées dans l'acide nitrique (2%). Elles sont ensuite découpées et placées dans des cassettes étiquetées, puis remises une nuit dans le formol.

6.4.3. Déshydratation

Les cassettes sont passées dans 3 bains d'alcool, 2 bains d'acétone, puis 3 bains de xylène pour éliminer le fixateur et l'eau contenue dans les échantillons et le remplacer par la paraffine. Les cassettes sont ensuite mises dans la paraffine et placées dans l'étuve à 70 °C pendant 2h. La chaleur provoque l'évaporation du solvant et sa dissolution dans la paraffine.

6.4.4. Inclusion

Cette étape consiste à infiltrer et à enrober les tissus de l'échantillon avec de la paraffine pour donner une consistance solide aux tissus affaibli. Ainsi, les échantillons peuvent être découpés en fines coupes.

A l'aide d'un appareil d'inclusion (l'Histocentre 2 ; Thermo Shandon) les échantillons sont réduits en blocs de paraffine, qui seront ensuite placés au réfrigérateur pendant 24h.

6.4.5. Préparation de la coupe (microtomie)

Les blocs contenant les échantillons sont réduits en de fines couches (de 3-4 μm). A l'aide d'un microtome (**Figure 5**), qui fait avancer le bloc sur un rasoir. L'ensemble des tranches vont former un ruban avec des coupes sériées de prélèvement tissulaire. Ces rubans sont étalés sur des lames, sur une plaque chauffante pour faire fondre la paraffine. Les lames sont ensuite séchées à l'étuve puis déparaffinées directement dans le xylène.



Figure 5. Réalisation des coupes de prélèvement tissulaire à l'aide d'un microtome

6.4.6. Réhydratation et coloration

Les lames préparées sont plongées dans une série de bains afin de procéder à la coloration hématoxyline/éosine : 2 bacs de xylène, 3 bacs d'alcool, 2 bacs d'eau, 1 bac d'hématoxyline d'Harris, 2 bacs d'eau, 1 bac d'HCl, 1 bac d'eau, 1 bac d'ammoniac, 1 bac d'éosine et enfin

rinçage dans 3 bacs d'alcool et 2 bacs de xylène. L'hématéine est une substance qui colore les noyaux en bleu violet, en se fixant sur les acides nucléiques. L'éosine est une substance qui colore plutôt les cytoplasmes en rose en se fixant sur les protéines.

6.4.7. Montage des lames

Des lamelles de verre sont collées par-dessus les lames contenant l'échantillon, grâce à un produit de montage (EUKITT), afin de préserver les préparations et la coloration. Les lames ainsi montées sont prêtes pour l'observation microscopique, comme elles peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines d'années.

V. Etude de l'activité anti-tyrosinase

L'activité inhibitrice de l'enzyme tyrosinase a été mesurée par la méthode spectrophotométrique décrite par **Chan et al. (2008)**.

Les extraits ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration initiale de 3 mg/mL, puis dilués dans une solution tampon phosphate (pH 6.8, 0.05 M). Quatre cents microlitres de chaque échantillon ont été mélangés avec 400 µL de L-tyrosine (0.5 mg/mL, utilisé comme substrat). On ajoute ensuite 0.1mg/ml de la solution de tyrosinase avec 200 µL de tampon phosphate et on incube la solution pendant 30 min à 37 °C. L'absorbance est lue à 475 nm et le pourcentage d'inhibition enzymatique est calculé par rapport au témoin. Le tampon phosphate (témoin négatif) et la quercétine (témoin positif) ont été testés dans les mêmes conditions.

$$\% \text{ Pourcentage d'inhibition de la Tyrosinase} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{extrait}}) / A_{\text{control}}) \times 100\%$$

Où : A_{control} : Correspond à l'absorbance du control négatif ; A_{extrait} : représente l'absorbance de l'extrait ou le control positif (quercétine).

VI. Analyse chromatographique

Dans notre étude, la technique d'analyse choisie est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Ces analyses sont réalisées à l'université de Rome Tor Vergata, Département de biologie, Via della Ricerca Scientifica 1 (Italie) (**Gismondi et al., 2018**).

La quantification de chaque molécule est réalisée par comparaison directe avec différentes concentrations d'étalon pur relatives (Sigma-Aldrich), sur la base du temps de rétention, du spectre d'absorbance (à 280 ou 340 nm) et de la surface du pic chromatographique.

L'analyse est réalisée en utilisant une colonne Phenomenex Luna 3u C18 (2) (3 μ m x 4.6 mm x 150 mm), de l'acide formique 1% (phase A) et du méthanol (phase B) comme solvants et un gradient d'élution fixé comme indiqué: t0 min (A 85%, B 15%); t20 min (A 65%, B 35%); t55 min (A 10%, B 90%); t68 min (A 85%, B 15%); t70 min (fin d'analyse). La concentration de chaque métabolite a été exprimée en milligrammes d'équivalent métabolite par gramme de matière sèche (mg EM/ g MS).

VII. Analyse statistique

Toutes les expériences sont effectuées en trois exemplaires et les résultats sont exprimés par une moyenne \pm l'écart type. Les données sont analysées à l'aide du logiciel SPSS Statistique 17.0 avec le test t de Student, tandis que l'analyse ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey est utilisée pour comparer plus de deux groupes.

TROISIÈME PARTIE
Résultats et interprétations

1. Détermination des teneurs en composés phénoliques

Les analyses quantitatives des teneurs en composés phénoliques sont déterminées selon des courbes d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalents d'acide gallique pour les phénols totaux et en mg équivalents de catéchine pour les flavonoïdes et les tanins condensés par g de la matière sèche (**Annexe 4**).

Les teneurs en phénols totaux (TPT), en flavonoïdes totaux (TF) et en tanins condensés (TTC) des différentes parties de *P. atlantica* sont indiquées dans le **Tableau 3**. La TPT variait de 7.435 ± 0.193 à 565.740 ± 9.840 mg EAG/ g MS. La concentration phénolique la plus élevée a été observée dans les bourgeons foliaires (565.740 ± 9.840 mg EAG/ g MS), suivis des fruits (61.140 ± 10.377 mg EAG/ g MS), tandis que la concentration la plus faible a été enregistrée dans les racines (7.435 ± 0.193 mg EAG/ g MS). Nos résultats montrent également une différence significative ($p < 0.001$) entre les fruits de toutes les stations, indiquant que les fruits rouges détiennent généralement la TPT la plus élevée par rapport aux autres stades de maturation. Par conséquent, une variabilité significative entre les sexes (individu mâle et individu femelle) ($p < 0.001$) peut être documentée.

Les concentrations en TF et en TTC variaient de 0.384 ± 0.038 à 1.921 ± 0.111 mg EC/ g MS et 0.375 ± 0.033 à 16.537 ± 0.937 mg EC/ g MS, respectivement. Les extraits de bourgeons présentaient le niveau le plus élevé de flavonoïdes totaux et de tanins condensés (1.92 ± 0.111 mg EC/ g MS et 16.537 ± 0.937 mg EC/ g MS), dans cet ordre, suivis des racines et des fruits.

2. Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *P. atlantica*

Les résultats du test DPPH ont montré que les extraits obtenus à partir des différentes parties de la plante présentent une différence significative ($p < 0.001$) dans leur activité antiradicalaire, comme le montre le **Tableau 4**. Les valeurs CI_{50} variaient de 0.038 ± 0.001 à 1.331 ± 0.114 mg/ mL. Généralement, les extraits de bourgeon foliaire ont la capacité antioxydante la plus élevée, par rapport aux autres extraits. En détail, les arbres femelles ont montré une propriété d'élimination des radicaux libres plus forte que les arbres mâles. Concernant l'extrait de racine, les résultats varient selon les stations et entre les sexes au sein de la même station ($p < 0.01$). Ensuite, pour toutes les stations, nous observons une forte activité pour les fruits immatures (Fim), par rapport aux fruits rouges (Fr) et mûrs (Fm). Concernant la CAT, les extraits de racines, de bourgeons et de fruits différaient considérablement dans leurs activités (**Tableau 4**). Parmi tous les échantillons de la plante, les extraits de bourgeons foliaires possédaient l'activité la plus élevée (43.644 ± 2.579 mg EAA/

g MS), en particulier dans la station Saf-saf par rapport aux autres stations. Pour les fruits, dans ce test, nous pouvons rapporter la même tendance observée dans l'analyse DPPH.

Résultats et Interprétations

Tableau 3. Teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés dans les extraits étudiés.

Partie de la plante	Extrait	Phénols totaux (mg EAG/g MS)			Flavonoïdes totaux (mg EC/g MS)			Tanins condensés (mg EC/g MS)			
		Oudjlida	Saf-saf	Ain-Fezza	Oudjlida	Saf-saf	Ain-Fezza	Oudjlida	Saf-saf	Ain-Fezza	
Racines	PM1	ND	10.481±1.392***	7.435±0.193***	ND	0.504±0.044***	0.445±0.017***	ND	0.796±0.035**	2.462±0.169***	
	PM2	11.200±0.830***	26.650±3.327***	12.694±0.30***	0.730±0.03*	0.877±0.031***	0.614±0.017***	2.558±0.071***	5.239±0.231	4.317±1.842	
	PF1	19.847±1.220	58.041±4.640	52.101±0.630***	0.758±0.028*	1.387±0.053	1.120±0.016	5.800±0.384**	7.556±1.527	15.016±0.801***	
	PF2	26.649±0.429	ND	13.443±0.683	0.818±0.023	ND	0.826±0.007	7.255±0.533	ND	4.157±0.303	
Bourgeons foliaire	PM1	544.821±59.949***	448.113±13.862**	281.578±13.915***	1.351±0.036*	1,411±0,061**	1.126±0.034***	8.430±0.267*	15.237±1.139	14.445±1.801***	
	PM2	283.964±3.872***	565.740±9.840	247.290±26.526***	1.466±0.033**	1.921±0.111	0.796±0.011**	12.921±0.942	14.815±0.841	3.779±0.466	
	PF1	130.932±18.279	537.551±16.925	502.126±12.788	0.710±0.012	1.781±0.103**	0.927±0.053	9.749±0.595	16.537±0.937	4.395±0.010	
	PF2	149.485±5.203	ND	ND	1.181±0.017	ND	ND	11.586±2.231	ND	ND	
Fruits	PF1	Fim	10.113±0.936	23.767±3.213**	20.358±7.777*	0.770±0.053**	0.780±0.028***	0.384±0.038***	1.284±0.114**	0.890±0.244*	1.242±0.082**
		Fr	35.852±0.998	23.120±0.859**	22.453±0.386	0.802±0.09**	0.583±0.021	0.558±0.015**	0.807±0.163	0.806±0.108	0.579±0.163
		Fm	29.548±1.011	12.013±2.175	20.034±1.235	0.828±0.053*	0.534±0.035	0.483±0.06*	0.899±0.183	0.375±0.033	0.246±0.090***
	PF2	Fim	22.983±5.596	ND	ND	0.512±0.042	ND	ND	0.650±0.081	ND	ND
		Fr	61.140±10.377**	ND	37.841±0.663***	0.701±0.05	ND	0.644±0.02***	0.493±0.022	ND	1.366±0.607
		Fm	29.158±2.369***	ND	20.589±2.397	0.867±0.137	ND	0.839±0.036	0.738±0.054	ND	1.515±0.000

Les valeurs sont la moyenne des trois répétitions ± SD (écart-type); MS : matière sèche ; EAG : équivalents d'acide gallique ; EC : équivalents de catéchine ; PM : arbre mâle ; PF : arbre femelle ; Fim : fruits immatures ; Fr. : fruits rouges ; Fm : fruits mûrs. ND : pas d'arbre dans cette station. (* p < 0.05 ; **p < 0.01 ; *** p < 0.001) : échantillon d'arbre mâle vs échantillon d'arbre femelle ; échantillons de fruits immatures vs échantillons de fruits rouges et mûrs pour chaque station).

Tableau 4. Teneurs en capacité antioxydante totale et CI50 du test du DPPH dans les extraits de *P. atlantica*

Organes	Extrait	DPPH (CI ₅₀ mg/mL)			CAT (mg EAA/g MS)			
		Oudjlida	Saf-saf	Ain-Fezza	Oudjlida	Saf-saf	Ain-Fezza	
Racines	PM1	ND	0.729±0.022**	0.384±0.017**	ND	6.469±0.678***	6.203±0.579***	
	PM2	0.625±0.006**	0.679±0.023*	1.331±0.114**	3.751±0.391**	11.247±1.426	5.874±0.272	
	PF1	0.665±0.021	0.456±0.024	0.324±0.010	6.460±0.644	24.140±2.121	16.827±1.74***	
	PF2	0.540±0.004	ND	0.948±0.028	9.689±1.095	ND	6.111±0.576	
Bourgeons foliaires	PM1	0.307±0.017*	0.358±0.003	0.237±0.004*	29.522±2.265***	35.687±1.562*	16.398±0.182**	
	PM2	0.226±0.000*	0.333±0.028	0.242±0.018	27.559±2.394	37.304±2.765*	21.494±3.688*	
	PF1	0.195±0.005	0.343±0.007	0.184±0.010	9.852±0.145	43.644±2.579	33.748±4.474	
	PF2	0.287±0.002	ND	ND	17.266±1.387	ND	ND	
Fruits	PF1	Fim	0.161±0.004***	0.176±0.001**	0.364±0.001***	15.902±0.368***	12.502±0.177***	10.025±0.249***
		Fr	0.038±0.000	0.299±0.010	0.236±0.004	5.794±0.182	3.889±0.125	4.418±0.133
		Fm	0.225±0.003	0.225±0.004	0.291±0.008	3.579±0.227	1.581±0.062	3.898±0.155
	PF2	Fim	0.146±0.001**	ND	ND	9.892±0.385*	ND	ND
		Fr	0.175±0.000	ND	0.235±0.003***	4.197±0.163	ND	3.851±0.339
		Fm	0.246±0.003	ND	0.671±0.003	3.413±0.178	ND	2.381±0.475

Les valeurs sont la moyenne des trois répétitions ± SD (écart-type); MS : matière sèche ; EAG : équivalents d'acide gallique ; EC : équivalents de catéchine ; PM : arbre mâle ; PF : arbre femelle ; Fim : fruits immatures ; Fr : fruits rouges ; Fm : fruits mûrs. ND : pas d'arbre dans cette station. (* p < 0.05 ; **p < 0.01 ; *** p < 0.001) : échantillon d'arbre mâle vs échantillon d'arbre femelle ; échantillons de fruits immatures vs échantillons de fruits rouges et mûrs pour chaque station).

En utilisant le coefficient de corrélation de Pearson, il a été possible d'estimer les relations entre les différentes activités antioxydantes des extraits et leurs teneurs en composés phénoliques (**Figures 6, 7, 8**) (**Annexe 6A, 6B, 6C**). Les résultats ont révélé des corrélations significatives entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des extraits de racine et leurs capacités antioxydantes totales (r > 65%) et le test du DPPH (r = -0.44).

Une corrélation significative entre les teneurs en flavonoïdes des extraits de bourgeons et leurs activités antioxydantes (test CAT : r > 74%) et (test du DPPH : r > 59%).

En ce qui concerne les fruits, les résultats ont montré des corrélations positives entre les teneurs en flavonoïdes et la capacité antioxydante totale pour les fruits immatures et les fruits rouges (r>75%) et des corrélations négatives avec le test du piégeage DPPH (r = -66%). En revanche, des corrélations significatives ont été démontrées entre les composés phénoliques

totaux des extraits de fruits mûrs et leur capacité antioxydante totale ($r > 79\%$) et entre les tests de tanin condensé et le test DPPH ($r = 79\%$).

Résultats et Interprétations

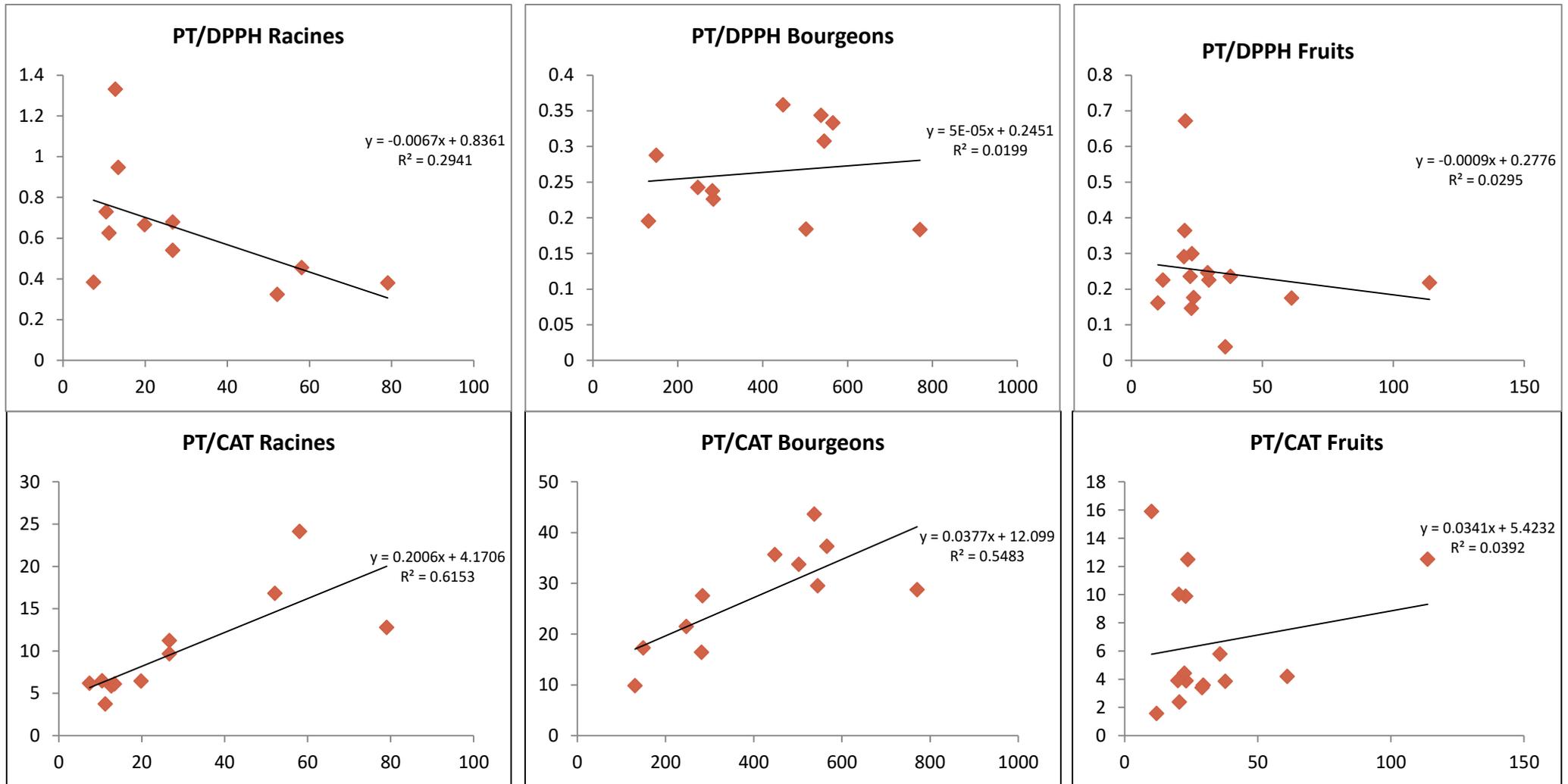


Figure 6. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en phénols totaux (PT) des organes étudiés.

Résultats et Interprétations

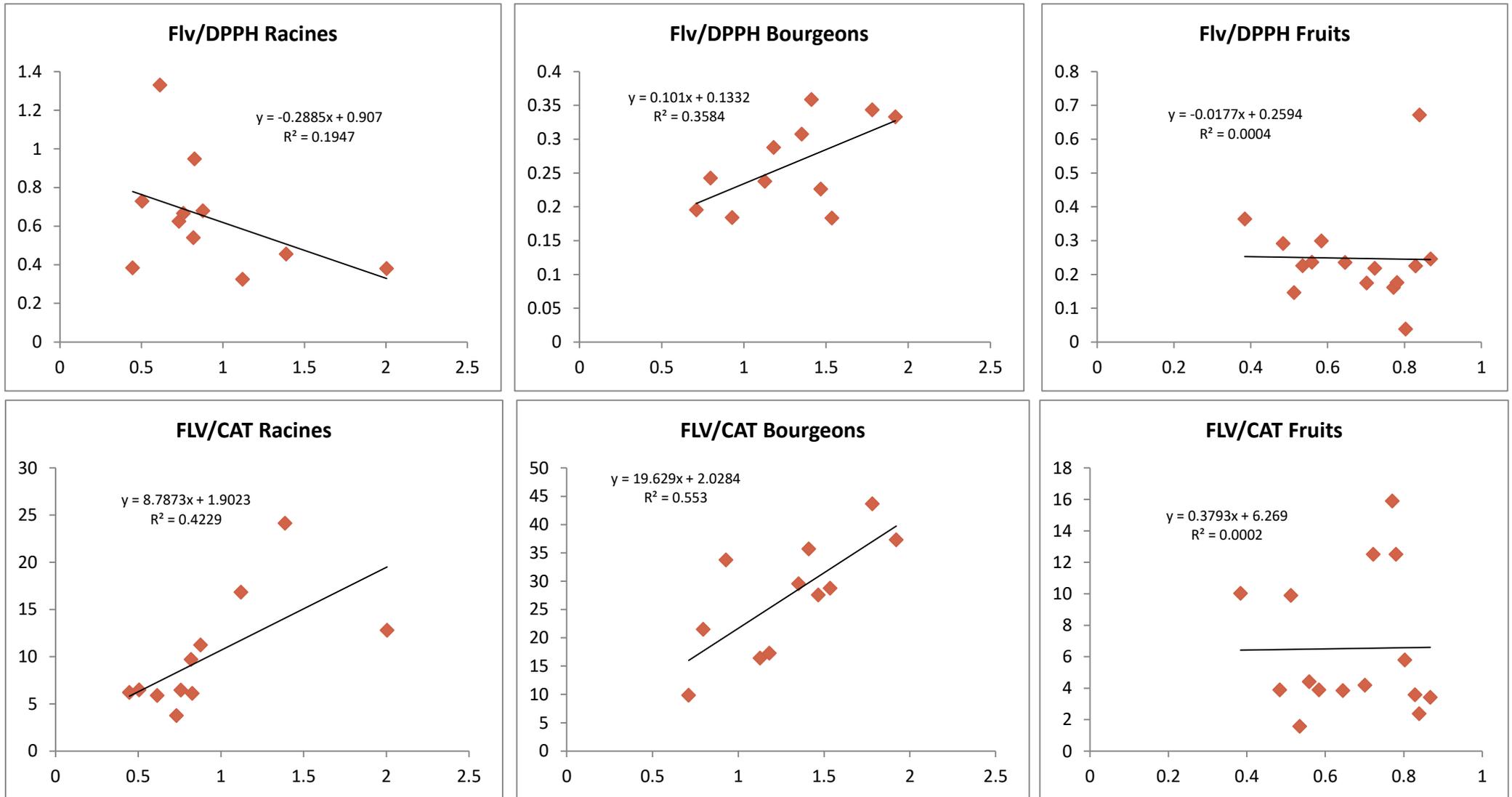


Figure 7. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en flavonoïdes (Flv).

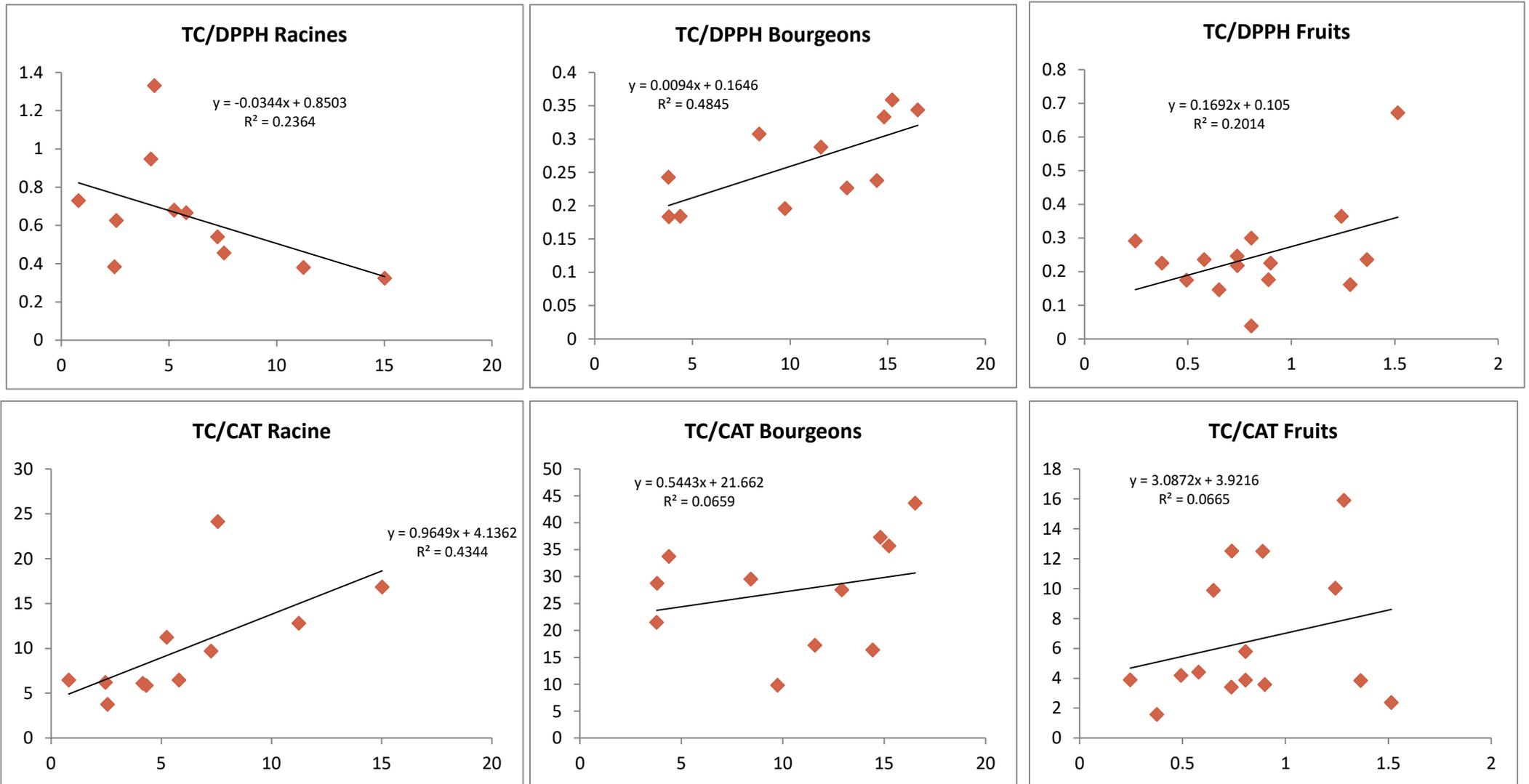


Figure 8. Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en tanins condensés (TC).

3. Evaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *P. atlantica*

L'activité antimicrobienne des extraits à partir des différentes parties de la plante *P. atlantica* a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode permet de tester différents composés contre un seul microorganisme dans une même boîte de pétri (**Rios et Recio, 2005**).

Les résultats obtenus sont mentionnés dans les **Tableaux 5, 6, et 7**. Cette activité variait selon la station, le genre et la sensibilité à la souche. La comparaison des résultats révèle une sensibilité élevée de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* et *C. albicans* à nos préparations végétales. En revanche, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumonia* étaient caractérisés par une résistance. Un effet inhibiteur plus élevé a été détecté contre *S. aureus* (diamètre des zones d'inhibition allant de 16 à 25 mm). On peut en déduire que les souches Gram - sont moins sensibles aux extraits de bourgeon foliaire de *P. atlantica* que celles à Gram + et *C. albicans*.

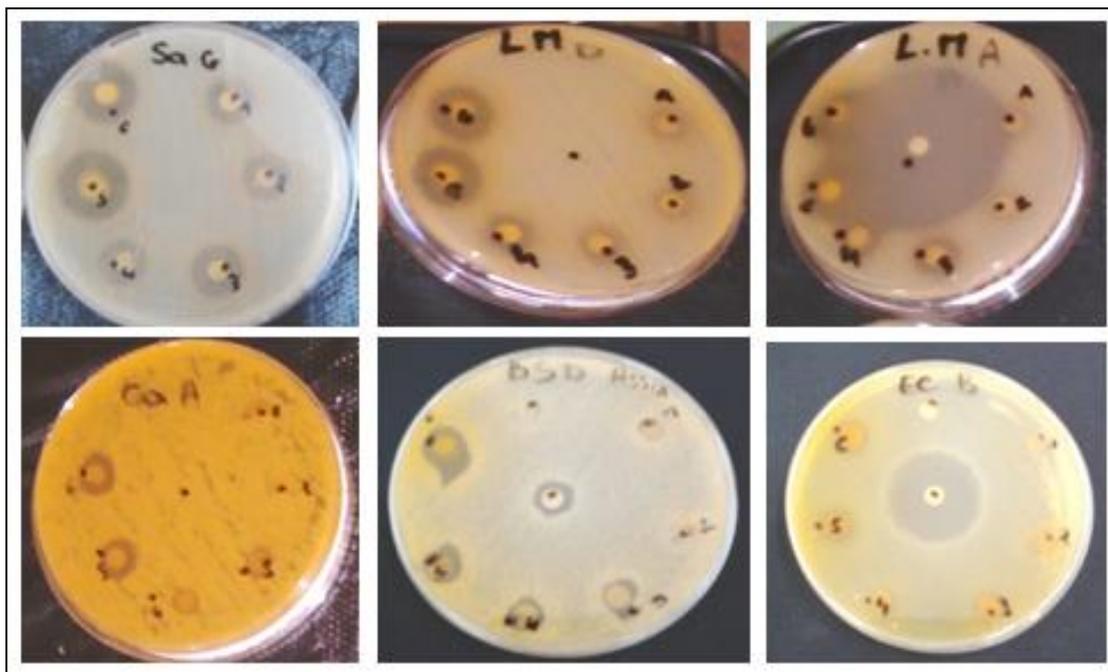


Figure 9. Technique de diffusion en milieu gélosé par contact direct sur disque.

Résultats et Interprétations

Tableau 5. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence des extraits de bourgeons foliaires de *P. atlantica*

Moyennes des diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (mm) cultivées en présence des extraits de Bourgeons																						
Extraits Bourgeons (µg/ml)		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Candida albicans</i>		
		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
Oudjida	PM1	10±0.00	15.2±0.3	19±1.41	0±0.00	8±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	9±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	11.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	12±0.00
	PM2	14±0.00	16±0.00	20±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00
	PF1	8±0.00	13.5±0.7	16±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00
	PF2	9±1.41	12±0.00	17±1.41	7±1.41	10±0.00	13.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00
Saf-Saf	PM1	8±0.00	10±0.00	16±0.00	0±0.00	12±0.00	14±0.00	0±0.00	0±0.00	11±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	11±1.41
	PM2	12±0.00	14±0.00	20±0.00	8±0.00	10±0.00	10±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	11±1.41
	PF1	14±0.00	16±0.00	20±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	0±0.00	8±0.00	10.6±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7.3±0.5	9.5±0.7	12±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	12±0.00
Ainfezza	PM1	10±0.00	14±0.00	16±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00
	PM2	8±0.00	14±0.00	17±1.41	0±0.00	10±0.00	14±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	9±1.41
	PF1	8±0.00	10±0.00	15±1.41	0±0.00	9±1.41	15±1.41	0±0.00	10±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	13±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7±1.41	9±1.41
	PF2	10±0.00	12.7±1.3	13.2±0.3	0±0.00	10.5±0.7	17±1.41	0±0.00	8±0.00	11±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00
Antibiotiques de référence																						
Ampicilline 10 µg/disq		39.5±0.70			31.75±2.47			14±0.00			0±0.00			6.75±0.35			0±0.00			-		
Nystatine 100 µg/disq		-			-			-			-			-			-			28±0.00		

PM : arbre mâle ; PF : arbre femelle. L'échelle adoptée pour évaluer l'activité antibactérienne est la suivante : aucune activité antimicrobienne, diamètre de la zone d'inhibition = 6 mm ; faible activité antimicrobienne, diamètre de la zone d'inhibition = 7 mm ; Activité antimicrobienne légère, diamètre de la zone d'inhibition = 8-9 mm ; Activité antimicrobienne modérée, diamètre de la zone d'inhibition = 10-11 mm ; Activité antimicrobienne élevée, diamètre de la zone d'inhibition = 12-15 mm ; Forte activité antimicrobienne, diamètre de la zone d'inhibition = 15 mm ; écart type SD

Résultats et Interprétations

Tableau 6. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence des extraits de racines de *P. atlantica*.

Moyennes des diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (mm) cultivées en présence des extraits de racines																						
		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Candida albicans</i>		
Extraits racines (µg/ml)		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400
Oudjida	PM1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	14±0.00	0±0.00	7±1.41	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PM2	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	9±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF2	0±0.00	8±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	15±1.41	7±1.41	8±0.00	11±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
Saf-Saf	PM1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	13±1.41	0±0.00	10±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PM2	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	15±0.00	0±0.00	9±1.41	16±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7±0.00	8±0.00	10±0.00	7±1.41	7.5±0.7	11.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
Aimfezza	PM1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PM2	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	14±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF1	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	9±1.41	15±1.41	0±0.00	10±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF2	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

Résultats et Interprétations

Tableau 7. Moyennes des diamètres des zones d'inhibition (en mm) de différents microorganismes cultivés en présence des extraits de fruits de *P. atlantica*.

Moyennes des diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches (mm) cultivées en présence des extraits de Fruits																							
		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Candida albicans</i>			
Extraits fruits (µg/ml)		100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	100	200	400	
Oudjida	PF1	Fim	0±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	12±0.00	20±0.00	10±0.00	14±0.00	16.5±2.12	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	
		Fr	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7±1.41	10±0.00	14.5±0.7	9±1.41	10±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fm	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	9±1.41	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF2	Fim	0±0.00	0±0.00	7.5±0.7	9±1.41	12±0.00	18±0.00	8±0.00	13±1.41	15±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fr	0±0.00	0±0.00	7±1.41	0±0.00	10±0.00	15±0.00	7±1.41	12.5±0.7	14.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fm	0±0.00	0±0.00	0±0.00	10±0.00	15±1.41	20±0.00	10±0.00	14±0.00	19±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
Saf-Saf	PF1	Fim	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	18±0.00	10±0.00	12±0.00	19±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fr	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7±1.41	10±0.00	12±0.00	0±0.00	8±0.00	12±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fm	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	8±0.00	0±0.00	9±1.41	11.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
Aimfeza	PF1	Fim	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	13±1.41	0±0.00	8±0.00	15±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fr	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	9.5±0.7	12±0.00	7±1.41	12±0.00	15±1.41	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fm	0±0.00	0±0.00	0±0.00	7±1.41	8±0.00	10±0.00	0±0.00	7±1.41	10.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
	PF2	Fim	0±0.00	0±0.00	7±1.41	12±0.00	15±1.41	20±0.00	10±0.00	15±1.41	20±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fr	0±0.00	0±0.00	0±0.00	8±0.00	10±0.00	12±0.00	7±1.41	12.5±0.7	14.5±0.7	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
		Fm	0±0.00	0±0.00	0±0.00	9±1.41	12±0.00	15±1.41	0±0.00	0±0.00	10±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

PF : arbre femelle ; **Fim** : fruits immatures ; **Fr** : fruits rouges ; **Fm** : fruits mûrs.

Les souches que nous avons sélectionnées pour les valeurs CMI et CMB sont *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *C. albicans* (**Tableau 8**). Sur la base de la classification d'**Aligiannis et al. (2001)** des extraits de plantes en fonction de leur valeur CMI, les extraits de bourgeon foliaire de toutes les stations peuvent être considérés comme des substances fortement inhibitrices sur *S. aureus* (CMI = 39.06 µg / mL). Le même phénomène est détecté contre *L. monocytogenes*, bien que les extraits de certaines stations n'atteignent pas une valeur CMI. Concernant *C. albicans*, nous notons une forte activité inhibitrice uniquement pour l'échantillon de la station 2. Les valeurs de la CMB des extraits de bourgeons contre *S. aureus* sont plus efficaces que contre *L. monocytogenes* et *C. albicans* (**Tableau 8**). Selon **Biyiti et al. (2004)**, une substance est bactéricide lorsque le rapport CMB / CMI est ≤ 2 , et bactériostatique si le rapport CMB / CMI apparaît > 2 . Sur la base de ces considérations, nos extraits de bourgeon foliaire exercent des effets bactériostatiques contre *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *C. albicans*.

L'activité antibactérienne et antifongique globale des extraits de racines et de fruits variait de modérée à faible. Dans la présente étude, toutes les bactéries Gram- testées et *C. albicans* ne sont pas sensibles aux extraits de racine et de fruit de *P. atlantica*. Les souches de *L. monocytogenes* et *B. subtilis* ont montré un effet sensibilisant à la dose de 200 µg / mL et une activité très significative à 400 µg / mL.

Les souches que nous avons sélectionné pour la détermination de la CMI et CMB sont *L. monocytogenes* et *B. subtilis* (**Tableaux 8 et 9**).

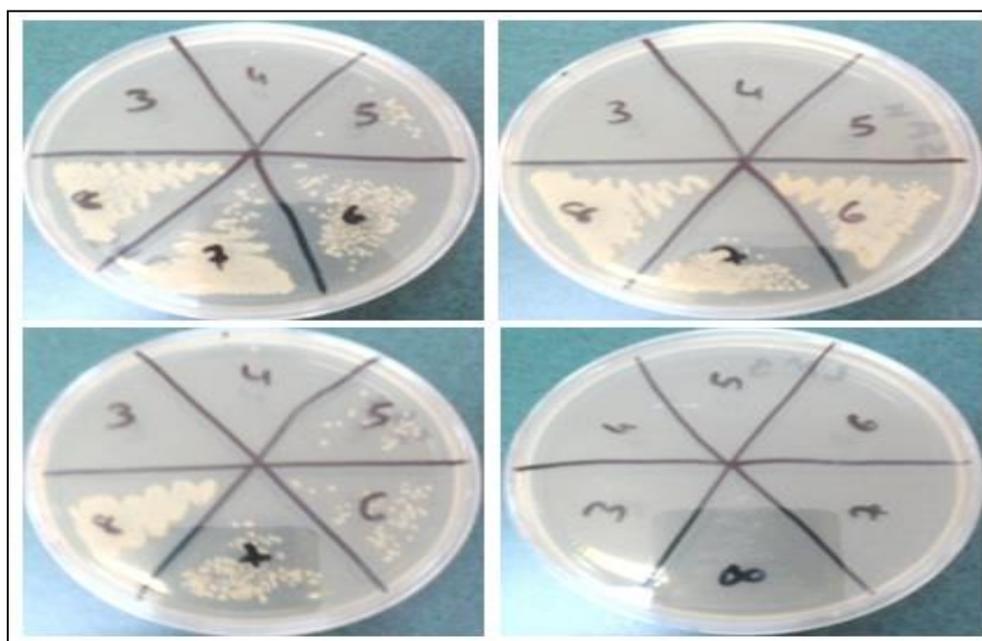


Figure 10. Détermination des concentrations minimales bactéricides CMB.

Résultats et Interprétations

Tableau 8.Concentrations CMI, CMB et CMF des extraits de bourgeons foliaires et des racines (PM: pied mâle ; PF : pied femelle).

Souches	Extraits de bourgeons CMI µg/mL										
	Oudjlida				Saf-saf			Ain-Fezza			
	PM1	PM2	PF1	PF2	PM1	PM2	PF1	PM1	PM2	PF1	
<i>S. aureus</i>	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	39.06	
<i>L. monocytogenes</i>	78.12	-	-	-	312.50	-	-	-	156.25	39.06	
<i>C. albicans</i>		-	-	-	156.25	39.06	39.06	-	-	-	
CBM/F µg/mL											
<i>S. aureus</i>	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	
<i>L. monocytogenes</i>	625	-	-	-	5000	-	-	-	1250	1250	
<i>C. albicans</i>		-	-	-	5000	5000	625	-	-	-	
Souches	Extraits de racines CMI µg/mL										
		PM1	PM2	PF1	PF2	PM1	PM2	PF1	PM1	PM2	PF1
<i>L. monocytogenes</i>	625	625	312.5	312.5	625	625	1250	1250	625	625	625
<i>B.subtilus</i>	625	625	1250	2500	1250	625	625	156.25	1250	1250	1250
CMB µg/mL											
	PM1	PM2	PF1	PF2	PM1	PM2	PF1	PM1	PM2	PF1	PF2
<i>L. monocytogenes</i>	5000	5000	2500	2500	5000	5000	5000				
<i>B. subtilus</i>	1250	1250	5000	5000	1250	5000	625				

Résultats et Interprétations

Tableau 9.Concentrations CMI et CMB des extraits de fruits.

Souches	CMI µg/mL														
	Oudjlida						Safsaf			AinFezza					
	PF1			PF2			PF1			PF1			PF2		
	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fr	Fm	
<i>L. monocytogenes</i>	78.12	156.25	1250	78.12	156.20	1250	156.25	1250	1250	156.25	1250	1250	1250	1250	
<i>B. subtilis</i>	312.50	312.50	1250	312.50	312.50	1250	312.5	1250	1250	312.50	156.25	1250	156.25	1250	
	CMB µg/mL														
	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fim	Fr	Fm	Fr	Fm	
<i>L. monocytogenes</i>	1250	5000	5000	1250	5000	5000	625	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	
<i>B. subtilis</i>	2500	5000	5000	2500	2500	5000	5000	5000	5000	1250	5000	5000	5000	5000	

PF : arbre femelle ; **Fim** : fruits immatures ; **Fr** : fruits rouges ; **Fm** : fruits mûrs.

4. Activité anti-inflammatoire

4.1. Toxicité aiguë

Après l'administration orale de la préparation hydro-méthanolique des bourgeons foliaires à des doses de 150, 200 et 300 mg/Kg, aucune mortalité n'a été enregistrée chez tous les animaux après 48 h.

4.2. Œdème de la patte induit par la carragénine

Les résultats concernant l'activité anti-inflammatoire ont été rapportés sur les **Figures 11** et **12**. Après 1 h de prétraitement à l'extrait, le volume des pattes a été réduit dans les trois groupes de souris traitées mais plus élevé à 150 mg/kg, comparativement aux souris témoins et traitées au diclofénac (à 50 mg/kg). En général, toutes les doses au diclofénac se sont révélées significativement efficaces (One-ANOVA, à $p= 0.05$, $p= 0.001$) que les témoins.

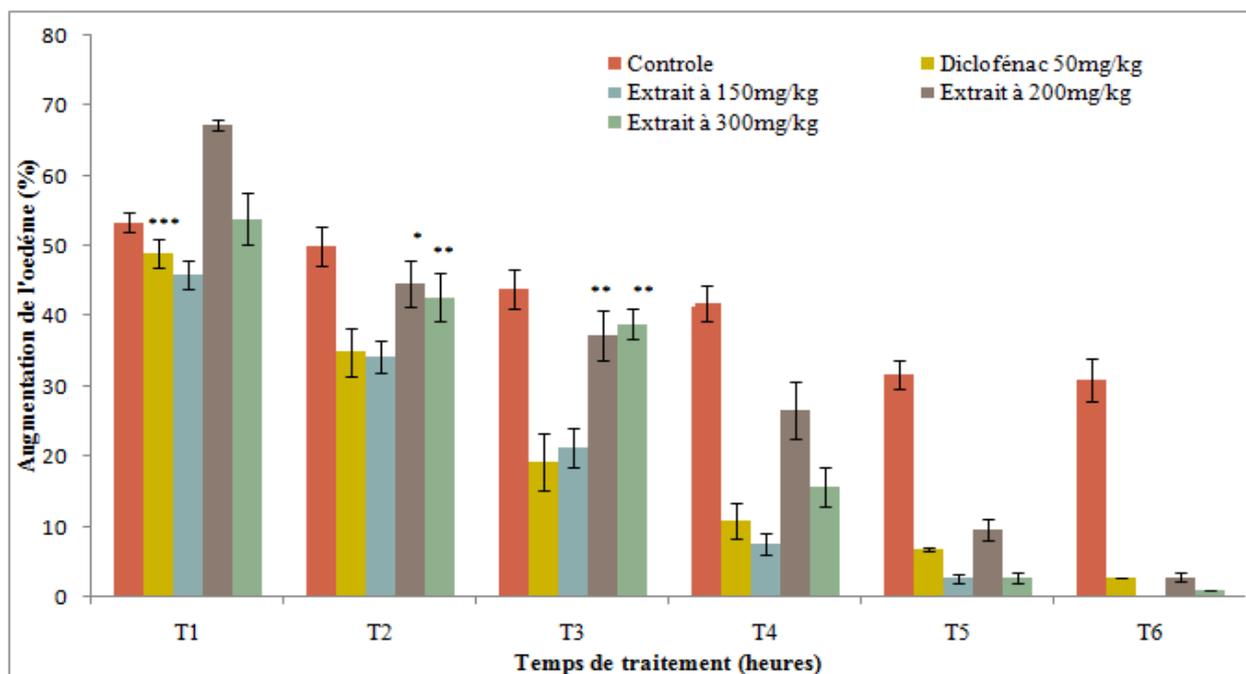


Figure 11. Pourcentage d'augmentation de l'œdème (%AUG) des groupes traités par l'extrait des bourgeons et le Diclofénac comme témoin. Les résultats ont été rapportés comme moyenne \pm SD (n=6 animaux par groupe); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, par rapport au témoin.

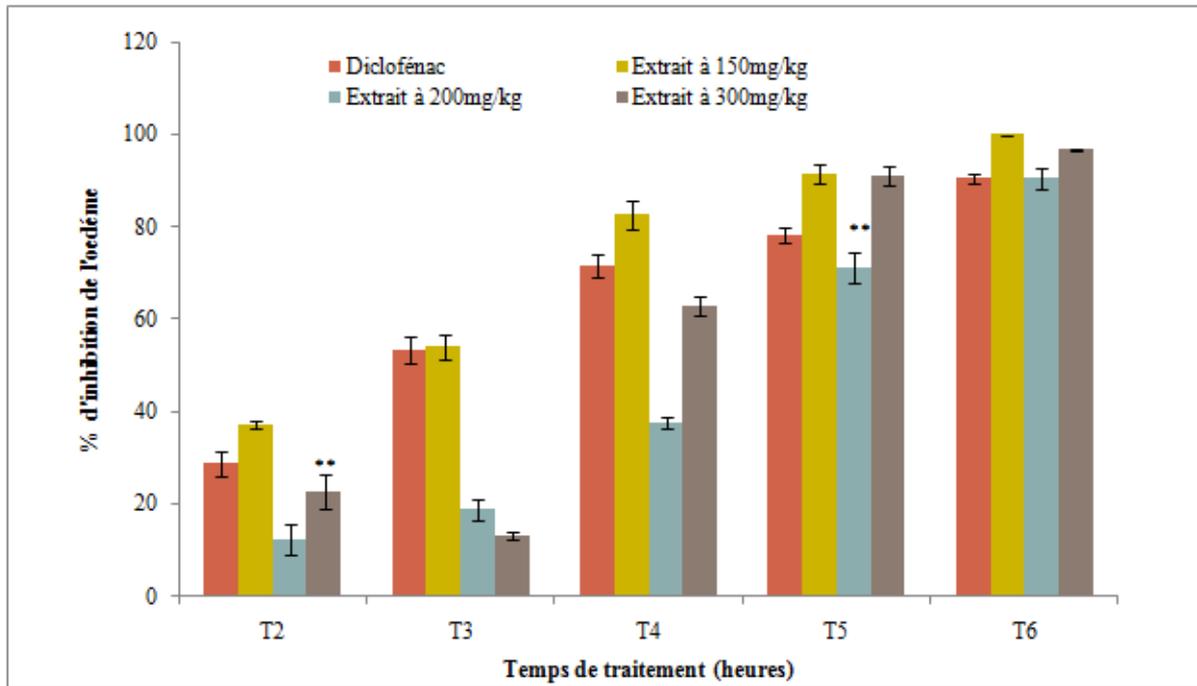


Figure 12. Pourcentage d'inhibition de l'œdème (%INH) des groupes traités et le Diclofénac comme témoin. Les résultats ont été rapportés comme moyenne \pm SD (n=6 animaux par groupe); * p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001, par rapport au témoin.

L'effet d'inhibition de l'extrait à 150 mg/Kg a commencé après 1 heure de l'apparition de l'œdème de la patte et a augmenté en fonction du temps de façon dose-dépendante par rapport au témoin. L'effet anti-inflammatoire a persisté même après six heures d'induction de l'inflammation, et ceci a été observé dans toutes les doses étudiées (150, 200 et 300 mg/Kg). L'inflammation de l'œdème de la patte a disparu de façon significative chez les animaux traités avec la dose 150 mg/kg de l'échantillon de *P. atlantica*, comparativement à ceux traités avec d'autres concentrations. Le pourcentage d'augmentation de l'œdème à la troisième heure de traitement était significatif (**p < 0.01) pour le traitement avec les doses 200 mg/Kg et 300 mg/Kg par rapport au témoin. Le pourcentage maximal d'inhibition de l'œdème de la patte par l'extrait a été observé à 100 %, 90.49 % et 96.75 %, aux doses de 150, 200 et 300 mg/Kg, respectivement. Le diclofénac 50 mg/Kg a montré un pourcentage maximal d'inhibition de 90.49 % 6 heures après l'administration.

4.3. Étude histologique

L'étude histo-pathologique a été réalisée par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Des biopsies des pattes ont été réalisées dans les groupes suivants : témoin négatif (solution saline, par voie orale (p.o.)), témoin positif (diclofénac, 50 mg/Kg) et extrait de bourgeon foliaire à 150, 200 et 300 mg/Kg. Tout le traitement a été effectué après 6 h d'injection intra-plantaire de carragénine (IPL) (**Figure13, 14**). Les tissus de la patte des souris témoins ont révélé une propagation de l'inflammation au tissu musculaire strié, où un granulome caractérisé par des cellules polymorphes est apparu (**Figure 13A**). Des échantillons de tissus prélevés sur les pattes de souris traitées au diclofénac ont révélé une réaction inflammatoire discrète (**Figure 13B**), manifestement moins intense que le témoin (**Figure 13A**). Cependant, l'évolution de la phase aiguë est rapidement résolue par l'action du Diclofénac. Sur la **Figure14C**, nous avons détecté un infiltrat inflammatoire dans les tissus de la patte de souris traitées avec la dose 150 mg/Kg de l'extrait, mais cette altération était moins intense par rapport au groupe témoin. Le traitement de souris à des doses de 200 et 300 mg/Kg a montré une variation des infiltrats tissulaires (**Figures 14D et 14E**).

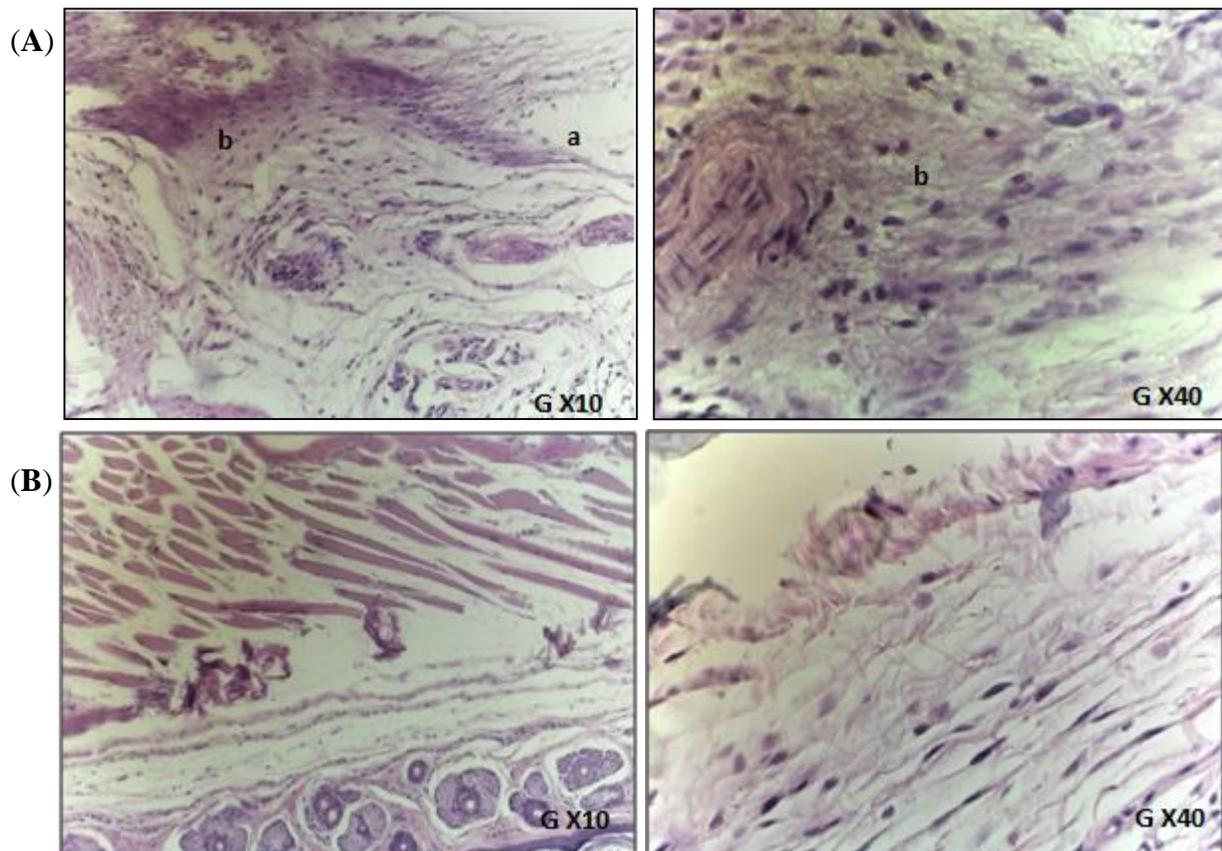


Figure 13. Observation au microscope optique des tissus des pattes de souris du groupe (A) groupe I: Souris témoin, solution saline; (B) groupe II: Souris traitées par Diclofénac; (a) : œdème ; (b) : infiltrat inflammatoire ; grossissement : x10, x40

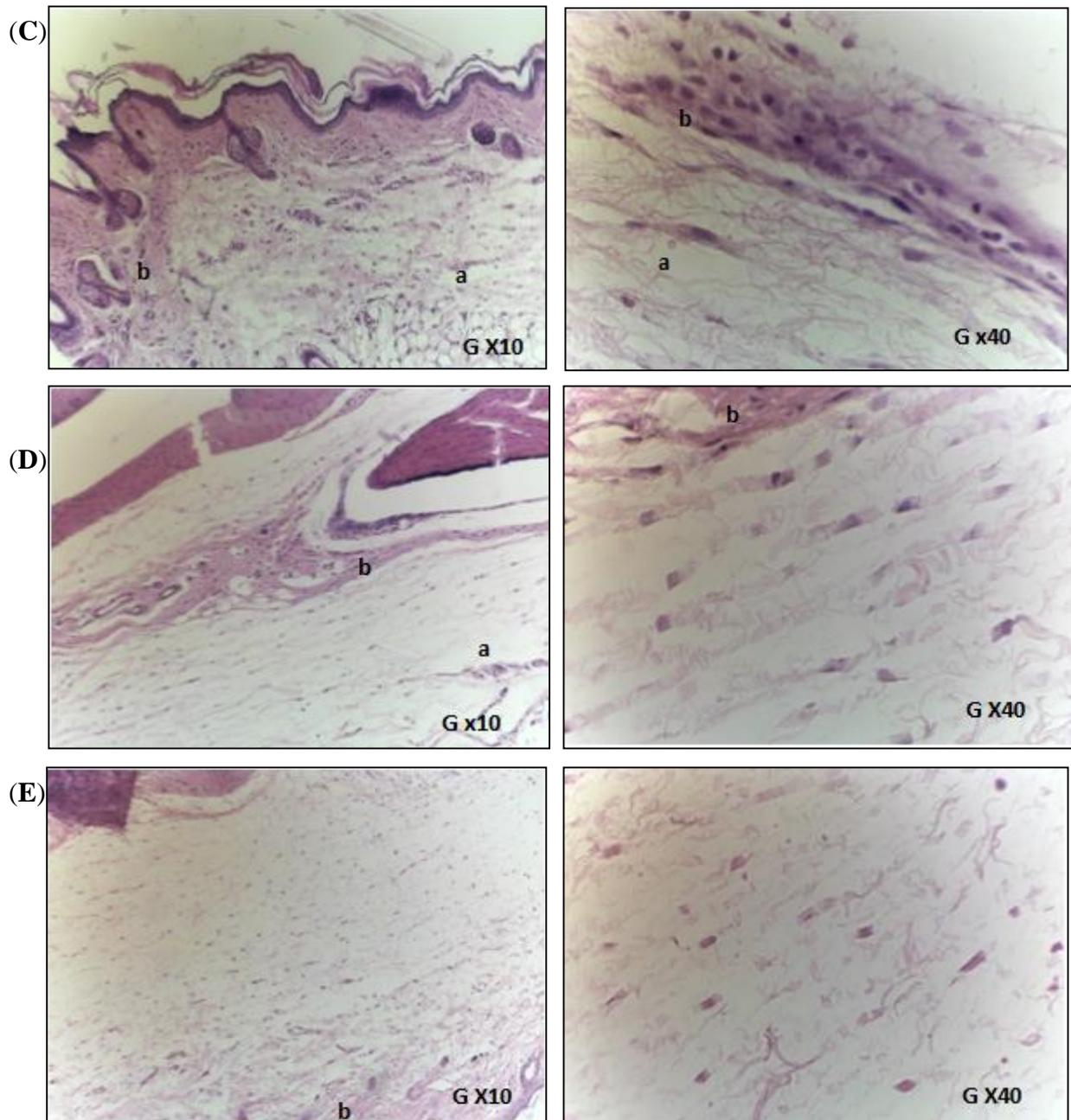


Figure 14. Observation au microscope optique des tissus des pattes de souris des groupes : (C) groupe III: L'extrait de bourgeon à 150 mg/Kg; (D) groupe IV: L'extrait de bourgeon à 200 mg/Kg; (E) groupe V: L'extrait de bourgeon à 300 mg/Kg. (a) : œdème ; (b) : infiltrat inflammatoire ; grossissement : x10, x40

5. Activité inhibitrice de la tyrosinase

L'oxydation de la L-tyrosine catalysée par la tyrosinase des champignons a été inhibée par l'extrait végétal et la quercétine (témoin positif) dans un effet inhibiteur dose-dépendant (**Figure 15**). L'activité enzymatique n'a pas été supprimée instantanément mais a plutôt diminué rapidement. À des concentrations comprises entre 0.09 et 0.15 mg/mL d'extrait de *P. atlantica*, on a observé une activité inhibitrice de 50 % de la tyrosinase du champignon. De façon surprenante, la quercétine, utilisée comme témoin positif, présentait un effet inhibiteur puissant avec une CI₅₀ de 0.010 ± 0.0003 mg/mL.

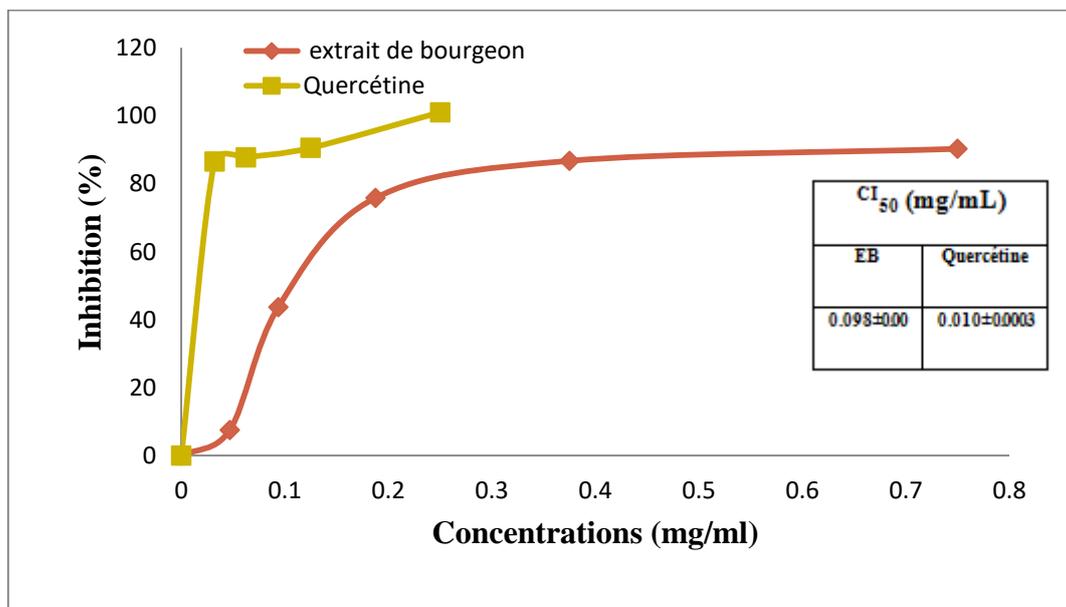


Figure 15. Activité anti-tyrosinase de l'extrait de bourgeon foliaire (EB)

6. Analyse chromatographique CLHP-DAD

La composition chimique des extraits de *P. atlantica* a été analysée par la technique de chromatographie liquide à haute performance (CLHP), pour identifier certains composés détectables dans nos échantillons et liés aux propriétés biologiques décrites ci-dessus. En particulier, la concentration d'acides phénoliques et de flavonoïdes spécifiques a été déterminée dans l'extrait des bourgeons d'arbre mâle de la station Saf-saf et dans l'extrait des

fruits rouges de la station Oudjlida, comme le montre le **Tableau 10**. Les résultats ont été exprimés en microgrammes de métabolite végétal par g d'échantillon de poids frais ($\mu\text{g/g PF}$).

Tableau 10. Temps de rétention et quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes, dans l'extrait des bourgeons d'arbre mâle de la station Saf-saf et dans l'extrait des fruits rouges de la station Oudjlida par CLHP-DAD (**Annexes 1, 2, 3**).

Molécules	BPM1 ($\mu\text{g/g PF}$)	FR2 ($\mu\text{g/g PF}$)
Acides phénoliques		
Acide galique	0	0.324 \pm 0.016
Acide chlorogénique	4.109 \pm 0.021	0.865 \pm 0.022
Acide caféique	117.172 \pm 4.254	3.707 \pm 0.085
Acide <i>p</i> -coumarique	20.255 \pm 1.002	0.454 \pm 0.022
Acide diméthyl-allyl caféique	88.999 \pm 3.446	5.247 \pm 0.217
Hydroxytyrosol	54.832 \pm 2.106	57.351 \pm 2.146
Acid ellagique	51.253 \pm 2.315	7.608 \pm 0.238
Flavonoïdes		
Rutine	42.876 \pm 1.739	59.898 \pm 2.254
Quercétine-3- <i>o</i> -arabinoside	8.781 \pm 0.392	1.878 \pm 0.068
Myricétine	2.410 \pm 0.117	0.264 \pm 0.011
Kaempferol-3- <i>o</i> -glucoside	0.870 \pm 0.039	4.568 \pm 0.146
Quercétine	0	0.224 \pm 0.010
Génistéine	0	20.356 \pm 0.922

BPM1: extrait des bourgeons de pied male de la station de Saf-saf; FR2: extrait des fruits rouges de la station de Oudjlida.

Treize composés phénoliques ont été identifiés dans l'extrait des fruits rouge (FR2). Ils comprennent sept acides phénoliques (acide gallique, acide chlorogénique, acide caféique, acide coumarique, acide diméthyl-allyl caféique, hydroxytyrosol et acide ellagique) et six flavonoïdes (rutine, quercétine-3-*o*-arabinoside, myricétine, kaempférol-3-*o*-glucoside, quercétine et génistéine). Ces composés ont également été détectés dans l'extrait de bourgeon foliaire (BPM1), à l'exception de l'acide gallique, de la quercétine et de la génistéine. La grande activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de bourgeons à feuilles, par rapport aux échantillons obtenus des autres organes, peut s'expliquer par la nature et la quantité de ses acides phénoliques, tels que l'acide caféique, l'acide diméthyl-allyl caféique, l'acide ellagique et l'hydroxytyrosol.

Discussion générale

Les valeurs obtenues pour la teneur en phénols totaux sont comparables à celles précédemment rapportées pour la même espèce (**Toul et al., 2016**). Ces auteurs ont rapporté que les extraits de feuilles et de bourgeons de *P. atlantica* avaient les teneurs phénoliques les plus élevées par rapport aux autres organes de l'ordre de 255.789 ± 4.733 et 233.946 ± 6.205 mg EAG / g MS, respectivement.

Nos résultats montrent également une différence significative ($p < 0.001$) entre les fruits de toutes les stations, indiquant que les fruits rouges détiennent généralement la teneur en composés phénoliques la plus élevée par rapport aux fruits appartenant aux autres stades de maturation. Par conséquent, une différence significative entre le sexe ($p < 0.001$) peut être documentée. Cette variabilité des composés phénoliques des fruits peut s'expliquer par la période de récolte (l'état physiologique de la plante) dont l'arbre femelle est en période de fructification tandis que l'arbre mâle est à l'état de repos. Les extraits de bourgeons présentaient le niveau le plus élevé en flavonoïdes totaux et en tanins condensés, suivis des racines et des fruits. Cette variabilité est du probablement aux conditions biotiques (genre, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (la nature du sol et l'étage bioclimatique) (**Ksouri et al., 2008**).

Les quantités de phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés étaient inférieures à celles rapportées par **Belyagoubi-Benhammou et al., 2014**. La distribution hétérogène de ces composés entre les organes a été corroborée par des études antérieures montrant que la localisation des métabolites secondaires peut varier en fonction de leurs rôles dans plusieurs organes (**Belyagoubi-Benhammou et al., 2014; Toul et al., 2016**).

En ce qui concerne l'activité antioxydante, les résultats du test DPPH ont montré que les extraits d'organes présentent une différence significative ($p < 0.001$) dans leur activité antiradicalaire. Globalement, les extraits de bourgeon foliaire ont la capacité antioxydante la plus élevée, par rapport aux autres préparations. En détail, les arbres femelles ont montré une propriété d'élimination des radicaux libres plus forte que les arbres mâles. Concernant l'extrait de racine, les résultats varient selon les stations et entre les genres au sein de la même station ($p < 0.01$). Pour toutes les stations, nous observons une forte activité pour les fruits immatures (Fim), par rapport aux fruits rouges (Fr) et mûrs (Fm). C'est résultats sont comparable avec ceux de **Park et al., 2017**, qui rapporte une diminution de l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques avec la maturation des fruits.

Selon la littérature, **Amri et al. (2018)** ont rapporté des valeurs CI_{50} du test DPPH égales à 162.6 ± 17.26 et 135.6 ± 16.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les extraits méthanoliques de feuilles mâles et

femelles de *P. atlantica*. Concernant la capacité antioxydante totale, les extraits de racines, de bourgeons et de fruits différaient considérablement dans leurs activités. Parmi tous les échantillons de la plante étudiée, les extraits de bourgeons foliaires possédaient l'activité la plus élevée, en particulier dans la station Saf-saf par rapport aux autres stations. Pour les fruits, dans ce test, nous pouvons rapporter la même tendance observée dans l'analyse DPPH. Cependant, les extraits des fruits ont mis en évidence une propriété antioxydante totale inférieure à celle rapportée par **Belyagoubi-Benhammou et al. (2014)**. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'influence de différents facteurs exogènes, tels que la période de récolte et le degré de maturation des fruits. L'étude de **Ben Ahmed et al. (2018)** a révélé que l'activité antioxydante des feuilles de *P. atlantica* était plus influencée par le moment de la récolte et la région de croissance que par le genre.

En utilisant le coefficient de corrélation de Pearson, il a été possible d'estimer les relations entre les différentes activités antioxydantes des extraits et leur contenu en composés phénoliques (**Lesaffre et al., 2009**). Les coefficients de corrélation qui ont été déterminés indiquent une relation entre le contenu phénolique et l'effet antioxydant, dans différentes parties de la plante. En effet, la littérature rapporte que l'activité antiradicalaire des extraits de plantes dépend fortement du type et de la concentration des métabolites secondaires (**Pellegrini et al., 2003; Gismondi et al., 2017; Rigane et al., 2017**).

Dans notre étude, l'activité antimicrobienne des extraits de bourgeons contre les souches pathogènes variait selon la station, le genre et la sensibilité à la souche. La comparaison des résultats révèle une sensibilité élevée de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* et *C. albicans* aux extraits testés. En revanche, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumonia* étaient caractérisés par une résistance. Un effet inhibiteur plus élevé a été détecté contre *S. aureus* (diamètre des zones d'inhibition allant de 16 à 25 mm). On peut en déduire que les souches Gram - sont moins sensibles aux extraits de bourgeon que les souches à Gram+.

Les souches sélectionnées pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI et CMB sont *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *C. albicans*. **Aligiannis et al. (2001)** ont proposé une classification des extraits de plantes en fonction de leur valeur CMI; forte inhibition: CMI <500 µg/ ml; inhibition modérée: 600 µg/ ml <CMI <1500 µg / ml; faible inhibition: CMI > 1600 µg/ ml. Sur la base de cette classification, les extraits de bourgeon de toutes les stations peuvent être considérés comme des substances fortement inhibitrices sur *S. aureus*. Le même phénomène est détecté contre *L. monocytogenes*, bien que les extraits de certaines stations n'atteignent pas une valeur CMI. Concernant *C. albicans*, nous notons une forte activité inhibitrice uniquement pour l'échantillon de la station 2. Les valeurs CMB de

l'extrait de bourgeon contre *S. aureus* sont plus efficaces que contre *L. monocytogenes* et *C. albicans*. Selon **Biyiti et al. (2004)**, une substance est bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI est ≤ 2 , et bactériostatique si le rapport CMB/ CMI apparaît > 2 . Sur la base de ces considérations, nos extraits de bourgeon exercent des effets bactériostatiques contre *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *C. albicans*. Globalement, la présente étude montre que les extraits de bourgeon de *P. atlantica* étaient efficaces contre les souches Gram-positives et les levures, alors que les bactéries à Gram-négatives présente une certaine résistance contre ces extraits. Cela est cohérent avec les études précédentes rapportant que les micro-organismes Gram négatifs sont plus résistants aux antimicrobiens naturels que les Gram positifs, probablement en raison de leur membrane lipopolysaccharidique externe (**Dulger et Gonuz, 2004; Benhammou et al., 2008; Khan et al., 2009**).

Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que les composés phénoliques sont responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de bourgeons.

En effet, plusieurs travaux ont signalé les effets antibactériens de ces métabolites secondaires contre un large éventail de souches bactériennes (**Rigane et al., 2017; Benhammou et al., 2009**). Les mécanismes d'action des composés phénoliques contre les micro-organismes sont multiples, notamment la perturbation de la rénovation de la membrane cytoplasmique, le blocage du transport actif et la coagulation du contenu du cytoplasme (**Tian et al., 2009**).

A propos des extraits de racines et de fruits, l'effet antimicrobien est modéré voire faible. Toutes les bactéries Gram- testées et *C. albicans* ne sont pas sensibles aux extraits de racine et de fruit de *P. atlantica*. Les souches de *L. monocytogenes* et *B. subtilis* ont montré un effet sensibilisant à la dose de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et une activité très significative à 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les souches qui ont été sélectionnées pour la détermination des CMI et CMB sont *L. monocytogenes* et *B. subtilis*. **Falahati et al. (2015)** ont rapporté une CMI et une CMF d'extrait méthanolique de fruit de *P. atlantica* contre *C. albicans* égales à 10.66 mg/mL et 32 mg/mL respectivement. Il convient de rappeler que l'activité de toute substance naturelle dépend de plusieurs facteurs, tels que le mode d'extraction, le stade de croissance, la concentration active principale, l'origine des souches testées. Selon nos résultats, nous pouvons affirmer qu'il existe une relation entre la composition phytochimique, le type d'organe, la région de croissance, le genre et les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

D'après les résultats des analyses phytochimiques et des activités biologiques testées, l'extrait des bourgeons de pied femelle de la station d'Ain-fezza s'est montré très actif contre les souches microbiennes testées et aussi il présente un pouvoir antioxydant puissant. Ces

propriétés sont corrélées à sa richesse en composés phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide ρ -coumarique, l'hydroxytyrosol, l'acide dimethyl-allyl cafféique.

Pour cela, cet extrait a été sélectionné afin d'évaluer son activité anti-inflammatoire *in vivo*.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été effectuée selon le modèle de l'inflammation aiguë induite par la carragénine décrit par **Winter et al. (1962)**.

Après avoir effectué le test de toxicité aiguë aucun signe de toxicité n'a été enregistré, et cela pour tous les animaux après 24 à 72 h d'administration de l'extrait.

Après 1 h de prétraitement avec l'extrait, le volume de la patte a diminué dans les trois groupes de souris traitées par l'extrait comparativement au groupe témoin et standard, mais la diminution été plus remarquable à la dose de 150 mg / kg. L'effet d'inhibition de l'extrait à la dose 150 mg / kg a commencé après la première heure à partir de la formation de l'œdème au niveau de la patte et a augmenté de manière dépendante au temps, par rapport au témoin. L'effet anti-inflammatoire a persisté même après six heures d'induction de l'inflammation, et cela pour tous les doses testée (150, 200 et 300 mg / Kg). L'inflammation de l'œdème de la patte a disparu de manière intensive chez les animaux traités avec la dose 150 mg / kg de l'échantillon de *P. atlantica*, par rapport à ceux traités avec les autres concentrations. L'effet anti-inflammatoire de l'extrait à 150 mg / kg était substantiel par rapport au diclofénac sodique, et cela dès la deuxième heure. Le pourcentage maximal d'inhibition de l'œdème de la patte par l'extrait de la plante a été observé à 100%, 90.49% et 96.75%, aux 3 doses de 150, 200 et 300 mg / kg, respectivement. Le diclofénac à 50 mg / kg a montré un pourcentage maximal d'inhibition de 90.49% 6 heures après l'administration. L'étude actuelle de l'activité anti-inflammatoire, a démontré que le traitement des souris avec l'extrait hydro-méthanolique de bourgeon foliaire de *P. atlantica* inhibait de manière significative le développement de l'œdème, et cela d'une manière dépendante du temps, et que son action était plus efficace que celle obtenue après l'administration du traitement anti-inflammatoire standard (diclofénac sodique). Nos données ont été corroborées par d'autre travaux; **Amri et al. (2018)** ont rapporté que l'administration de l'extrait méthanolique de feuilles de *P. atlantica* (à des doses de 100 mg / Kg et 250 mg / Kg) diminuait l'œdème plantaire, à 3 h (34.28 et 97.88%, dans cet ordre) et 6 h (44.31 et 92.02%, respectivement) de traitement.

L'étude histologique vient confirmer les résultats de pourcentage d'augmentation et d'inhibition de l'œdème (%AUG et %INH). Les tissus des pattes des souris témoins ont montré que l'inflammation s'est propagée au tissu musculaire strié, où un granulome caractérisé par des cellules polymorphes est apparu. Des échantillons de tissus des pattes de souris traitées au diclofénac ont révélé une réaction inflammatoire discrète, évidemment

moins intense que le contrôle. Cependant, l'évolution de la phase aiguë a été rapidement résolue par l'action du diclofénac. Un infiltrat inflammatoire était détectable dans les tissus de la patte de souris traitées avec 150 mg / kg d'extrait, mais cette altération était moins intense que dans le groupe témoin. Le traitement des souris à 200 et 300 mg / kg a montré une diminution significative du nombre d'infiltrats tissulaires. Ces résultats documentent que l'extrait hydro-méthanolique de bourgeon foliaire de *P. atlantica* a exercé un effet anti-inflammatoire sur l'œdème de la patte. Cette preuve peut être justifiée par la quantité élevée de composés phénoliques et flavonoïdes totaux que les échantillons de plantes possédaient, comme la rutine, l'acide caféique et l'acide diméthyl-allyl caféique qui sont des métabolites végétaux anti-inflammatoire bien connu (Yoo et al., 2014; Bahareh et al., 2017). Il a été démontré que l'acide caféique avait la capacité de réduire la production de NO via une diminution de la biosynthèse d'iNOS en réduisant les teneur en NF-kB (Veza et al., 2016). De plus, la forte capacité antioxydant révélé dans les extraits bourgeons pourrait éventuellement contribuer à la réduction de l'inflammation. En effet, le lien entre ces deux processus, serait incontestablement la contribution des composés phénoliques, agissant comme antioxydants, à éliminer les radicaux libres produits lors du processus inflammatoire et stoppent ainsi les réactions biochimiques indésirables, et en inhibant la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α et d'oxyde nitrique (NO) (Schauss, 2013).

Concernant l'activité antityrosinase, l'oxydation de la L-tyrosine catalysée par la tyrosinase des champignons a été inhibée par l'extrait des bourgeons de manière dose-dépendant. L'activité enzymatique n'a pas été supprimée instantanément mais a plutôt diminué rapidement. À des concentrations comprises entre 0.09 et 0.15 mg/mL d'extrait de *P. atlantica*, on a observé une inhibition de 50 % de l'enzyme tyrosinase. À la lumière de cela, nous avons constaté que l'analyse CLHP-DAD de l'extrait de bourgeon a révélé la présence d'acide diméthyl-allyl caféique, d'acide ρ -coumarique, d'acide ellagique et de rutine, comme composés majeurs. Parmi eux, la rutine qui est connu pour son inhibition de l'activité de la tyrosinase, représente un puissant agent anti-pigment dû à la présence de plusieurs groupes hydroxyle dans sa structure chimique (Si et al., 2012). De plus, il a été démontré que l'acide ρ -coumarique et l'acide caféique inhibent respectivement 10 et 3 fois plus efficacement l'activité de la tyrosinase des champignons que l'acide kojique (Lee et al., 2012).

Ces données suggèrent que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-tyrosinase et antimicrobienne de l'échantillon de bourgeon pourrait être associée à la nature de son phytocomplexe, en particulier à la quantité d'acides phénoliques. Cependant, il est impossible

d'associer spécifiquement la bioactivité du présent extrait à un ou plusieurs métabolites végétaux particuliers, car, comme cela est largement rapporté dans la littérature (**Ettorre et al., 2010 ; Giovannini et al., 2016**), le phytocomplexe végétal fonctionne en synergie et non par molécules singulières.

Conclusion

Au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été consacrés à l'utilisation de différentes espèces végétales en raison de leurs activités pharmacologiques puissantes. La majeure partie de l'effet thérapeutique des plantes médicinales a été attribuée aux métabolites secondaires des plantes tels que les composés phénoliques qui ont prouvé leurs rôles dans divers activités biologiques.

Ce travail s'était porté sur l'évaluation des propriétés antioxydante, antimicrobienne anti-inflammatoire et antityrosinase des extraits de racines, de bourgeons et de fruits de *P. atlantica* subsp. *atlantica*, en fonction du genre, du type d'organe, de la région de croissance et du stade de maturation du fruit.

Les extraits de bourgeons ont montré une activité antimicrobienne efficace contre deux souches microbiennes à Gram positives (*S. aureus* et *L. monocytogenes*), et la levure *C. albicans* par rapport au autre extraits étudiés. Ces extraits ont également montré une activité antioxydante et anti-inflammatoire élevée.

Nos résultats suggèrent que les extraits de *P. atlantica*, en particulier les extraits de bourgeons, possèdent un intéressant phytocomplexe avec une bioactivité significative, comme capacités antioxydantes, antimicrobiennes anti-inflammatoire et antityrosinase. Ces effets peuvent être attribués à leur teneur élevée et à la nature des acides phénoliques (acides cinnamique et benzoïque) et aux flavonoïdes qui agissent en synergie, plutôt qu'à un seul composé actif.

Les présentes conclusions appuient et clarifient l'utilisation de différentes parties de cette espèce végétale en médecine traditionnelle et indiquent leur potentiel à fournir des composés biologiques actifs.

La poursuite de ces axes de recherche laisse présager de nombreuses perspectives.

En s'intéressant encore plus à la gemmothérapie (l'application utilisant les précieux bourgeons que la nature nous offre) et cela en étudiant et comparant les différents types de bourgeons de *P. atlantica*.

En souhaitons aussi faire l'évaluation d'autres activités biologiques telles que les propriétés anticancéreuses et neurodégénératives.

Cependant, il serait intéressant d'effectuer la détermination quantitative de la composition chimique des extraits de bourgeons, de fruits et de racines par d'autre techniques d'analyse phytochimique pour mieux isoler et identifier les composants actifs sous-jacents à ses mécanismes moléculaires.

Références bibliographiques

- Achili, I., Amrani, A., Bensouici, C., Gül, F., Altun, M., Demirtas, I., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2020. Chemical Constituents, Antioxidant, Anticholinesterase and Antiproliferative. Effects of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. Extracts. Recent pat. *Food Nutr. Agric.* 11(3), 249- 256.
- Ait Said, S., Fernandez, C., Greff, S., Derridj, A., Gauquelin, T., Mevy, J.P., 2011. Interpopulation variability of leaf morpho-anatomical and terpenoid patterns of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* growing along an aridity gradient in Algeria. *Flora*.206, 397–405.
- Alami, M., Barret, R., Brion, J.D., Enguehard-Gueiffier, C., Foliot, P., Gaudy, C., Gerondeau, N., Gueiffier, A., Lanotte, P., Leconte-Astruc, V., Mereghetti, L., Peyrat, J.F., Ratsimbazafy, V., Tandé D., 2005. In *Pharmacothérapie Pratique à L’officine : L’essentiel, Antibiotiques: Pharmacologie et Thérapeutique*. Elsevier, P14.
- AliGiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4168–4170.
- Amri, O., Zekhnini, A., Bouhaimi, A., Tahrouch, S., Hatimi, A., 2018. Anti-inflammatory activity of methanolic extract from *Pistacia atlantica*Desf. leaves. *Pharm. J.* 10, 71–76.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48(1), 5-16.
- Bahareh, Abd., Mohtaram, A., Farid, H., Marjan, N., 2017. Treatment with Rutin – A Therapeutic Strategy for Neutrophil–Mediated Inflammatory and Autoimmune Diseases - Anti-inflammatory Effects of Rutin on Neutrophils. *J Pharmacopuncture*.20, 52–56.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*.99, 191–203.
- Ballistreri, G., Arena, E., Fallico, B., 2009. Influence of ripeness and drying process on the polyphenols and tocopherols of *Pistacia vera*. *L. Molecules*.14 (11), 4358–4369.
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci.* 94(6), 557-572.
- Belhadj, S., 1999. Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation. Cahiers options Belhadj, S., 2001. Geographical distribution of *Pistacia atlantica* Desf. in Algeria. In IIIInternational Symposium on Pistachios and Almonds, 591, 499-503.

- 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. *Int Food Res J.* 23 (3), 948–953.
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Atik-Bekkara, F., 2014a. Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *J. Med. Plants Res.* 8, 1198–1207.
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., El Zerey-Belaskri, A., Atik Bekkara, F., 2014b. In vitro antioxidant properties of flavonoid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* fruit using five techniques. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (4), 1118–1125.
- 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* sp. leaves, *Pharma Biol*, 55(1), 1185-1194.
- 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. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 149, 547–556.
- Ben Ahmed, Z., Hefied F, Yousfi, M., Demeyer, K., Heyden, Y. V., 2022. Etude de l'activité antioxydante de *Pistacia atlantica* Desf. Extraits de galle et évaluation des composés responsables. *Biochem. Syst. ecol.* 100, 104358.
- Benamar, H., Marouf, A., Bennaceur, M., 2018. Phytochemical composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of aqueous extract and fractions of *Pistacia atlantica* subsp. *atlantica* from Algeria. *J. Herbs, Spices, Med. Plants.* 24, 229–244.
- Benaradj, A., Boucherit, H., Bouazza, M., 2015. Ethnobotanique du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica*) auprès la population de Béchar (Algérie occidentale). *J.A.R.S.T.* 2(1), 139-146.
- Benhammou, N., Atik-Bekkara, F., Kadifkova-Panovska, T., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm. Pharmacol.* 2, 22–28.
- Benhammou, N., Atik-Bekkara, F., Kadifkova-Panovska, T., 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Compt. Rendus Chem.* 12, 1259–1266.
- Benhassaini, H., Benabderrahmane, M., Chikhi, K., 2003. Contribution à l'évaluation de l'activité antiseptique de l'oléorésine et des huiles essentielles du pistachier de l'Atlas sur

- certaines sources microbiennes: *Candida albicans* (ATC 20027), *Candida albicans* (ATCC 20032) et *Saccharomyces cerevisiae*. *Ethnopharm.*30, 38–46.
- Benhassaini, H., Mehdadi, Z., Hamel, L., Belkhodja, M., 2007. Phytoécologie de *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* dans le Nord-ouest algérien. Science et changements planétaires. *Sécheresse*. 18(3), 199- 205.
- Benmahieddine, A., Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., El Zerey-Belaskri, A., Gismondi, A., Di Marco, G., Canini, A., Bechlaghem, N., Atik Bekkara, F., Djebli, N., 2021. Influence of plant and environment parameters on phytochemical composition and biological properties of *Pistacia atlantica* Desf. *Biochem Syst and Ecolo*. 2021.
- Biyiti, L.F., Meko, D.J.L., Amvam Zollo, P.H., 2004. Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaises. *Pharm. Med. Trad. Afr.* 13, 11–20.
- Boban, N., Tonkic, M., Modun, D., Budimir, D., Mudnic, I., Davorka Sutlovic, D., Punda-Polic, V. & Boban, M., 2010. Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control*. 21, 1161-1165.
- Bozorgi, M., Memariani, M., Mobli, M., Hossein, M., Salehi S., Reza, M., Ardekani, S., 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. *Sci. World J*, 10, 2-28.
- Cano N., Barnoud D., Schneider S.M., Vasson M.P., Hasselmann M., Leverve X., 2006. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Science & Business Media, 1191 pages.
- Cavin, A., 1999. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires ; *Tinospora Crispa* (Ménispermacées), *Merremia Emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea Enneandra* (Annoncées). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en biochimie, Université de Lausanne-Suisse.
- Chan, EWC., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E., Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem*. 109, 477–483.
- Chang, T.S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440–2475.
- Chavez, J., Leal, P., Yunes, R., Nunes, R., Barardi, C., Pinto, A., Simoes, C., Zanetti, C., 2006. Evaluation de l'activité antivirale des composés phénoliques et dérivés contre le virus de la rage. *Vet Microbiolo*. 116, 53-59.

- Chepel, V., Lisun, V., Skrypnik, L., 2020. Changes in the content of some groups of phenolic compounds and biological activity of extracts of various parts of heather (*Calluna vulgaris* (L.) hull) at different growth stages. *Plants*. 9 (8), 926.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved standard—ninth ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, CLSI document M2-A9.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Edition, Wayne.
- Coene, I., 2004. Les antioxydants et l'alimentation, nutrition information center NICE, Symposium, 23 Octobre 2004, Bruxelles, Belgique. *Nutrinews*, N°4.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 26, 343-356.
- Delazar, A., Reid, R.G., Sarker, S.D., 2004. GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. *mutica*. *Chem. Nat. Compd.* 40, 24–27.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97, 654-660.
- Dobignard, A., et Chatelain, C., 2010-2013. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord (4 vol.), Genève, C.J.B.G.
- Donno, D., Beccaro, G.L., Carlen, C., Ançay, A., Cerutti, A.K., Mellano, M.G., Bounous, G., 2016. Analytical fingerprint and chemometrics as phytochemical composition control tools in food supplement analysis: characterization of raspberry bud preparations of different cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 96 (9), 3157–3168.
- Donno, D., Beccaro, G.L., Mellano, M.G., Cerutti, A.K., Marconi, V., Bounous, G., 2013. Botanicals in *Ribes nigrum* bud-preparations: an analytical fingerprinting to evaluate the bioactive contribution to total phytocomplex. *Pharm. Biol.* 51 (10), 1282–1292.
- Dulger, B., Gonuz, A., 2004. Antimicrobial activity of certain plants used in traditional Turkish medicine. *Asian J. Plant Sci.* 3, 104–107.
- Duru, M.E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T., 2003. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*. 74, 170–176.

- Edziri H., Mastouri M., Aouni M., et al., 2012. Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South Afr J Botany*. 80,104–9.
- El Zerey-Belaskri, A., 2016. Doctorate thesis. A Multidisciplinary Approach for the Characterization of *Pistacia atlantica* Desf. Subsp. *atlantica* Diversity in Northwest Algeria, vol. 129. Sdi Bel Abbes University, pp. 15–35.
- El Zerey-Belaskri, A., Benhassaini, H., 2017. El bottom (*Pistacia atlantica* Desf.) A travers l'existence de l'homme: Recit entre altruisme et ingratitude. In: Conference: Conference for the First Day of Study on the Conservation and Valorization of Vegetable Biodiversity in Algeria. February 21st. Sidi Bel Abbes, Algeria.
- El Zerey-Belaskri, A., Benhassaini, H., Naimi, W., Rahoui, S., 2013. Cellulosic and hemicellulosic fractions dosage of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* leaves in western Algeria. *Nat Prod Res*. 27, 1757–1763.
- El Zerey-Belaskri, A., Cavaleiro, C., Romane, A., Benhassaini, H., Salgueiro, L., 2017. Intra specific chemical variability of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* essential oil from Northwest Algeria. *J. Essent. Oil Res*. 29, 32–41.
- Ettorre, A., Frosali, S., Andreassi, M., Di Stefano, A., 2010. Lycopene phytoextract, but not pure lycopene, is able to trigger apoptosis and improve the efficacy of photodynamic therapy in HL60 human leukemia cells. *Exp. Biol. Med*, 235, 1114–1125.
- Falahati, M., Sepahvand, A., Mahmoudvand, H., Baharvand, P., Jabbarnia, S., Ghoghghi, A., Yarahmadi, M., 2015. Evaluation of the antifungal activities of various extracts from *Pistacia atlantica* Desf. *Curr. Med. Mycol*. 1, 25–32.
- Farhoosh, R., Tavakoli, J., Khodaparast, M.H.H., 2008. Chemical composition and oxidative stability of Kernel oils from two Current subspecies of *Pistacia atlantica* in Iran. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 85, 723–729.
- Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., Kato, F., 2004. Optimisation of cultural conditions and some properties of radical scavenging substances from *sporobolomyces salmonicolor*. *Pak. J. Biol. Sci*. 7,1365–1370.
- Ghedadba N.L., Hambaba A., Ayachi M.C., Aberkane H., Bousselesla S.M., Oueld-Mokhtar., 2015. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*. 13,118-129.
- Giovannini D., Gismondi, A., Basso, A., Canuti, L., Braglia, R., Canini, A., Mariani, F., Cappelli, G., 2016. *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil exerts antibacterial and anti-

- inflammatory effect in macrophage mediated immune response to *Staphylococcus aureus*. *Immunol Invest*, 45, 11-28.
- Gismondi, A., De Rossi, S., Canuti, L., Di Marco, G., Novelli, S., Fattorini, L., Canini, A., 2018. From Robinia pseudoacacia L. nectar to Acacia mono floral honey: biochemical changes and variation of biological properties. *J. Sci. Food Agric.* 98, 4312–4322.
- Gismondi, A., Di Marco, G., Canuti, L., Canini, A., 2017. Antiradical activity of phenolic metabolites extracted from grapes of white and red *Vitis vinifera* L. cultivars. *Vitis*. 56, 19–26.
- González-Segovia, R., Quintanar, J.L., Salinas, E., Ceballos-Salazar, R., AvilesJiménez, F. & Torres-López, J., 2008. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *J Gastroenterol.*43, 441–447.
- Hashemi, L., Asadi-Samani, M., Moradi, M.T., Alidadi, S.,2017. Anticancer activity and phenolic compounds of *Pistacia atlantica* extract. *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* 7, 26–31.
- Heidarian, E., Jafari-Dehkordi, E., Valipour, P., Ghatreh-Samani, K., Ashrafi- Eshkaftaki, L., 2017. Nephroprotective and anti-inflammatory effects of *Pistacia atlantica* leaf hydroethanolic extract against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Diet. Suppl.* 14, 489–502.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C., Rahu, N., 2016. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- Idjeri-Mecherara, S., Hassani, A., Castola, V., Casanova, J., 2008. Composition of leaf, fruit and gall essential oils of Algerian *Pistacia atlantica* Desf. *J. Essent. Oil Res.* 20, 215–219.
- Iserin, P., 2001. Larousse encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins, vol. 2. London: Larousse (335pp.).
- Julkunen-Titto, R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern Willows methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213–217.
- Karimi, H.R., Kafkas, S., 2011. Genetic relationships among *Pistacia* species studied by SAMPL markers. *Plant Systemat. Evol.* 297, 207–212.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A., Manazir, A.S., Siddiqui, M., Khan, A.U., 2009. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules.*14, 586–597.

- Kim, Y.J., Uyama, H., 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1707–1723.
- Kordali, S., Cakir, A., Zengin, H., Duru, M.E., 2003. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*.74, 164–167.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*, 331: 865- 873.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M., Cardinali, A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*.661, 23–67.
- Lee, H-S., 2002. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1400-1403.
- Lee, HS., Shin, K.H., Ryu, G.S., Chi, G.Y., Cho, I.S., Kim, H.Y., 2012. Synthesis of small molecule peptide conjugates as potential whitening agents. *Bull Korean Chem Soc.* 33, 3004–3008.
- Lesaffre, E., Feine, J., Leroux, B., Declerck, D., 2009. Statistical and Methodological Aspects of Oral Health Research. John Wiley & Sons Ltd.410p.
- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J, Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H.B., 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*.6, 6020-6047.
- Liu, C.H., Abrams, N.D., Carrick, D.M., Chander, P., Dwyer, J., Hamlet, M.R.J., Kindzelski, A.L., PrabhuDas, M., Tsai S.Y.A., Vedamony, M.M., Wang, C., Tandon, P., 2019. Imaging inflammation and its resolution in health and disease: current status, clinical needs, challenges, and opportunities. *FASEB. J.* 33(12), 13085–13097.
- Liu, J., Du, C., Beaman, H.T., Monroe, M.B.B., 2020. Characterization of phenolic acid antimicrobial and antioxidant structure–property relationships. *Pharmaceutics*.12 (5), 419.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., 2012. Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: An update. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.*11, 378–398.
- Lopez, S., Lima, B., Agüero, M.B., Lopez, M.L., Hadad, M., Zygadlo, J., Caballero, D., Stariolo, R., Suero, E., Egly Feresin, G., Tapia, A., 2018. Chemical composition, antibacterial and repellent activities of *Azorella trifurcata*, *Senecio pogonias* and *Senecio oreophyton* essential oils. *Arabian. J. Chem.* 11, 181–187.

- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed presses polytechnologiques et universitaires Romandes.
- Mahudro Y., Dedome S.O., Sessou P., Alitonou G.A., Tchobo F.P., Avlessi F., et Codjo Koko Sohounhloue D., 2020. Phytochemical studies and biological activities of extracts from two medicinal plants used in benin to treat skin infections and septicemias. *Int. j. res. innov. appl. sci.* 28 (2), 507-514.
- Mandal, S., Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., Mandal, N., 2009. Assessment of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging activity of methanolic extract of *Caesalpinia crista* leaf. *Evid. based Complement. Altern. Med.* 2011, 1-11.
- Martz, L., Julkunen-Tiitto, R., Stark, S., 2010. Phenolic composition and antioxidant capacity of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) leaves in Northern Europe following foliar development and along environmental gradients. *J. Chem. Ecol.* 36, 1017–1028.
- méditerranéennes, 56, 107-109.
- Miara, M.D., Bendif, H., Rebbas, K., et al., 2019. Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (Northeast Algeria). *J Herb Med.* 16,100262
- Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R., Idzik, D., Wąsik, T., 2018. Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus*. Clinical Strains. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 15(10), 2321.
- Mohamadi, J., Motaghi, M., Panahi, J., Havasian, M.R., Delpisheh, A., Azizian, M., Pakzad, I., 2014. Anti-fungal resistance in *Candida* isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation.* 10, 667–670.
- Monjauze, A., 1980. Connaissance du bétoum *Pistacia atlantica* Desf. Biologie et forêt. *Forestière Française*, 4, 357-363.
- NCCLS, (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. M100- S11. Wayne. PA. USA.
- Ndiaye, M., S.Y., Gy, Dièye, A.M., Touré, M.T., Faye, B., 2006. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annona reticulata* (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 14, 179-186.
- OCDE. 2008. Guideline for the testing of chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity– Up-and-Down-Procedure (UDP), 8 pp. Paris, France.
- OMS., Activités de l'OMS dans la Région africaine, 2016-2017. Rapport biennal de la Directrice régionale 4th proof_0.pdf.

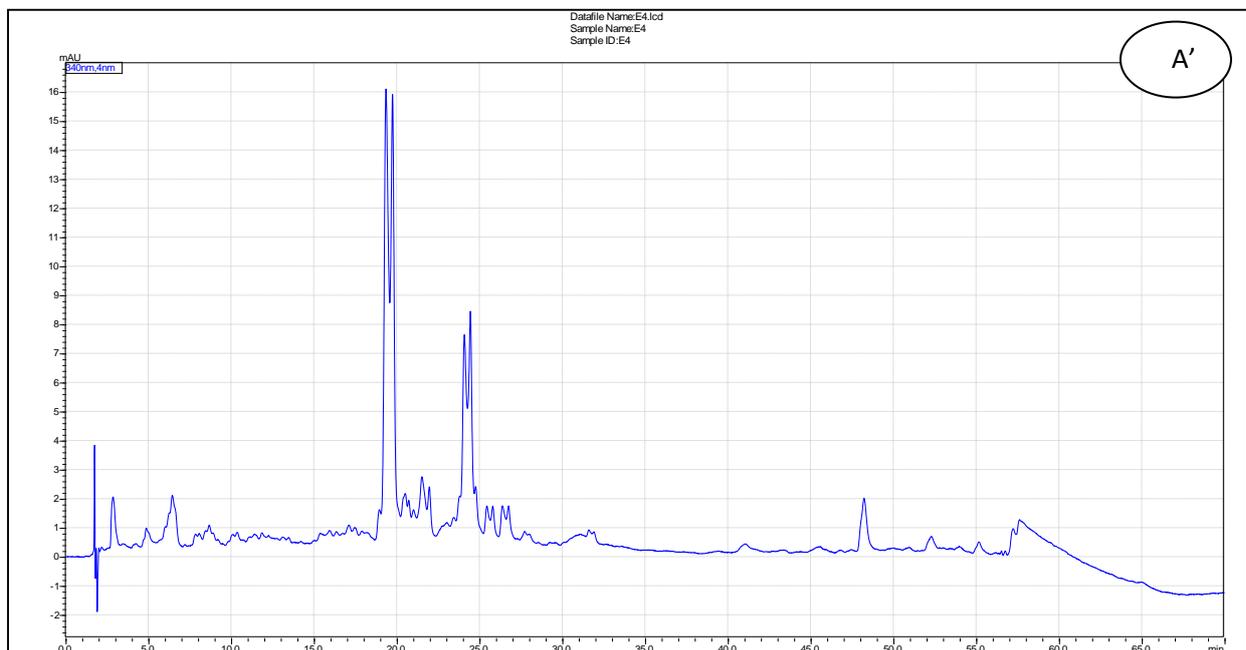
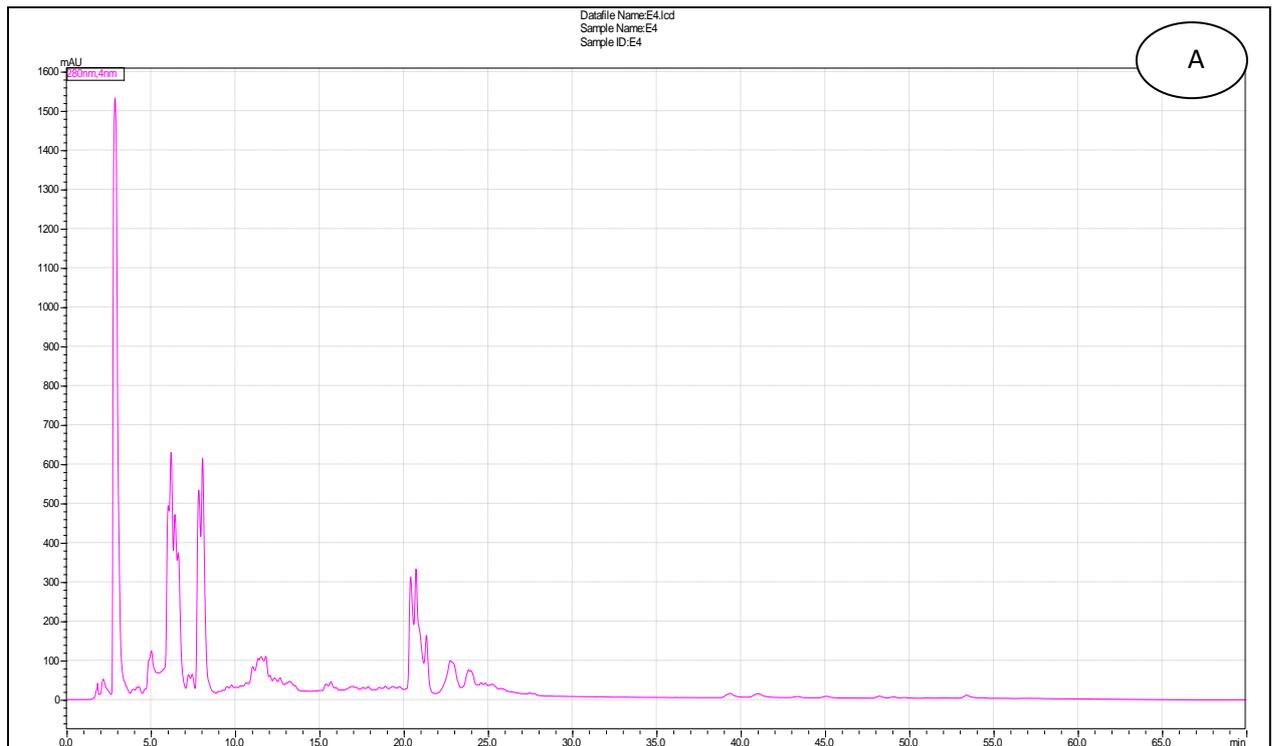
- Orhan, D.D., Özçelik, B. Özgen, S. & Ergun, F., 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 165 (6), 496-504.
- Osadebe, P.O., Okoye, F.B.C., 2003. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 89,1, 19-24.
- Othman, L., Sleiman, A., Abdel-masih, R.M., 2019. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front. Microbiol.* 10, 911.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44, 307–15.
- Parffit, D.E., Badenes, M.L., 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7987–7992.
- Park, D., Park, Y., Lee, Y.H., Choi, I.Y., Park, K.C., Park, S.U., Kim, B.S., Yeoung, Y.R., Park, N.I., 2017. A Comparative study of phenolic antioxidant activity and flavonoid biosynthesis-related gene expression between summer and winter strawberry cultivars. *J. Food Sci.* 82, 341–349.
- Paschapur, S., Patil, M.B., Kumar, R., Patil, S.R., 2009. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. *J Med Plants Res.* 3, 049–054.
- Pawlowska, E., Szczepanska, J., Koskela, A., Kaarniranta, K., Blasiak, J., 2019. Dietary Polyphenols in Age-Related Macular Degeneration: Protection against Oxidative Stress and Beyond. *Oxid Med Cell Longev.* 9682318
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133, 2812–2819.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Centre Nationale de la recherche Scientifique, Paris T2, pp. 611–612.
- Regnier, C., 1954. Tiout, Historical, Geographical and Medical Study. Archive of Institute Pastor, pp. 107–141. T. XXII, 2.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E., 2002. Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 17, 207–218.

- Riaz, U., Kharal, M.A., Murtaza, G., Zaman, Q., Javaid, S., Malik, H.A., Aziz, H., Abbas, Z., 2019. Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress. *A Mini Review*.32, 8–19.
- 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*. *Nat. Prod. Res.* 3, 696–699.
- Rios J.L., Recio M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharm.* 100, 80-84.
- 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. *J. Chem*, 2090-9063.
- Sahreen, S., Khan, M., Khan, R., 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.* 122, 1205–1211.
- Samavati, V., Adeli, M., 2014. Isolation and characterization of hydrophobic compounds from carbohydrate matrix of *Pistacia atlantica*. *Carbohydrate polymers.* 101, 890-896.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247, 1–11.
- Sanchez-Moreno, C., 2002. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Food and Biological Systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* 3, 121-137.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76, 270–276.
- Sandilands, E.A., Bateman D.N., 2016. The epidemiology of poisoning. *Epidemiology.* 40(2), 42-45.
- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Benedetto, R., Filesi, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 43(4), 394-405.
- Schauss, A.G., 2013. Polyphenols and Inflammation. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases.* Chapter 28, 379-392.
- Si, Y.X., Yin, S.J., Oh, S., Wang, Z.J., Ye, S., Yan, L., Yang, J.M., Park, Y.D., Lee, J., Qian, G.Y., 2012. An integrated study of tyrosinase inhibition by rutin: progress using a computational simulation. *J Biomol Struct Dyn.* 29, 999–1012.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.

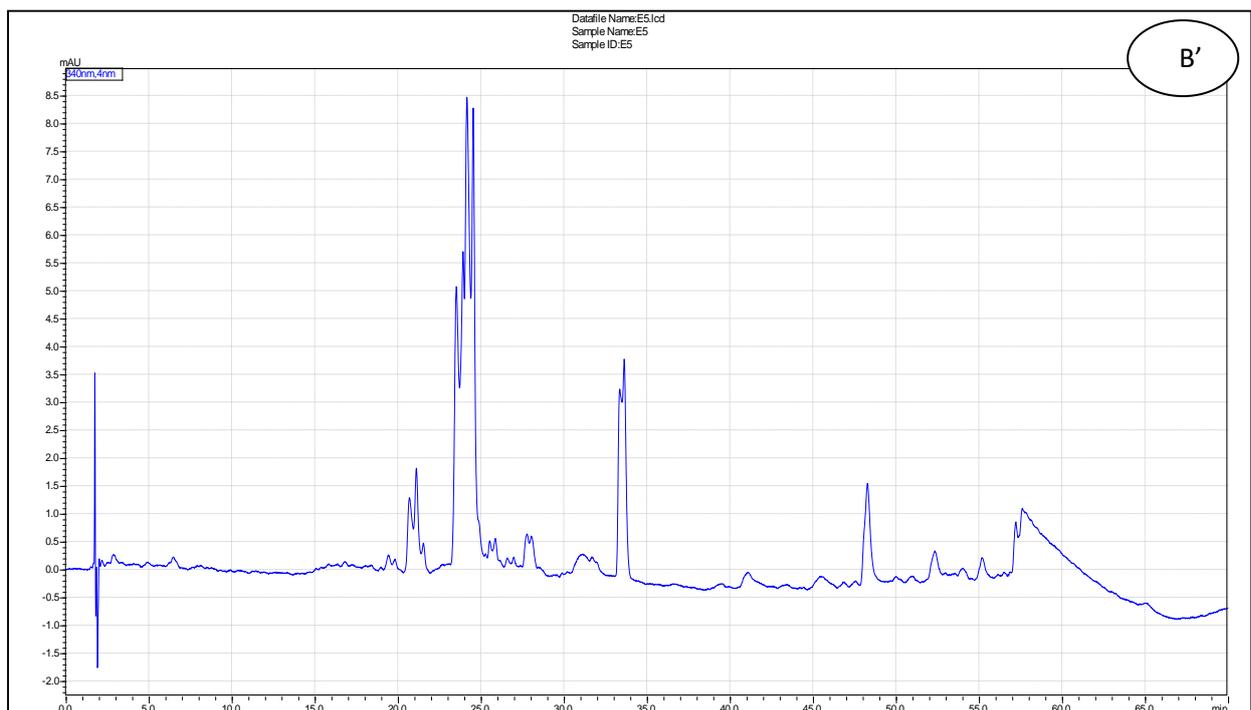
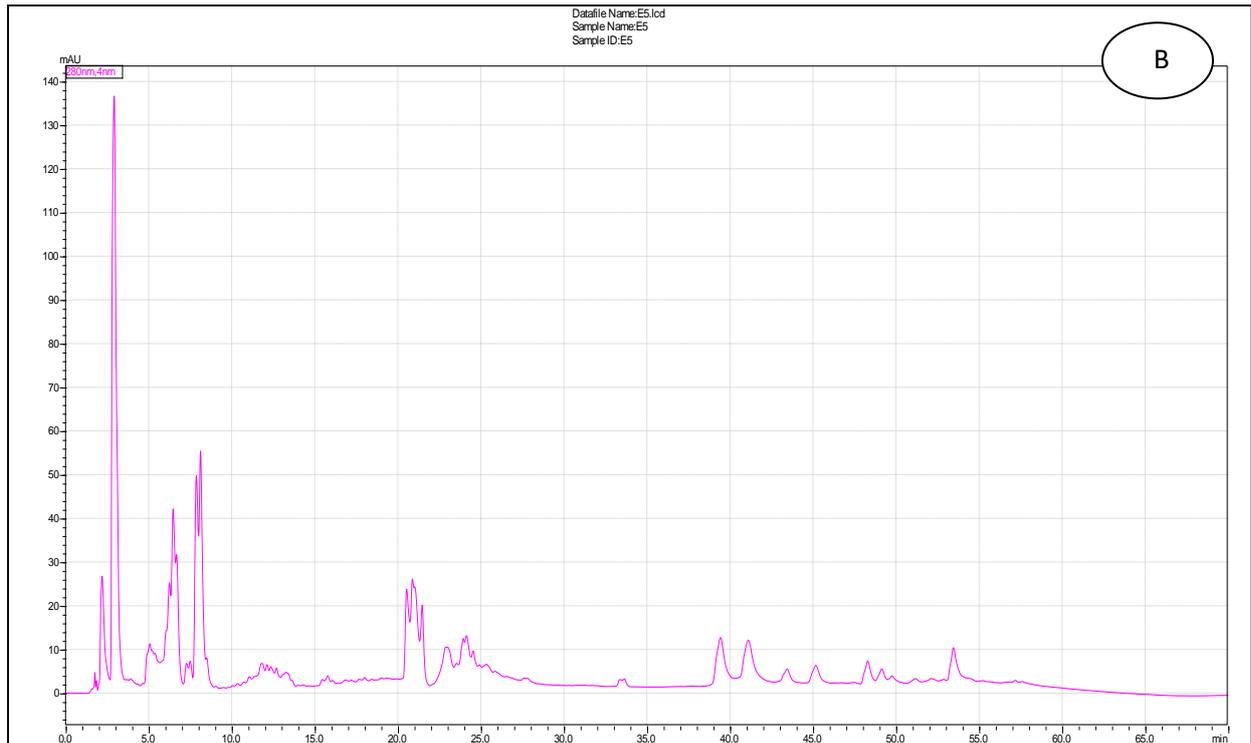
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 41(6),753–8.
- Tavares, L., Pimpao, R., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N., 2013. Elucidating Phytochemical Production in *Juniperus* sp.: Seasonality and Response to Stress Situations. *J Agric Food Chem.* 61, 4044-4052.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Zhang, G., Luo, Y., 2009. Identification and structure–activity relationship of gallotannins separated from *Galla chinensis*. *LWT–Food. Sci. Tech.* 42, 1289–1295.
- 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. *Nat. Prod. Res.* 31 (6), 718–723.
- Toul, F., Belyagoubi-Benhammou, N., Zitouni, A., Ghembaza, N., Atik-Bekkara, F., 2016. *In-vitro* antioxydant effects of tannin extracts of *Pistacia atlantica*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7(1), 1000-06.
- Tréchet, P., Jouzeau, J.Y., 2014. Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Revue française d’allergologie.* 54, 212-217.
- Vansant, G., 2004. Radicaux libres et antioxydant : principe de base. Symposium « Antioxydant et Alimentation ». Institut Danone.
- Velmurugan, B.K., Rathinasamy, B., Lohanathan, B.P., Thiagarajan, V., Weng, C.F., 2018. Neuroprotective role of phytochemicals. *Molecules.* 23(10), 2485.
- Veza, T., Rodríguez-nogales, A., Algieri, F., Utrilla, M.P., Rodríguez-cabezas, M.E., et al., 2016. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease : A Review. *Nutrients.* 8, 1–22.
- Vitali, L.A., Beghelli, D., Nya, P.C.B., Bistoni, O., Cappellacci, L., Damiano, S., Lupidi, G., Maggi, F., Orsomando, G., Papa, F., Petrelli, D., Petrelli, R., Quassinti, L., Sorci, L., Zadeh, M.M., Bramucci, M., 2016. Diverse biological effects of the essential oil from Iranian *Trachyspermum ammi*. *Arabian. J. Chem.* 9, 775–786.
- Wei, T., Sun, H., Zhao, X., Hou, J., Hou, A., Zhao, Q., et al., 2002. Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, *pistafolia A*. *Life Sciences.* 70, 1889–1899.
- Weill, B., Batteux, F., 2003. Immunopathologie et réactions inflammatoires. De Boeck (ED). Bruxelles. 312p.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 111, 544–547.

- Yaaqobi, A., El Hafid, L., Haloui, B., 2009. Etude biologique de *Pistacia atlantica* Desf. de la région orientale du Maroc. *Biomatec Echo*, 3(6), 39-49.
- Yoo, H., Ku, S.K., Baek, Y.D., Bae J.S., 2014. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. *Inflamm Res.* 63, 197–206.
- Yousfi, M., Djeridane, A., Bombarda, I., Hamia, C., 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.
- Yousfi, M., Nedjemi, B., Belal, R., Bombarda, I., Gaydou, E.M., 2005. Triacylglycerol composition of oil from *Pistacia atlantica* fruit growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 93–96.
- Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., Zhang, Y., 2022. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nat. prod. commun.* 17(1).
- Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T., & Xin, W., 2005. Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia*. *Biochim. Biophys Acta.*1725, 103–110.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555–559.
- Zhou, Y., Jiang, Z., Lu, H., Xu, Z., Tong, R., et al., 2019. Recent Advances of Natural Polyphenols Activators for Keap1-Nrf2 Signaling Pathway. *Chem Biodivers.*16(11), e1900400.
- Zohary, M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palest. J. Bot. Jerus. Ser. 5*, 187–228.

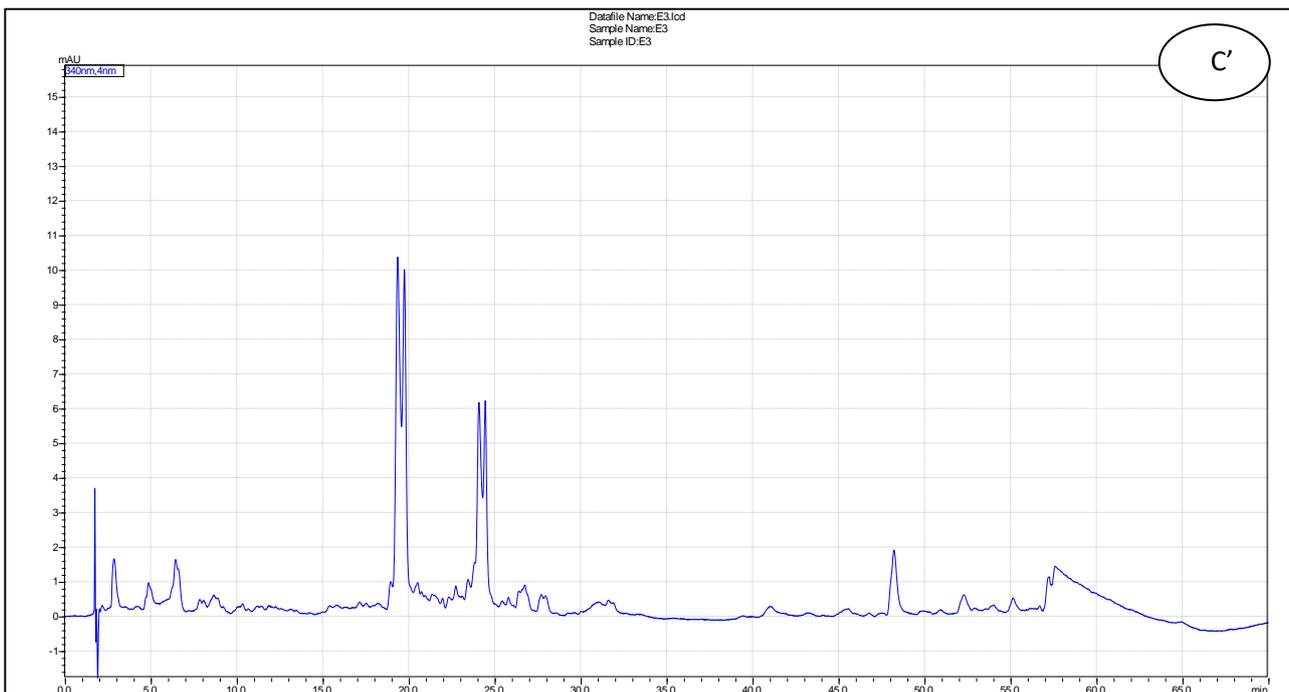
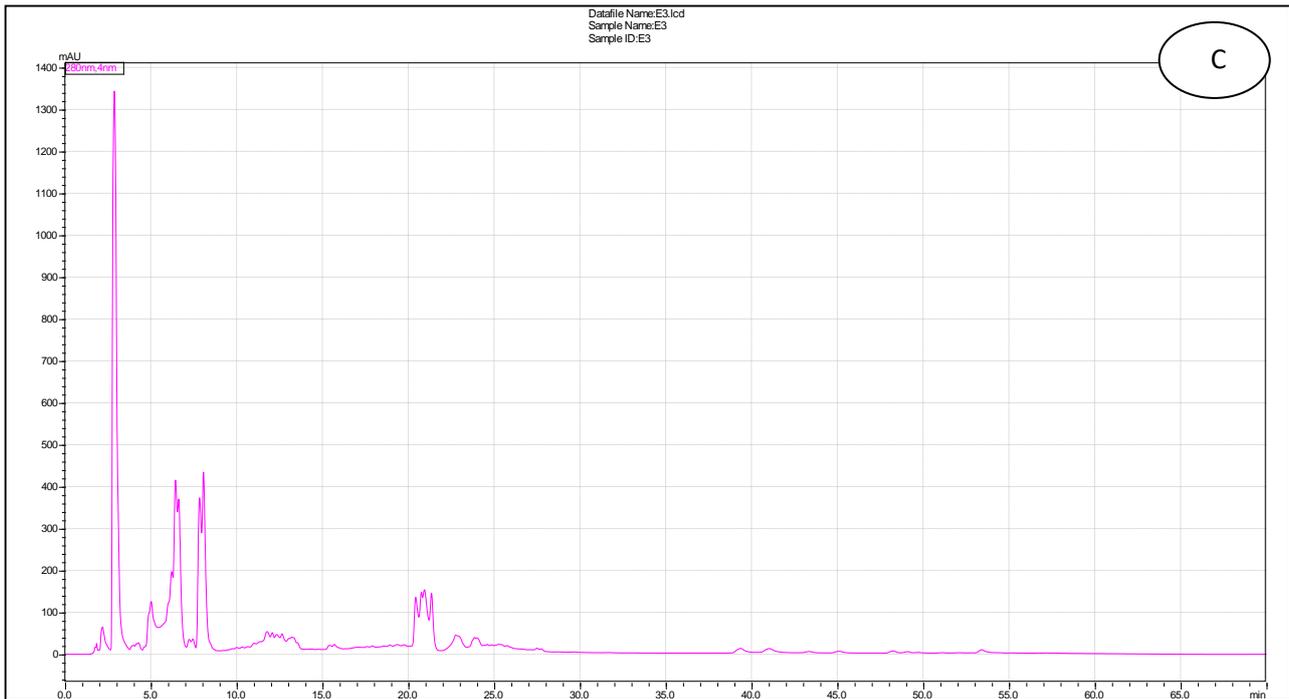
Annexes



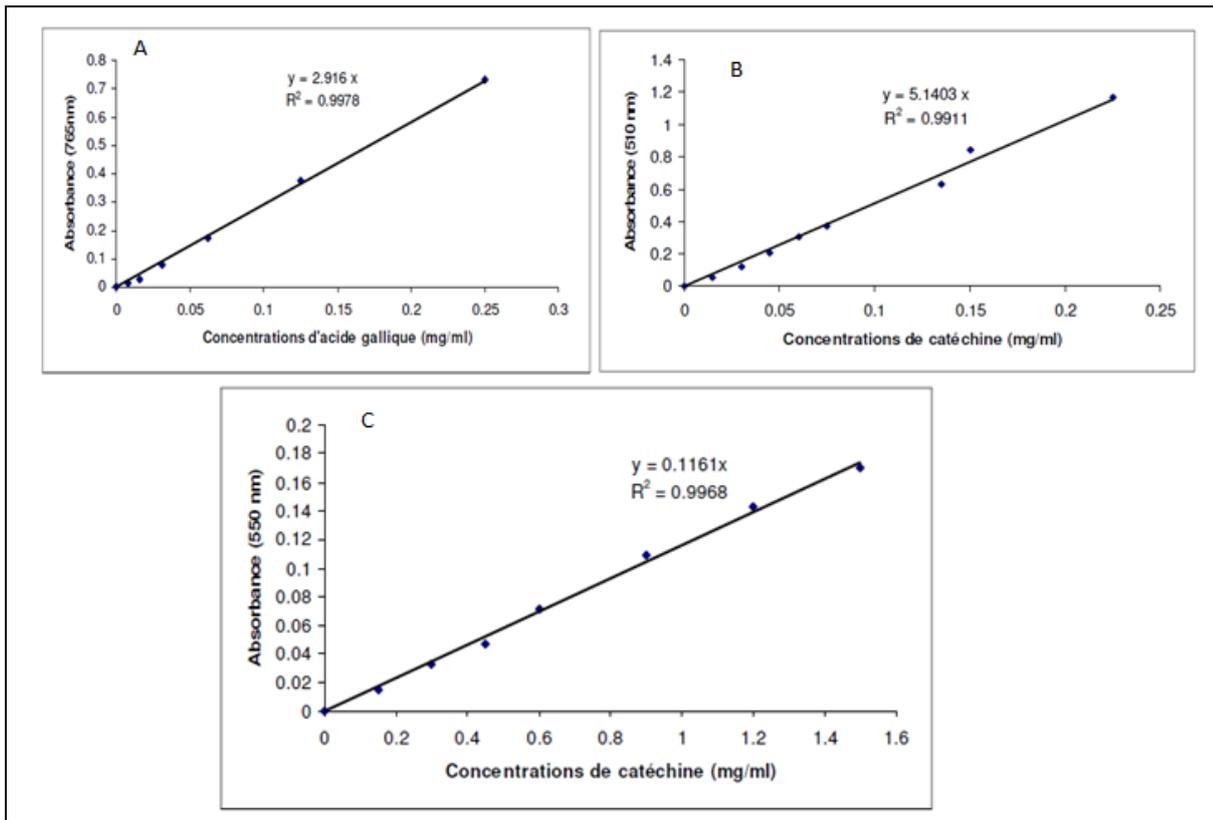
Annexe 1. Chromatogrammes CLHP-DAD de l'extrait des bourgeons foliaire mâle Saf-saf. Des signaux ont été enregistrés à 280 nm (A) et 340 nm (A').



Annexe 2. Chromatogrammes CLHP-DAD de l'extrait des Fruits rouge Oujlida. Des signaux ont été enregistrés à 280 nm (B) et 340 nm (B').



Annexe 3. Chromatogrammes CLHP-DAD de l'extrait des bourgeons foliaire femelled'Ain-fezza. Des signaux ont été enregistrés à 280 nm (C) et 340 nm (C').



Annexe 4. Courbes d'étalonnages : (A) acide gallique pour le dosage des phénols totaux ; (B) La catéchine pour le dosage des flavonoïdes ; (C) La catéchine pour le dosage des tanins

Annexe 5. Composition des milieux de culture**Milieux de culture****Bouillon Mueller-Hinton :**

Infusion de viande de bœuf	2g
Hydrolysate de Caséine.....	17.5g
Amidon	15g
Agar.....	15g
Eau distillée	1000 ml
pH.....	7.3

Gélose Mueller-Hinton :

Infusion de viande de bœuf	2g
Hydrolysate de Caséine.....	17.5g
Amidon	15g
Agar.....	17g
Eau distillée	1000 ml
pH.....	7.3

Bouillon Sabouraud :

Peptone pepsique de viande	10
Glucose	20
Eau distillée	1000 ml
pH.....	5.6

Gélose Sabouraud :

Peptone pepsique de viande	10
Glucose	20
Agar	17
Eau distillée	1000 ml
pH.....	5.6

Annexe 6. Tableaux du Test de Pearson

(A) Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en phénols totaux (PT) des organes étudiés.

Extraits	PT (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	PT (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	PT (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)
Racine	79,035208	0,38092408	12,7976254	Bourgeons	544,821674	0,30754135	29,5224437	Fruits	10,113	0,16170771	15,9021341
	11,200703	0,62562477	3,75131109		283,964906	0,226407779	27,5590256		35,8527663	0,03855616	5,79489265
	19,8473937	0,66587066	6,46		130,932785	0,195610628	9,85223081		29,548754	0,22543608	3,57938937
	26,6495199	0,540356	9,68954913		149,485597	0,287868287	17,2667337		22,9835391	0,14630603	9,89200933
	10,4813957	0,72959917	6,469		448,113855	0,358681095	35,6872231		61,1402606	0,1750537	4,19718732
	26,6503772	0,67976294	11,2475116		565,740741	0,333276793	37,3044074		29,1580933	0,2463212	3,41331849
	58,0418381	0,4562297	24,1400347		537,551	0,343725608	43,644355		23,7671468	0,17647426	12,5029433
	7,43569959	0,38428989	6,20330929		281,578647	0,237789691	16,3983846		23,1207133	0,29951893	3,88937646
	12,6946159	1,33107805	5,87473511		247,290809	0,242704626	21,4946736		12,0130316	0,22578377	1,58143716
	52,1010517	0,32465834	16,8275646		502,1262	0,184214222	33,7489565		20,3589392	0,36439079	10,0256152
	13,44393	0,94801721	6,11126571		770,507545	0,183497116	28,7761058		22,4537037	0,23624206	4,41873408
Test de Pearson (PT/DPPH) : r= -0,542			Test de Pearson (PT/DPPH): r= 0,141			Test de Pearson (PT/DPPH): r= -0,171					
Test de Pearson (PT/CAT) : r= -0,78			Test de Pearson (PT/CAT) : r= 0,74			Test de Pearson (PT/CAT) : r= 0,19					

Annexe

(B) Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH, CAT) et la teneur en flavonoïdes (Flv).

Extraits	FLV (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	FLV (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	FLV (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)
Racine	2.0040355	0.38092408	12.7976254	Bourgeons	1.35179345	0.30754135	29.5224437	Fruits	0.77098883	0.16170771	15.9021341
	0.73050326	0.62562477	3.75131109		1.46670389	0.22640778	27.5590256		0.80278959	0.03855616	5.79489265
	0.75802692	0.66587066	6.46		0.71097877	0.19561063	9.85223081		0.82877054	0.22543608	3.57938937
	0.81891851	0.540356	9.68954913		1.18106843	0.28786829	17.2667337		0.512273	0.14630603	9.89200933
	0.50463299	0.72959917	6.469		1.41124846	0.3586811	35.6872231		0.70116755	0.1750537	4.19718732
	0.87723079	0.67976294	11.2475116		1.92126863	0.33327679	37.3044074		0.86792564	0.2463212	3.41331849
	1.38769174	0.4562297	24.1400347		1.78110369	0.34372561	43.644355		0.78006543	0.17647426	12.5029433
	0.44576567	0.38428989	6.20330929		1.12698428	0.23778969	16.3983846		0.58367779	0.29951893	3.88937646
	0.61418888	1.33107805	5.87473511		0.79619436	0.24270463	21.4946736		0.53475229	0.22578377	1.58143716
	1.12092777	0.32465834	16.8275646		0.92796834	0.18421422	33.7489565		0.38418843	0.36439079	10.0256152
	0.82615041	0.94801721	6.11126571		1.53518653	0.18349712	28.7761058		0.55874978	0.23624206	4.41873408
Test de Pearson (FLV/DPPH) : r= -0.44			Test de Pearson (FLV/DPPH): r= 0.59			Test de Pearson (FLV/DPPH): r= -0.01					
Test de Pearson (FLV/CAT) : r= 0.65			Test de Pearson (FLV/CAT) : r= 0.74			Test de Pearson (FLV/CAT) : r= 0.01					

Annexe

(C) Coefficient de corrélation de Pearson de l'activité antioxydante (DPPH. CAT) et la teneur en tanins condensés (TC).

Extraits	TC (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	TC (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)	Extraits	TC (mg/g)	DPPH (mg/mL)	CAT (mg/g)
Racine	11.2408843	0.38092408	12.7976254	Bourgeons	8.43066322	0.30754135	29.5224437	Fruits	1.28452483	0.16170771	15.9021341
	2.5585702	0.62562477	3.75131109		12.9212604	0.22640778	27.5590256		0.807	0.03855616	5.79489265
	5.80017227	0.66587066	6.46		9.74992822	0.19561063	9.85223081		0.8998708	0.22543608	3.57938937
	7.25523974	0.540356	9.68954913		11.5861326	0.28786829	17.2667337		0.65073213	0.14630603	9.89200933
	0.79636807	0.72959917	6.469		15.2377261	0.3586811	35.6872231		0.49354005	0.1750537	4.19718732
	5.23901809	0.67976294	11.2475116		14.8152455	0.33327679	37.3044074		0.73815676	0.2463212	3.41331849
	7.55684755	0.4562297	24.1400347		16.5374677	0.34372561	43.644355		0.89061154	0.17647426	12.5029433
	2.46296296	0.38428989	6.20330929		14.4455211	0.23778969	16.3983846		0.80663221	0.29951893	3.88937646
	4.31739879	1.33107805	5.87473511		3.77921332	0.24270463	21.4946736		0.37553833	0.22578377	1.58143716
	15.0169394	0.32465834	16.8275646		4.385	0.18421422	33.7489565		1.24289406	0.36439079	10.0256152
4.15719208	0.94801721	6.11126571	3.80476601	0.18349712	28.7761058	0.57924203	0.23624206	4.41873408			
Test de Pearson (TC/DPPH) : r= -0.48			Test de Pearson (TC/DPPH): r= 0.69			Test de Pearson (TC/DPPH): r= 0.44					
Test de Pearson (TC/CAT) : r= 0.65			Test de Pearson (TC/CAT) : r= 0.25			Test de Pearson (TC/CAT) : r= 0.25					

