**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**
**Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou**
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**
**Département de Biologie**

# THESE

En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en Sciences Biologiques
Option : Biologie végétale

***Thème***

# Etude de la variabilité biochimique, physiologique et évaluation des activités biologiques des polyphénols de deux espèces du genre *Pistacia* (*P. lentiscus* L. et *P. atlantica* Desf.)

**Présentée par : CHEHRIT-HACID Fatma**

Soutenue publiquement le 10.07.2016

**Devant le jury :**

| | | |
|---|---|---|
| Mme ALI AHMED SADOUDI Djamila | Présidente | Professeur à UMMTO |
| Mr DERRIDJ Arezki | Directeur de Thèse | Professeur à UMMTO |
| Mme MOULTI-MATI Farida | Co-directrice de Thèse | Professeur à UMMTO |
| Mme ABROUS-BELBACHIR Ouzna | Examinatrice | Professeur à l'USTHB |
| Mme BELHADJ Safia | Examinatrice | Professeur à l'UZAD |
| Mme GACEB-TERRAK Rabea | Examinatrice | Professeur à l'USTHB |

## *Remerciements*

Je remercie vivement mon Directeur de thèse, Monsieur Arezki DERRIDJ, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir accepté de diriger ce travail ; il a toujours su me conseiller et m'encourager durant toute ma formation. Il faudrait un chapitre entier pour expliquer tout ce qu'il m'apporte mais je vais m'attacher à faire court.

Merci infiniment à Madame Farida MOULTI-MATI Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui a accepté de m'encadrer ; elle m'a permis d'accéder au laboratoire LABAB où j'ai réalisé la plus grande partie de ce travail. Elle n'a ménagé aucun effort afin de m'encourager et de me booster.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Abderrahmane MATI, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Biochimie et Biotechnologies. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la disponibilité de l'équipement de ce dernier.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur gentillesse et disponibilité, tout particulièrement Samia CHABI, Hassina et Lamia.

Je remercie Madame Djamila ALI AHMED SADOUDI, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de délibération.

Au Professeur Rabéa GACEB-TERRAK, de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, qui a fait preuve à maintes reprises, d'une très grande patience et disponibilité, j'exprime toute ma gratitude; je l'a remercie également pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma reconnaissance s'adresse aux Professeurs Safia BELHADJ, de l'université Ziane Achor de Djelfa et Ouzna ABROUS-BELBACHIR de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent au Professeur Ferid LIMAM et son équipe du centre de recherche sur les substances bioactives, il m'a accueilli dans son laboratoire sans aucune condition. Il a fait preuve d'une gentillesse et d'une patience très appréciables. Je remercie également tous les membres de son laboratoire pour l'accueil qu'ils m'ont réservé. Je remercie tout particulièrement Rym ESSID, Majdi, Sawssen et Najoua.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mesdemoiselles Henia DAOUDI et Lynda HANNACHI pour leurs discussions scientifiques si pertinentes. C'est grâce à elles que j'ai pu réorienter mon sujet à chaque fois que cela s'imposait.

Je ne saurai oublier Monsieur Djamel MEDJEBEUR, il n'a jamais su me refuser son aide à chaque fois que je l'ai sollicité.

Comme je remercie également Monsieur Boussad METNA et Mademoiselle Samira ALI AHMED pour leur assistance dans le cadre des traitements statistiques et de m'avoir guidée.

Je ne saurais oublier mon époux Hocine qui a toujours été présent depuis l'échantillonnage sur terrain jusqu'aux dernières retouches de la rédaction. Il m'a soutenue et accompagnée dans les moments les plus difficiles où il est aisé de se perdre. Je remercie également mes enfants Imène, Abdelhakim et Amar pour avoir enduré les nombreux moments de mon absence. Imène, tu as été mon bras droit pendant mes stages, toujours présente pour régler tous mes soucis d'informatique e d'anglais; tout simplement merci et que Dieu te bénisse et t'encourage pour tes études.

J'ai laissé mes parents en dernier ; mes remerciements et ma gratitude envers eux ne sont jamais suffisants, je resterais à vie redevable envers eux pour tout ce qu'ils m'ont fait et sans qui, je ne saurais aujourd'hui accomplir ce travail ; que Dieu les bénissent, les protègent de tout les maux. Merci encore à tous les autres membres de ma famille et à tous ceux que je ne cite pas mais que je n'oublie pas pour autant.

A la mémoire de tous les êtres chers que j'ai perdus :

Smaïl, Naïma, Souhila, Abdelkader, Rachid et Soria KHELOUIA OUAZA

## LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| ACP : | Analyse en composante principale |
| Agl : | Aglycones phénoliques |
| Alt : | Altitude |
| AOS : | Aïn Ourassara |
| APX : | Ascorbate peroxidase |
| ANOVA : | Analyse de variance |
| Api+acide gal : | apigénine + acide gallique |
| AsA : | Ascorbate |
| Az : | Azeffoun |
| Car : | Caroténoïdes |
| CAT : | Catalase |
| Chl a: | Chlorophylle |
| Chl b : | Chlorophylle b |
| CP : | Composés phénoliques |
| DHA : | Dehydroascorbate |
| DHAR : | Déshydroascorbate réductase |
| DMSO : | Diméthylsufoxyde |
| DPPH° : | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle |
| EDTA : | Ethyle diamine Tétra-Acétique |
| EGCG : | Epigallocatéchine gallate |
| ERO : | Espèces réactives de l'oxygène |
| FNR : | Ferrédoxine NADPH réductase |
| FTR : | Ferrédoxine thiorédoxine réductase |
| FT : | Flavonoïdes totaux |
| GC-MS : | Chromatographie phase gazeuse liée à la spectrotomètrie de masse |
| GR : | Glutathion réductase |
| GSH : | Forme réduite du glutathion |
| GSSG : | Forme oxydée du glutathion |
| GOH : | Polyphénols |
| $H_2O_2$ : | Peroxyde d'hydrogène |
| $HO^{\circ}$ : | Radical hydroxyle |
| HPLC : | Chromatographie liquide haute performance |
| MDA : | Malondialdéhyde |
| MDHA : | Monodehydroascorbate |
| MLPO : | peroxydation des lipides membranaires |
| MO : | Matière organique |
| MS : | Matière sèche |
| $NO^{\circ}$ : | Monoxyde d'azote |
| $O_2^{\circ}$ : | Anion peroxyde |
| $ONOO^{\circ}$ : | Peroxynitrite |
| OU: | Ouzera |
| PBS : | Solution saline tamponnée phosphate |
| PF : | Poids frais |
| PPT : | Polyphénols totaux |
| ProCat+ Cat : | Protocatéchine + cathéchine |
| PT : | Poids à la pression de turgescence |
| PS : | Poids sec |
| $Q_2$ : | Quotient pluviométrique d'Emberger |

| | |
|---|---|
| RL : | Radicaux libres |
| SB : | Sidi Boutouchent |
| SOD : | Superoxyde dismutase |
| TBA : | Acide thiobarbiturique |
| TCA : | Acide trichloroacétique |
| TEH : | Thniet El Had |
| TH : | Tannins hydrolysables |
| TIZ : | Tarik Ibn Ziad |
| TOH : | Tocophérol |
| tpm : | Tour par minute |
| TRE : | Teneur relative en eau |
| TRX : | Thiorédoxine |
| VC : | Acide ascorbique |

## LISTE DES FIGURES


Figure 1 : Arbre de *Pistacia atlantica ;* Aïn Oussara, juin 2014..... 5
Figure 2 : Distribution de *P. atlantica*..... 5
Figure 3 : Inflorescences de *P. lentiscus* (station Azeffoun) A : inflorescences mâles, B : inflorescences femelles..... 6
Figure 4 : Distribution de *P. lentiscus* L. ..... 7
Figure 5 : Sites de formation du $O_2^{\bullet}$ : (A) le complexe cytochrome b6f la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse, PSII et PSI (B) complexe cytochrome bc1 dans la chaîne respiratoire mitochondriale..... 8
Figure 6 : Lésions oxydatives induites par les ERO ..... 9
Figure 7 : Modèle proposé des trois phases successives de la réponse au stress hydrique.....
Figure8: Voies d'élimination du $H_2O_2$ dans les chloroplastes : voie dépendante de l'acide ascorbique (cycle ASA-GSH; à droite) et voie dépendante de la thiorédoxine (TRX/GPX; à gauche). Fd, ferrédoxine; FNR, ferrédoxine NADPH réductase; FTR : ferrédoxine thiorédoxine réductase; MDAR, MDA réductase... 10
Figure 9 : Facteurs de stress biotiques et abiotiques des plantes..... 14
Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes..... 18
Figure 11 : Structure et voies de synthèse des polyphénols avec quelques exemples de structures. Les flèches indiquent les voies de synthèse..... 19
Figure 12 : Les relations entre le métabolisme primaire et secondaire et le rôle de la proline endogène à stimuler la voie des phénylpropanoïdes ..... 21
Figure 13 : Mécanisme synergique anti-oxydant des polyphénols (GOH), acide ascorbique (VC) et tocophérol (TOH)..... 22
Figure 14 : Piégeage des ERO ($R^{\bullet}$) par les flavonoïdes (FI-OH) et sites de liaisons des ions ($Me^{n+}$) (a) et réaction de Fenton ..... 24
Figure 15 : Cycle de vie de *Leishmania*..... 26
Figure 16 : Structure schématique de la membrane érythrocytaire ..... 27
Figure 17 : Situation géographique des stations d'étude..... 30
Figure 18 : Climagramme des stations d'étude..... 32
Figure 19 : Protocole d'extraction des aglycones phénoliques ..... 35
Figure 20 : Réaction de silylation en utilisant du N, N-bis (triméthylsilyl) trifluoro-acétamide 37
Figure 21 : Structure de DPPH° (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH.. 42
Figure 22 : Profils HPLC des extraits éthanoliques de *P. atlantica* (TEH :Theniat-El- Had, SB : Sidi-Boutouchent, AOS : Aïn-Ouessara)..... 48
Figure 23 : Profils HPLC des extraits éthanoliques de : *P. lentiscus* (AZ: Azeffoun (Tizi-Ouzou), OU : Ouzera (Médéa), TIZ : Tarik-Ibn-Ziad (Tissemsilt)..... 49
Figure 24 : Profils GC-MS des extraits éthanoliques obtenus après hydrolyse acides des composés phénoliques des feuilles des populations de *P. atlantica* (TEH : Thniet El- Had, SB : Sidi Boutouchent, AOS : Aïn Oussara)..... 53
Figure 25 : Profils GC-MS des extraits éthanoliques obtenus après hydrolyse acide des composés phénoliques des feuilles de *P. lentiscus* (AZ : Azeffoun, OU : Ouzera (Médéa), TIZ : Tarik Ibn Ziad)..... 54

Figure 26 : Représentation graphique des teneurs en principaux composés phénoliques identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques des feuilles des populations de *P. atlantica* et *P. lentiscus*. ..... 58
Figure 27 : Teneurs en polyphénols totaux (PPT) (A), en flavonoïdes totaux (FT) (B), en tannins hydrolysables (TH) (C) des extraits éthanoliques et en aglycones phénoliques des extraits éthérés (D) des populations de *P. atlantica* et *P. lentiscus*. ..... 59
Figure 28 : Analyse en composante principale des *P. atlantica* et de *P. lentiscus* projection des variables..... 62
Figure 29 : Analyse en composante principale des PPT, FT, TT et Agl des populations *P. atlantica* et de *P. lentiscus* projection des stations..... 63
Figure 30 : plantules de *P. lentiscus* âgées de 7 mois à la fin du stress hydrique (AT : plantules témoins provenant d'Azazga ; AS : plantules stressées provenant d'Azazga ; BT : plantules témoins provenant de Bouira ; BS : plantules stressées provenant de Bouira ..... 64
Figure 31 : Variations dans la TRE (%) de deux populations de *P. lentiscus* sous l'effet du stress hydrique..... 65
Figure 32 : Variations dans les teneurs en proline (µg/g MF) chez deux populations de *P. lentiscus* sous l'effet du stress hydrique ..... 66
Figure 33 : Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en pigments (µg/g MF) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. lentiscus*. ..... 67
Figure 34 : Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en MDA (nmol/ml) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. Lentiscus*. ..... 69
Figure 35 : Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en FT et en PPT (mg/g MS) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. lentiscus*. ..... 70
Figure 36 : Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des PPT et des Agl de la drupe et des feuilles de *P. lentiscus* à différentes concentrations..... 72
Figure 37 : Pourcentage de DPPH$^{\bullet}$ résiduel à différentes concentrations des Agl et des PPT des feuilles en fonction du temps (min)..... 74
Figure 38 : Pourcentage de DPPH$^{\bullet}$ résiduel à différentes concentrations des Agl (A) et des PPT de la dupe (B) en fonction du temps (min) ..... 74
Figure 39 : Pourcentage de DPPH$^{\bullet}$ résiduel à différentes concentrations de kaempférol et de la rutine en fonction du temps (min)..... 74
Figure 40 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par les PPT et les Agl des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus* ..... 76
Figure 41 : Inhibition de la croissance de *L. major* (LCO3) et *L. infantum* (LV20) à différentes concentrations de PPT et d'Agl de *P. atlantica*, de *P. lentiscus* et d'Amphotérine B ..... 79

Liste des tableaux

Tableau I. Classification des catalases des plantes, lettres romaines…… 12
Tableau II. Structure des différentes classes de polyphénols ……..……. 17
Tableau III. Principales coordonnées géographiques et climatiques des stations d'étude…….. 31
Tableau IV. Gradient d'élution pour l'analyse HPLC.…… 36
Tableau V. Caractéristiques biochimiques des sols étudiés.…… 46
Tableau VI. Composés phénoliques révélés et identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques de *P. atlantica* et de *P. lentiscus*…… 50
Tableau VII. Aglycones phénoliques identifiés dans les extraits éthérés de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* par GC-MS…… 55
Tableau VIII. Concentrations (mg/ml) des principaux composés identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques des feuilles des populations de *P. atlantica* et *P. lentiscus*…… 57
Tableau IX. Matrice des corrélations entre variables …… 61
Tableau X. IC50 des différents extraits des PPT et des Agl des feuilles et du fruit de *P. lentiscus*…… 76
Tableau XI : Activité anti-leishmaniale (IC50 ± SD) et activité cytotoxique (CL50 ± SD) des PPT et Agl de *P. atlantica,P. lentiscus* et de l'amphotéricine B…… 78
Tableau XII : Activité cytotoxique (CL50 ± SD) des PPT et Agl de *P. atlantica, P. lentiscus* et de l'amphotéricine B…… 92

## Résumé :

La synthèse de composés phénoliques est l'une des stratégies utilisées par certaines plantes dans les mécanismes biochimiques de défense et de lutte contre divers stress biotiques et abiotiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier la variabilité phénolique chez deux espèces de pistachier, *P. lentiscus* et *P. atlantica,* en relation avec les facteurs environnementaux et quelques activités biologiques de leurs polyphénols. Par ailleurs, afin de mieux cerner le comportement de *P. lentiscus* vis-à-vis de la contrainte hydrique, une étude, en conditions expérimentales a été également menée.

Les résultats obtenus ont montré la présence de quantités élevées de polyphénols dans les feuilles des deux espèces traduisant une variabilité inter et intra spécifique, ce qui suggère la présence de plusieurs chémotypes. *P. atlantica* s'est avéré qualitativement et quantitativement plus riche et relativement plus homogène que *P. lentiscus.*

L'identification des composés phénoliques des extraits éthérés foliaires obtenus après hydrolyse acide, par chromatographie en phase gazeuse, a révélé la présence de substances spécifiques comme le phloroglucinol (régulateur de croissance et stimulateur de la prolifération des pousses axillaires) détecté seulement chez *P. lentiscus* mais pas chez *P. atlantica*, espèce arboréscente.

L'étude de l'effet du stress hydrique sur le comportement de *P. lentiscus* en conditions expérimentales, a mis en évidence une bonne tolérance de cette espèce à la sécheresse : la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes présente des différences non significatives entre les lots témoins et les lots stressés.

L'activité biologique des extraits ethanoliques et des aglycones phénoliques des feuilles et des drupes de *P. lentiscus* a montré que les polyphénols totaux présentent globalement de meilleures activités anti-oxydantes et une meilleure protection hémolytique que leurs homologues aglycones, les extraits de feuilles étant également plus efficaces que ceux des drupes.

Concernant l'activité anti-leishmanienne des polyphénols totaux et des aglycones de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* vis-à-vis du promastigote de *Leishmania donovani* et *L. infantum*, ces polyphénols, notamment les aglycones, se sont avérés très efficaces avec un bon indice de sélectivité, contre ces deux pathogènes.



**Mots clé :** *P. atlantica* Desf, *P. lentiscus* L.**,** polyphénols, variabilité phénolique, contrainte hydrique, protection hémolytique, activité anti-leishmanienne.

**Summary :**

The synthesis of phenolic compounds is one of the strategies used by some plants in the biochemical mechanisms of defense and fight against various biotic and abiotic stresses.

The objective of this work is to study the phenolic variability in two species of pistachio, *P. lentiscus* and *P. atlantica,* in relation to environmental factors and some biological activities of their polyphenols. Furthermore, to better understand the behavior of *P. lentiscus* under drought stress, a study in experimental conditions was also conducted.

The results analyzed by high performance liquid chromatography, showed the presence of high amounts of polyphenols in the leaves of both species reflecting inter and intra-specific variability, suggesting the presence of several chemotypes. *P. atlantica* proved qualitatively and quantitatively relatively more opulent and homogeneous than *P. lentiscus*

Identification of foliar ether phenolic compound extracts obtained after acid hydrolysis, by gas chromatography, showed the presence of specific substances such as phloroglucinol (growth regulator and stimulator of axillary shoot proliferation), only in *P. lentiscus* while it is absent in *P. atlantica.*

The study of the effect of drought stress on the behavior of *P. lentiscus* in experimental conditions, showed good tolerance of this species to drought: the quantification of total polyphenols and flavonoids present no significant differences between control and stressed lots.

The study of the biological activity of ethanolic extracts and phenolic aglycons of leaves and drupes of *P. lentiscus* showed that total polyphenols generally exhibit better antioxidant activities and better protection hemolytic their aglycones counterparts, the foliar extracts being also more effective than those in drupes.

About antileishmanial activity of the two species of total polyphenols and phenolic aglycons against the promastigote of *Leishmania donovani* and *L. infantum,* these polyphenols especially aglycones have proven very effective with a good selectivity index against these two pathogens.

**Keywords**: *P. atlantica* Desf, *P. lentiscus* L., polyphenols, phenolic variability, phenolic aglycons, drought stress, anti-hemolytic protection, anti-Leishmanial activity

# Table des matières

**LISTE DES ABREVIATIONS** **I**
**LISTE DES FIGURES** **III**
**LISTE DES TABLEAUX** **V**
**RESUME** **VI**

**Introduction générale** 1

**Première partie : Synthèse bibliographique**

I. Généralités sur *Pistacia atlantica Desf* et *P. lentiscus* L..... 3
1. Introduction..... 3
2. Position systématique ..... 3
3. Biologie et distribution des deux espèces..... 3
3.1. *Pistacia atlantica* ..... 3
3.2. *Pistacia lentiscu*s..... 5
II. Le stress oxydant et systèmes antioxydants..... 8
1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène..... 8
2. Mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène..... 9
2.1. Mécanismes enzymatiques……..……..... 10
2.2. Mécanismes non enzymatiques……..…….. 12
3. Facteurs de stress environnementaux et réaction de la plante……..... 13

3. Généralités sur les polyphénols..... 16
1. Caractérisation structurale..... 16
2. Classification..... 16
3. Biosynthèse des polyphénols..... 18
4. Propriétés écologiques et physiologiques des polyphénols..... 19
4.1. Stress environnementaux et synthèse de polyphénols……..... 20
4.2. Régénération et synergisme……. 21
4.3. Propriétés biologiques des polyphénols..... 22
4.3.1. Propriétés antioxydantes…… 23
4.3.2. Propriétés pro-oxydantes..... 24
4.3.3. Propriété antiparasitaire (anti-leishmanienne)..... 25
4.3.3.1. Distribution de la maladie..... 25
4.3.3.2. Le parasite et son cycle de vie..... 25
4.3.3.3. Traitement de la leishmaniose…….. 26
4.3.4. Propriété anti-hémolytique..... 27
4.3.4.1. Organisation du globule rouge et stress oxydant……. 27
4.3.4.2. Protection anti-hémolytique des polyphénols…..... 28
5. Les polyphénols de *P. atlantica* et *P. lentiscus* ……..... 28

**Deuxième partie : Partie expérimentale**


I. **Matériel et méthodes**..... 30

1. Etude des polyphénols chez *P. atlantica* et *P. lentiscus in situ*..... 30

1.1. Présentation des stations d'échantillonnage..... 30

1.1.1. Données climatiques et coordonnées géographiques..... 31

1.1.2. Caractéristiques pédologiques..... 32

1.1.2.1. Mesure du pH du sol..... 33

1.1.2.2. Dosage de la matière organique..... 33

1.1.2.3. Dosage du calcaire total..... 33

1.1.3. Echantillonnage du matériel végétal ..... 33

1.2. Extraction des polyphénols..... 34

1.1.2.1. Extraction des polyphénols totaux ..... 34

1.1.2.2. Extraction des aglycones phénoliques ..... 34

1.3. Analyse qualitative des polyphénols ..... 36

1.3.1. Analyse des polyphénols par HPLC..... 36

1.3.2. Analyse des aglycones phénoliques par GC-MS..... 36

1.4. Analyse quantitative..... 37

1.4.1. Dosage des polyphénols totaux..... 37

1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux ..... 38

1.4.3. Dosage des Aglycones flavoniques..... 38

1.4.4. Dosage des tannins hydrolysables ..... 38

2. Effets de la contrainte hydrique sur certains paramètres biochimiques et physiologiques des semis de *P. lentiscus* ..... 38

2.1. Matériel végétal et conditions de culture..... 38

2.2. Mesure de la teneur relative en eau ..... 39

2.3. Extraction et dosage de la proline ..... 39

2.4. Dosage des pigments chlorophylliens ..... 40

2.5. Mesure de la peroxydation lipidique..... 40

3. Activités biologiques des polyphénols ..... 41

3.1. Propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes extraits des feuilles et des fruits de *P. lentiscus*..... 41

3.1.1. Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium ..... 41

3.1.2. Activité anti-radicalaire..... 41

3.1.3. Activité anti hémolytique..... 42

3.1.3.1. Principe..... 42

3.1.3.2. Matériel biologique ..... 43

3.2. Activité anti-leishmanienne des polyphénols de P. *atlantica* et *de P. lentiscus*..... 43

3.2.1. Culture du parasite..... 44

3.2.2. Test anti-promastigote..... 44

3.2.3. Mesure de viabilité cellulaire..... 44

3.2.3.1. Principe de la réaction..... 44

3.2.3.2. Mode opératoire..... 44

3.2.4. Test de cytotoxicité et index de sélectivité des polyphénols totaux et des aglycones phénoliques et flavoniques ..... 45

4. Analyses statistiques..... 45

**II : Résultats et discussion**


1. Caractéristiques pédologiques des stations d'étude…… 46
2. Variabilité phénolique chez *P. atlantica* et *P. lentiscus*..... 47
2.1. Variabilité qualitative..... 47
2.2. Variabilité quantitative ..... 56
2.2.1. Les principaux composés identifiés par HPLC..... 56
2.2.2. Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux, des tannins hydrolysables et des Aglycones phénoliques..... 58
3. Effets de la contrainte hydrique sur quelques caractères physiologiques et biochimiques des semis de *P. lentiscus*..... 64
3.1. Teneur Relative en eau..... 65
3.2. Teneurs en proline ..... 66
3.3. Teneurs en pigments ..... 67
3.4. Peroxydation lipidique ..... 68
3.5. Teneurs en polyphénols..... 70
4. Activité biologiques des polyphénols de *P. atlantica* et de *P. lentiscus*..... 71
4.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols extraits des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus*..... 71
4.1.1. Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium…….. 71
4.1.2. Activité anti radicalaire..... 72
4.1.3. Activité anti-hémolytique……..… 75
4.2. Activité anti-léishmanienne des extraits de *P. atlantica* et de *P. lentiscus*……... 77
4.2. 1. Activité anti-promastigote..... 77
4.2.2. Cytotoxicité et index de sélectivité des polyphénols totaux et des aglycones Phénoliques..... 80

**Conclusion générale et perspectives..... 82**
**Références bibliographiques..... 85**

# *Introduction générale*

## Introduction générale :

Les régions du bassin méditerranéen se distinguent par des étés chauds, ensoleillés et secs, et des hivers plus humides et plus doux ; ce qui leur confère une grande variabilité à la fois temporelle et spatiale. Cette particularité du climat, en raison de sa localisation dans une zone de transition entre les vents tempérés de l'ouest et les hautes pressions subtropicales (Rohling *et al*., 2013), fait de l'Algérie tout comme la région méditerranéenne l'une des zones les plus affectées par le changement climatique (Güçlü, 2014).

Malgré une biodiversité remarquable avec environ 25 000 espèces végétales natives dont plus de 50 % sont endémiques (Cuttelod *et al*., 2008), le nombre d'espèces menacées d'extinction dépasse de loin les ressources disponibles de la conservation, ce qui situe ces régions parmi les 25 premiers « hot spots » (Myers *et al*., 2000). Ainsi le problème crucial qui se pose par rapport au défit climatique et socio-économique se rapporte au choix d'espèces appropriées à la restauration des terres.

Ce choix doit tenir compte de la végétation naturelle rustique qui est dominée par les arbustes et arbres ligneux sclérophylles ou malacophylles pouvant supporter de longues et sèches périodes d'été (Flexas *et al*., 2014).

C'est dans ce contexte que notre étude s'est portée sur deux espèces : *P. lentiscus*, arbuste sclérophylle à feuilles persistantes (Munne-Bosch et Penuelas, 2003) et *P. atlantica*, espèce caducifoliée, appartenant au genre *Pistacia* largement distribuées dans les régions méditerranéennes (Correia et Diaz Barradas, 2000 ; Quezel et Medail, 2003).

*P. lentiscus* est non seulement résistant à la sécheresse mais se régénère rapidement après un incendie (Barazani *et al*., 2003) alors que *P. atlantica* grâce à ses racines profondes et son tissu foliaire palissadique est bien adapté aux régions très rigoureuses avec de faibles pluviométries (Lin *et al*., 1084 *in* Al-Saghir *et al*., 2005).

L'adaptation de ces espèces aux diverses conditions de stress peuvent être morphologiques (Al-Saghir et Porter, 2005 ; Belhadj *et al*., 2008 ; Belhadj, 2011), anatomiques (Aït Saïd et *al*., 2011 b) ou biochimiques (Aït Saïd *et al*., 2009 *in* Aït Saïd, 2011).

Les métabolites secondaires en général et les polyphénols en particulier sont impliqués dans les mécanismes biochimiques de défense et de lutte contre divers stress biotiques et abiotiques (Ramakrishna et Ravishankar, 2011). En effet, la production de composés phénoliques est l'une des stratégies utilisées par certaines plantes dans les conditions environnementales défavorables telles que la sécheresse et la salinité (Reginato *et al*., 2014).

Les flavonoïdes par leur capacité à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO), jouent un rôle important de photo-protecteurs (Agati *et al*., 2013). Cette particularité liée aux caractéristiques physico-chimiques des polyphénols pourrait être utilisée comme indicateurs de la vigueur du végétal, d'où l'objectif de leur étude.

L'utilisation des polyphénols comme marqueurs dans l'étude de stratégie adaptative est l'une des pistes de notre étude de *P. lentiscus* et *P. atlantica,* sans oublier toutes les activités biologiques qui découlent de leurs propriétés antioxydantes. A titre d'exemple, de nombreux travaux ont démontré leur efficacité contre les affections virales (Serkedjieva *et al*., 2010) et bactériennes (Palombo, 2009).

Ainsi dans ce contexte général, notre travail présente un double objectif :

- Un objectif écophysiologique par une étude comparative de la variabilité phénolique des feuilles de *P. atlantica* et *P. lentiscus* en relation avec les facteurs environnementaux, l'identification et la quantification de différentes classes de composés phénoliques retrouvés dans les deux espèces nous permettront de comprendre leurs éventuels rôles écologiques chez ces espèces.
- Un deuxième objectif plutôt biochimique au sens strict est de mettre en relief quelques activités biologiques de ces polyphénols comme les activités anti-oxydantes, le pouvoir réducteur, l'activité anti-parasitaire contre le promastigote de *Leishmania*.

La démarche utilisée dans ce travail se présente comme suit :

Dans la première partie de ce manuscrit, nous présentons une synthèse bibliographique où sont relatés :

- Les caractéristiques générales de *P. atlantica* et *P. lentiscus.*
- Le stress oxydant et les systèmes anti-oxydants
- Les polyphénols

La deuxième partie, expérimentale, est consacrée aux différentes méthodes utilisées (échantillonnage, extraction, identification par HPLC et GC-MS, dosages spéctrophotométriques, activités anti-oxydantes, anti-hémolytique, anti-leishmanienne) et à l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion détaillée.

Ces résultats et leur discussion sont répartis en trois axes principaux :

- Etude comparative qualitative et quantitative des polyphénols chez les deux espèces
- Effets de la contrainte hydrique sur certains paramètres biochimiques et physiologiques des semis de *P. lentiscus*
- Activité biologiques des polyphénols de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* où sont relatés les résultats des activités anti-oxydante et anti-hémolytique des extraits de feuilles et de drupes de *P. lentiscus* ainsi que l'efficacité anti-parasitaire des polyphénols totaux et des aglycones phénoliques sur les promastigotes de deux souches de *Leishmania* (*L. unfantum* et *L. major*).

Nous terminons par une conclusion générale et des perspectives.

# *Première partie : Synthèse bibliographique*

# 1. Généralités sur *Pistacia atlantica* Desf. et *Pistacia lentiscus* L. :

## 1.1. Introduction :

*Pistacia* L. de la famille des Anacardiaceae a été caractérisé par Zohary (1952). En se basant sur les caractères morphologiques des feuilles et du fruit, cet auteur a distingué 11 espèces réparties en 4 sections (Lentiscella Zoh, Eu-Lentiscus, Butmela Zoh. et Eu-Terebinthus Zoh).

Actuellement, cette classification suscite des questions quant au statut de certaines espèces et la subdivision du genre en 4 sections (Al-Saghir et Porter, 2012). Parfitt et Badenes (1997) ont subdivisé le genre en deux sections (Terebinthus et lentiscus) sur la base de profils d'ADN des chloroplastes. Les résultats de l'analyse phylogénétique de Kafkas et Perl-Traves (2001 et 2002) ont également abouti à deux grands groupes. C'est aussi le cas de Katsiotis *et al.* (2003) utilisant les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et les AFLP (amplified fragment-length polymorphism) qui ont séparé le genre en deux groupes : l'un contenant les espèces à feuillage persistant et le second les caducifoliées.

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *P. lentiscus, P. terebinthus, P. atlantica* et *P. vera* (Zohary, 1952). Quezel et Santa (1963) signalent la présence de *P. Saportae* Burnat, semblable à *P. Lentiscus* mais à feuilles imparipennées et à inflorescences en grappe rameuse**.**

## 1.2. Position systématique :

Le genre *Pistacia* est classé, selon Fennane et *al.* (2007) *in* Yaaqobi *et al.* (2009) comme suit :

| | |
|---|---|
| Règne : | Planteae |
| Embranchement : | Tracheophyta |
| Classe: | Magnoliopsida |
| Ordre : | Sapindales |
| Famille : | Anacardiaceae |
| Genre : | *Pistacia* |
| Espèces : | - *P. atlantica*<br>- *P. lentiscus* |

## 1.3. Biologie et distribution des deux espèces :

### 1.3.1. *Pistacia atlantica:*

*P. atlantica* nommé Elbetoum, Botma, Betouma ou Btouma en Arabe et Iggh en Berbère (Benabderrahmane *et al.,* 2009), est un arbre à couvert dense (figure 1), de 5 à 20 m de hauteur selon les conditions éco-géographiques (Spichiger *et al.,* 2002). Le diamètre du tronc dépasse parfois 1 m et l'écorce présente des fissures longitudinales. Les feuilles sont caduques, sessiles et imparipennées avec 7 à 11 folioles entières lancéolées similaires à celles de *P. lentiscus,* de 2,6 cm de longueur sur 0,5 à 1,5 cm de largeur. Leur couleur varie du vert

foncé sur la face supérieure au vert clair sur la face inférieure. Les caractères morphologiques de l'espèce sont très variables, menant à la confusion taxonomique (El Zerey-Belaskri et Benhassain, 2015).

Les fleurs sont unisexuées; de couleur rose ; la floraison a lieu avant le développement végétatif. Les fleurs mâles sont groupées en inflorescences composées. Elles ont tendance à fleurir avant les fleurs femelles (protandrie) (Spichiger *et al.*, 2002 ; Rezaeyan *et al.*, 2009).

*P. atlantica* est l'une des espèces sauvages les plus répandues du genre. Il a occupé la région méditerranéenne depuis les périodes climatiques sèches et froides du Miocène. Son aire de distribution (figure 2) est préférentiellement l'Afrique du Nord où il constitue les steppes arborées du bioclimat aride mais également les iles Canaries, la Lybie, Chypre et le Proche-Orient (Zohary, 1952 ; Quezel et Médail, 2003).

En Algérie, *P. atlantica* est répandu dans les régions arides et semi arides où il prospère dans les lits d'oueds et les Dayas ainsi que dans le Hoggar et dans l'Atlas à l'exception des zones très arrosées (Quézel et Santa, 1963; Harfouche *et al.*, 2005). Il fait partie des essences forestières en déclin (Belhadj *et al.*, 2008). De par sa dioécie, *P. atlantica* est doté d'une hétérozygotie élevée lui procurant une grande rusticité ; il peut de ce fait, s'avérer précieux pour le reboisement et la reforestation des lieux fortement dégradés des régions méditerranéennes arides et semi-arides (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004 ; Harfouche *et al.*, 2005 ; Belhadj *et al.*, 2008 ; Benaradj *et al.*, 2015). C'est pour cette raison qu'il a été largement utilisé dans le programme de lutte contre la désertification à Djelfa (Nahal, 2004). Par ailleurs, Benhassaini *et al.* (2012) ont montré que les plantules de *P. atlantica* tolèrent bien les concentrations élevées en sel, ce qui confère à cette espèce, un potentiel adaptatif élevé au stress salin.

**Figure 1 : Arbre de *Pistacia atlantica ;* Aïn Oussara, juin 2014.**

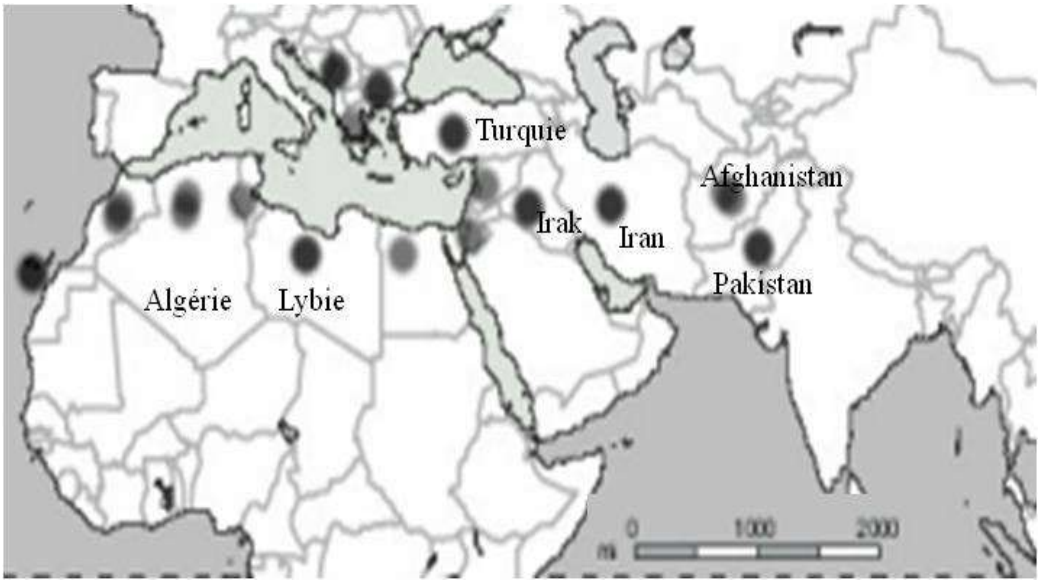



**Figure 2 : Distribution de *P. atlantica* Desf. (Al-Saghir, 2006 modifié).**

### 1.3.2. *Pistacia lentiscus* L. *:*

Le pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.), nommé amadaγ, imidekh ou tidikth en berbère et dharw ou derou en arabe, est également connu sous le nom « Arbre à mastic» (Spichiger *et al.*, 2002). C'est un arbuste buissonnant sclérophylle et dioïque. Sa hauteur est de 5 à 6 m mais peut atteindre 8 m dans certaines conditions (Flexas *et al.*, 2001).

Les feuilles de *P. lentiscus* sont persistantes, alternes, paripennées, vert foncé luisantes dessus, plus pâles et mâtes dessous, prenant en hiver une teinte pourprée (Brosse, 2005). Elles sont composées de 4 à 10 folioles oblongue-lancéolées, disposées asymétriquement sur un rachis bordé d'une aile verte, de deux à quatre centimètres de longueur sur cinq à dix millimètres de largeur (Quezel et Santa, 1963 ; Bossard et Cuisance, 1984; Benabid, 2000). Le lentisque fleurit entre mars et avril produisant des inflorescences sous forme de grappes spiciformes, rameuses, denses et courtes qui naissent à l'aisselle d'une feuille (figure 3) (Gaussen *et al.,* 1982).

**Figure 3 : Inflorescences de *P. lentiscus* (station Azeffoun, 2012) A : inflorescences mâles, B : inflorescences femelles.**

Grâce à sa variabilité morphologique et biochimique et son polymorphisme génétique (Barazani *et al.,* 2003), on rencontre *P. lentiscus* dans une grande variété d'écosystèmes méditerranéens (figure 4) (Correia et Barradas, 2000). Il constitue une mosaïque d'habitats de grand intérêt par la diversité des niches écologiques offertes aux espèces végétales et animales (Ozenda, 1977). Le lentisque est une espèce très peu inflammable (Vasques *et al.,* 2015) et dotée d'une capacité de régénération élevée par production de rejets (Bussotti *et al.,* 2005) d'où son grand intérêt et son adéquation pour la restauration écologique des écosystèmes vulnérables aux incendies (Vasques *et al.,* 2015). Parallèlement cette espèce joue un rôle fondamental dans l'entretien des écosystèmes par sa forte résistance aux changements climatiques ; elle s'accroche, en effet, sur les pentes rudes et les terrains rocheux de manière à assurer une meilleure protection des sols, l'amélioration du couvert végétal étant de nature à ralentir l'érosion des sols et à les préparer à la plantation des espèces plus hautes qui constitueront un couvert forestier (Aouadi, 1989 ; Amara *et al.,* 2014).

Par ailleurs, *P. lentiscus* figure parmi les espèces exploitées depuis longtemps pour divers intérêts économiques tels que le domaine alimentaire, la production de médicaments, en cosmétique et dans la construction (Bussotti *et al.,* 2005).

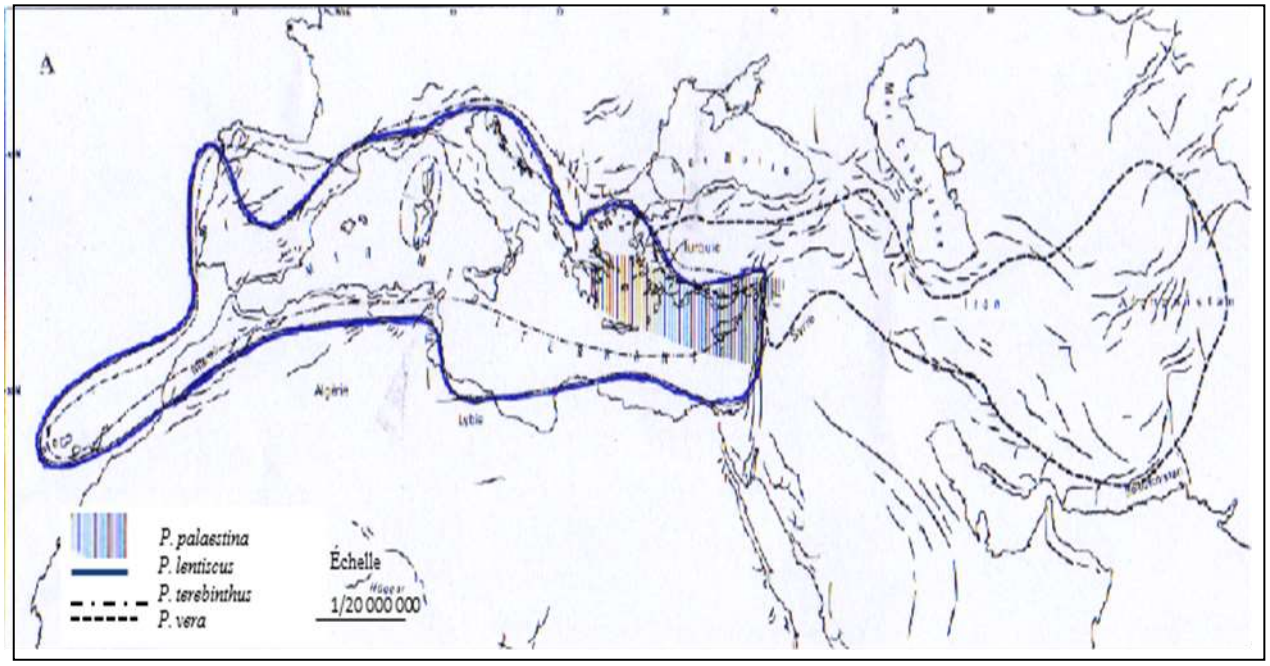



**Figure 4 : Distribution de *P. lentiscus* L. (Alyafi, 1979 *in* Aït Saïd, 2011).**

## 2. Le stress oxydant et systèmes antioxydants

### 2.1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène:

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont une famille d'entités chimiques regroupant les dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) [anion peroxyde ($O_2^{\bullet}$), peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$)] et les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire - non apparié) [$O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$), monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) …] (Belkheiri, 2010). Les radicaux libres oxygénés proviennent aussi bien du processus photosynthétique que de la respiration mitochondriale (figure 5) (Stofleth, 2012). La biosynthèse des ERO est également considérée comme un signal de stress et comme une réponse immunitaire nécessaire à la défense et à l'adaptation de la plante (Demidchik, 2015).

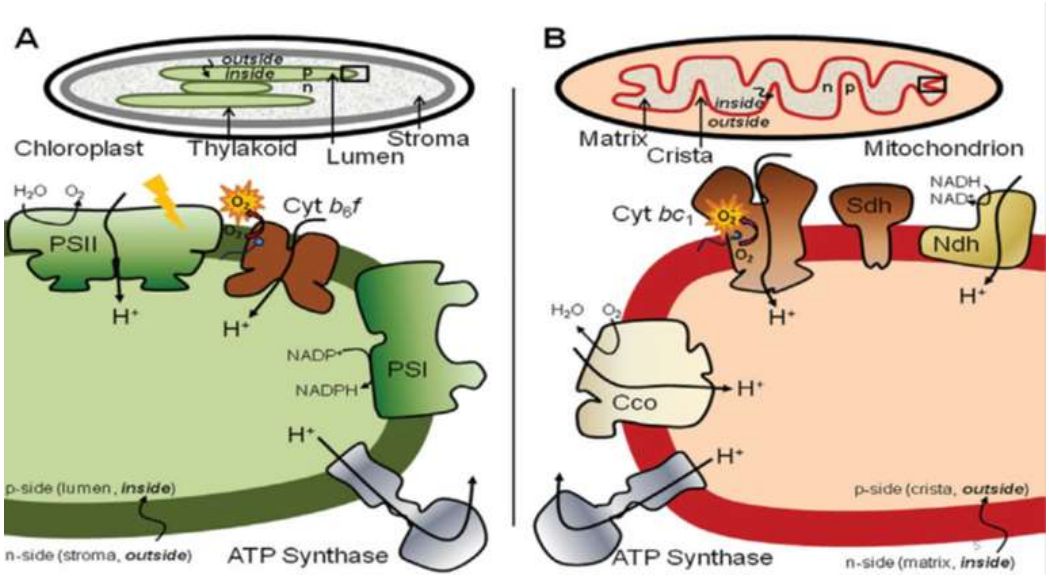



**Figure 5 : Sites de formation du $O_2^{\bullet}$ : (A) Chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse : complexe cytochrome b6f, PSII et PSI ; (B) complexe cytochrome bc1 dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Stofleth, 2012).**

Bien que la production de ERO peut être importante dans plusieurs processus cellulaires tels que la défense contre l'infection et la signalisation cellulaire (Foyer et Shigeoka, 2011; Tripathy et Oelmülle, 2012), leur présence est plus souvent associée à la détérioration des composants cellulaires tels que les protéines, les lipides et les acides nucléiques (figure 6) (Pospisil, 2009). La lumière du soleil, essentielle pour la vie des organismes photosynthétiques peut également promouvoir leurs dégâts (Zvezdanovic *et al.*, 2013).

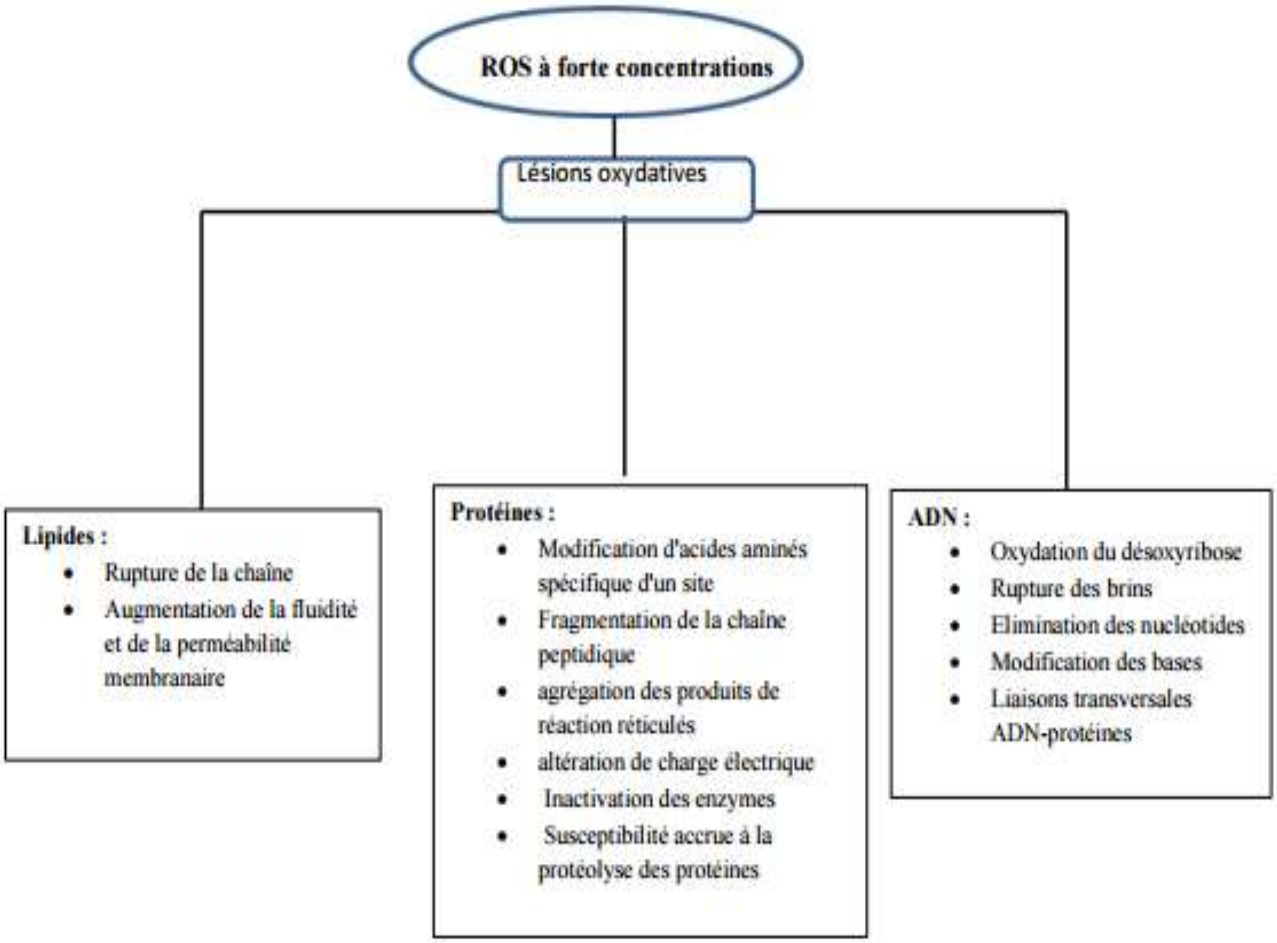



**Figure 6: Lésions oxydatives induites par les ERO (Sharma *et al.*, 2012)**

## 2.2. Mécanismes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène :

Dans des conditions normales, un équilibre approprié entre la production des ERO et leur élimination est maintenu à un niveau bas d'ERO grâce à une batterie d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques qui coopèrent dans un système extrêmement efficace (figure 7). Tout déséquilibre entre production d'ERO et d'antioxydants (Agarwal et Zhu, 2005) se traduit par des perturbations métaboliques souvent désignés par le stress oxydatif, pouvant conduire à des dommages irrémédiables et, finalement, à la mort cellulaire par la toxicité des ERO (Cruz De Carvalho, 2008; Boguszewska et zagdanska, 2012 ; Tripathy et Oelmülle, 2012; Gulcin, 2012).

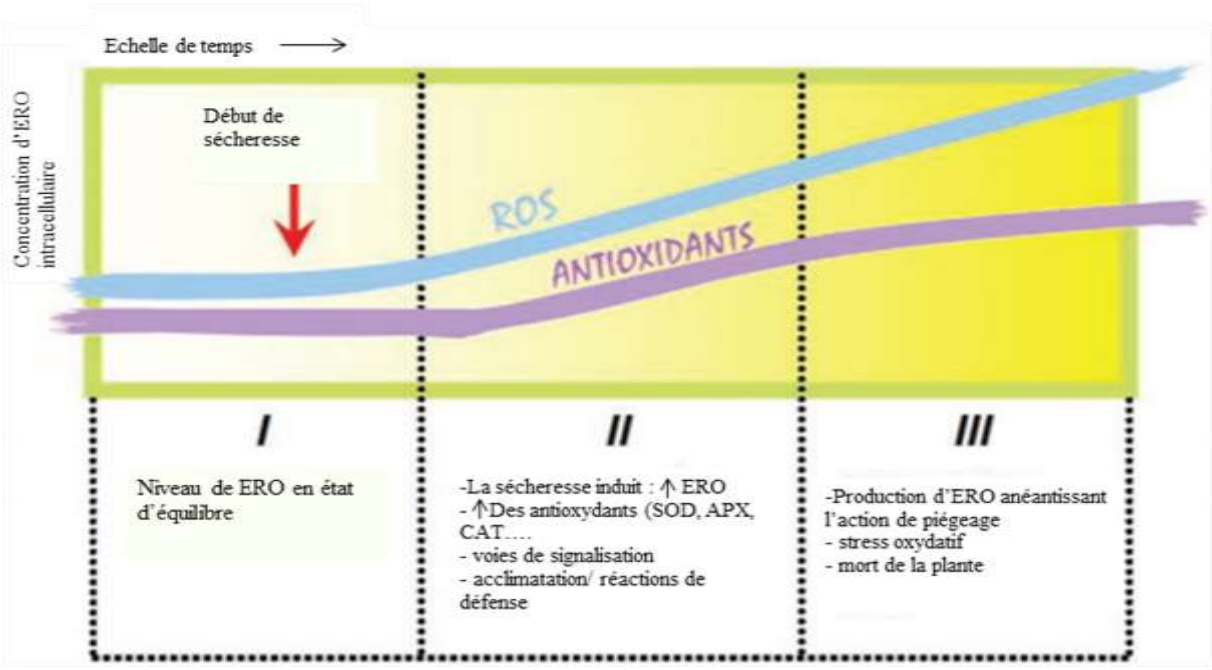



**Figure 7: Modèle proposé des trois phases successives de la réponse au stress hydrique (Cruz De Carvalho, 2008).**

La détoxification de l'excès de radicaux libres (RL) est assurée par deux types d'antioxydants : antioxydants non enzymatiques et antioxydants enzymatiques (Sharma *et al.*, 2012).

### 2.2.1. Mécanismes enzymatiques :

De nombreuses enzymes largement rencontrées chez les végétaux et animaux assurent la détoxification des ERO (Decker et Van holde, 2011 ; Sharma *et al.*, 2012). Elles agissent de concert lors du stress oxydatif. Elles se distinguent en enzymes antioxydantes primaires telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), les enzymes qui neutralisent les RL ; et enzymes antioxydantes secondaires telles que la déshydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR) qui régénèrent l'acide ascorbique et le glutathion (figure 8) (Foyer et Shigeoka, 2011).

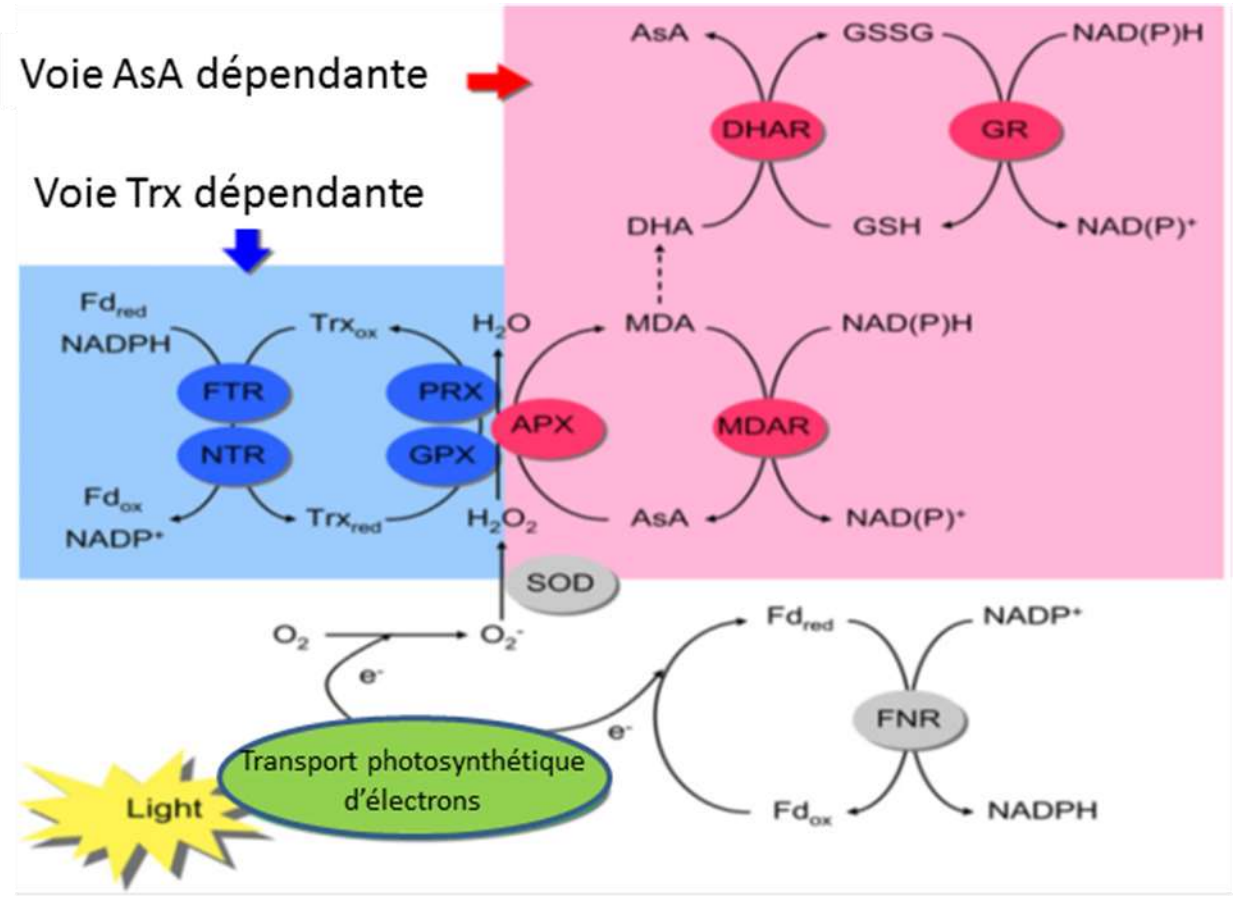



**Figure 8: Voies d'élimination du $H_2O_2$ dans les chloroplastes : voie dépendante de l'acide ascorbique (cycle ASA-GSH; à droite) et voie dépendante de la thiorédoxine (TRX / GPX; à gauche).** Fd, ferrédoxine; FNR, ferrédoxine NADPH réductase; FTR : ferrédoxine thiorédoxine réductase; MDAR, MDA réductase **(Foyer et Shigeoka, 2011)**.

Les SOD, découvertes par Fridovich et Mccord en 1969 (Boguszewska et Zagdanska, 2012), sont des métalloenzymes antioxydantes présentes dans tous les compartiments cellulaires et constituent la première ligne de défense contre les ERO (Decker et Van Holde, 2011 ; Kasote *et al.*, 2015). Elles agissent par suppression du radical $O2^{\bullet-}$ en catalysant sa dismutation (a) et diminuent ainsi le risque de formation de $OH^{\bullet}$ via la réaction de type Haber-Weiss (b) (Ndidi et Akee, 2011; Kasote *et al.*, 2015).

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (a)$$

$$O2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet} + O_2 + HO^- \qquad (b)$$

Les catalases végétales sont des protéines tétramériques sous plusieurs isoenzymes codées par plusieurs gènes (Racchi, 2013), généralement trois ou quatre par espèce. Elles dégradent le $H_2O_2$ obtenu lors de la dismutation du radical $O_2^{\bullet-}$ en oxygène et en $H_2O$ (Gill et Tuteja, 2010). Elles se répartissent en plusieurs classes (tableau I) :

- les CAT de la classe I s'expriment principalement dans les tissus photosynthétiques, leur synthèse est dépendante de la lumière et sont impliquées dans la suppression du $H_2O_2^{\bullet}$;
- les CAT de la classe II sont surtout retrouvées dans les tissus vasculaires
- les CAT de la classe III sont plutôt abondantes dans les graines en germination et les jeunes semis (RACCHI, 2013).

**Tableau I. Classification des catalases des plantes. Lettres romaines : enzymes ; italique : gènes (Willekens *et al.*, 1996 modifiée par Racchi, 2013).**

| espèce | Classe I | Classe II | Classe III |
|---|---|---|---|
| *Gossypium hirsutum* | SU2 | | SU1 |
| *Nicotiana plumbaginifolia* | *Cat1* | *Cat2* | *Cat3* |
| *Ricinus communis L.* | | CAT2 | CAT1 |
| *Zea mays* | CAT-2 | CAT-3 | CAT-1 |
| *Arabidopsis thaliana* | CAT2 | CAT1 | CAT3 |
| *Lycopersicon esculentum* | | TOMCAT1 | |
| *Solanum tuberosum* | | *Cat2St* | |
| *Prunus persica* | *Cat1* | *Cat2* | |

L'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion réductase, la thioredoxine réductase sont des enzymes du cycle du cycle Asa-GSH (Gill et Tuteja, 2010 ; Foyer et Shigeoka, 2011).

**2.2.2. Mécanismes non enzymatiques** :

Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, les polyphénols et la proline (Gill et Tuteja, 2010).

Le glutathion, (ɣ-L-glutamyl-L-cysteinylglycine) est un important antioxydant thiol non protéique de faible poids moléculaire synthétisé dans les organismes vivants (Dubreuil-Maurizi et Poinssot, 2012; Kasote *et al.*, 2015).

Initialement décrit comme un puissant antioxydant (Mari et *al*., 2009) en particulier dans le chloroplaste où il protège l'appareil photosynthétique (Boguszewska et Zagdanska, 2012), le glutathion est impliqué dans le fonctionnement d'un large éventail de processus tels que la croissance, l'apoptose cellulaire (Diaz-Vivancos *et al.*, 2015) et le développement des méristèmes apicaux racinaires (Yu *et al.*, 2013).

Il est abondant dans tous les compartiments cellulaires (cytosol, chloroplaste, mitochondrie et noyau) où il diffuse librement entre ces derniers (Gill et Tuteja, 2010; Diaz-Vivancos *et al.*, 2015). A l'intérieur de la cellule, le glutathion se retrouve à la fois sous forme

réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG) (Pereira *et al.*, 2013). En absence de stress, le rapport GSH/GSSG reste très élevé (Dubreuil-Maurizi et Poinssot, 2012 ; Chiarugi *et al.*, 2011) à l'exception du réticulum endoplasmique où il est plutôt sous forme GSSG, principale source d'équivalents oxydants favorisant la formation des ponts dissulfure et le repliement correcte des protéines natives (Mari *et al.*, 2009). Ce rapport est maintenu grâce à l'activité glutathion réductase qui assure l'équilibre thermodynamique entre les 2GSH / GSSG et NADP / NADPH (Diaz-Vivancos *et al.*, 2013).

En cédant un électron, le GSH lui-même devient réactif et se lie facilement à une autre molécule de GSH réactive pour former le disulfure de glutathion (GSSG). Lors d'un stress oxydatif, GSH est converti en GSSG, ce qui entraîne une diminution rapport GSH / GSSG, communément considéré comme un indicateur de l'équilibre d'oxydoréduction (Chiarugi *et al.*, 2011). Il métabolise le peroxyde d'hydrogène ($H_20_2$) produit lors de la dismutation de l'oxygène par la MnSOD (Mari *et al.*, 2009).

Les caroténoïdes (spécifiquement les xanthophylles) fonctionnent comme de puissants photoprotecteurs par neutralisation des ERO, notamment l'oxygène singulet, ou par dissipation de l'énergie sous forme de chaleur (Demmig-Adams *et al.*, 1996 ; Tripathy et Oelmülle, 2012). Cette activité antioxydante découle principalement de la capacité de la structure à double liaison conjuguée à délocaliser les électrons non appariés (Flora, 2009).

La vitamine C (acide ascorbique / ascorbate), générée au cours du métabolisme aérobie dans les mitochondries (Racchi, 2013), réagit chimiquement avec le $O_2^{-\bullet}$, l'oxygène singulet et l'ozone et par voie enzymatique avec le $H_2O_2$ pour neutraliser leurs effets toxiques. La vitamine C aide aussi à régénérer les pigments antioxydants (carotènes et xanthophylles) et la vitamine E (Kasote *et al.*, 2015).

Les composés phénoliques, un des groupes de métabolites secondaires le plus largement répandu chez les plantes, jouent un rôle important comme antioxydants.

### 2.3. Facteurs de stress environnementaux et réaction de la plante :

Les végétaux de par leur immobilité, subissent un ensemble de facteurs environnementaux biotiques et abiotiques (figure 9). Bien que de nombreux facteurs soient requis pour le bon développement de la plante (le vent comme vecteur de pollen et de graines), celle-ci ne se retrouve presque jamais dans des conditions optimales (Schulze *et al.*, 2005). En général, ces facteurs de stress agissent simultanément ; la chaleur, le manque d'eau et les longues journées de lumière d'été par exemple, réduisent considérablement la vitalité de la plante. Dans ces conditions, les facteurs biotiques tels que les champignons et les scolytes voient leur action favorisée et mènent éventuellement au dépérissement de la plante (Lichtenthaler, 1996).

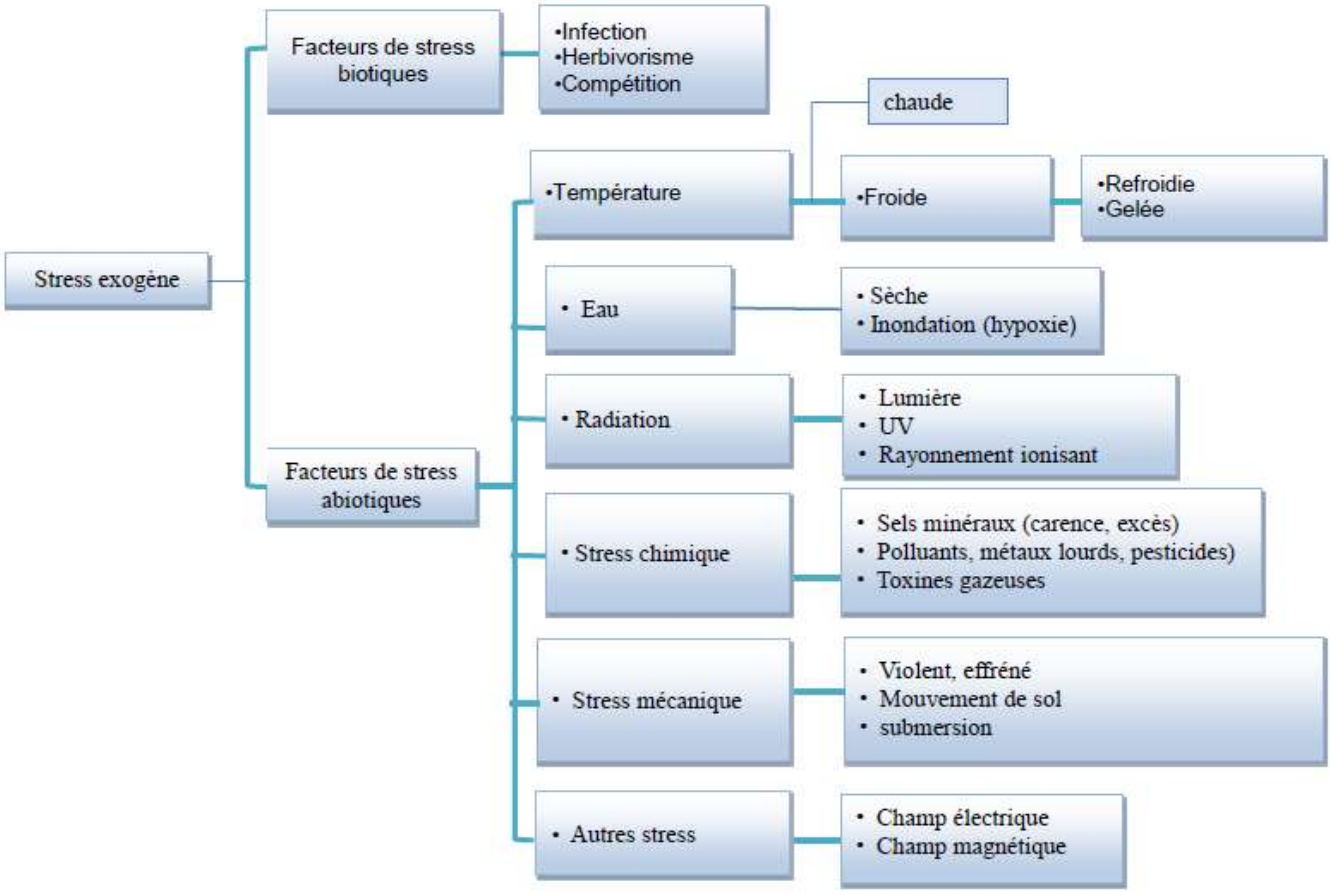



**Figure 9 : Facteurs de stress biotiques et abiotiques des plantes (Schulze, 2005)**

Les stress environnementaux modérés activent la signalisation cellulaire et la production de substances telles que les ERO et les ERN (espèces réactives d'azote) (Mullineaux et Baker, 2010 ; Molassiotis et Fotopoulos, 2011 ; Nikiforou *et* Manetas, 2014) sans causer de stress oxydatif. Cette production quand elle est modérée est perçue par la plante comme un signal d'alarme qui déclenche les voies de défense et les réponses d'acclimatation permettant l'adaptation aux changements environnementaux défavorables (Cruz De Carvalho, 2008).

Selon Mittler et Blumwald (2015), les ERO pourraient induire la synthèse de l'acide abscissique dans les cellules de garde provoquant la fermeture des stomates lors du stress hydrique.

La peroxydation des lipides membranaires (MLPO) générée par un taux élevé des ERO est considérée pendant longtemps, comme le principal mécanisme moléculaire impliqué dans la dégradation oxydative de l'architecture cellulaire qui peut éventuellement conduire à la mort cellulaire (Sharma *et al.*, 2012). Cependant, les produits de la MLPO par leur nature

électrophile réagissent avec les résidus nucléophiles des protéines (thiorédoxine, thiorédoxine réductase, la cytochrome oxydase et les protéasomes) formant des adduits covalents stables (Higdon *et al.*, 2012) jouant un rôle important dans la signalisation cellulaire adaptative (Bhattacharjee, 2014).

Les travaux de Benhassaini *et al.* (2012) sur l'effet du stress salin sur les plantules de *P. atlantica* indiquent une accumulation de proline proportionnelle à la concentration de NaCl ; la proline étant connue à la fois pour son rôle osmorégulateur que pour son effet antioxydant (Ben Rejeb *et al.*, 2014).

Les travaux de Tattini *et al.* (2006) ont montré une faible augmentation dans la peroxydation lipidique dans les tissus foliaires de *P. lentiscus* due aux rayonnements solaires probablement grâce à la capacité des polyphénols accumulés dans le mésophile, à protéger les tissus foliaires du stress oxydatif.

## 3. Généralités sur les polyphénols :

### 3.1. Caractérisation structurale :

Le terme polyphénols ou composés phénoliques regroupe un vaste ensemble de molécules, avec plus de 10000 molécules identifiées (kennedy et Wightman 2011 ; Vladimir-Knezevic *et al.*, 2012). Ils sont caractérisés par la présence, dans leur structure, d'au moins un cycle aromatique, lui même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyle, substituées ou non (Kennedy et Wightman, 2011; Harborne, 1998).

La plupart des composés phénoliques des plantes sont des dérivés de l'acide trans-cinnamique qui est formé à partir de la L-phénylalanine et de la tyrosine sous l'action de la L-phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la tyrosine ammonya-lyase (TAL) respectivement, l'enzymes du point de branchement entre le métabolisme primaire (voie du shikimate) et le métabolisme secondaire (voie des phénylpropanoïdes) (Vladimir-Knezevic *et al.*, 2012).

La gamme de composés phénoliques s'étale de simples molécules de faible poids moléculaire, un seul noyau aromatique, telles que le phénol absent dans l'organisme végétal, aux composés complexes et de haut poids moléculaire et fortement polymérisés tels que les tannins.

Parmi ces divers composés, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins représentent les sous-groupes les plus importants (Lattanzio *et al.*, 2006 ; Kennedy et Wightman, 2011). Les composés phénoliques se retrouvent généralement dans la nature, sous forme conjuguée avec des glucides (mono, di ou oligosaccharides) ce qui leur donnent la particularité d'être solubles dans l'eau (Harborne, 1998). Les molécules constitutives de la structure des parois cellulaires sont, quant à elles insolubles (Vladimir-Knezevic *et al.*, 2012).

### 3.2. Classification :

Les polyphénols sont un groupe de produits naturels très diversifié et se subdivisent en plusieurs classes selon la structure chimique de base (Tsao, 2010; Cheynier, 2012) et en sous classes selon les substitutions portées sur les noyaux (Manach *et al.*, 2004) (tableau II). Cette diversité structurale est en relation avec la diversité de leurs propriétés, d'où leur distribution spécifique (Cheynier, 2012). Certains composés phénoliques sont extrêmement répandus tandis que d'autres sont spécifiques à certaines familles de plantes ou ne se trouvent que dans certains organes de la plante ou encore à certains stades de développement (Cheynier, 2012).

Les acides phénoliques, également appelés composés non-flavonoïdes se distinguent, selon leur squelette de base, en deux principaux groupes (Tsao *et al.*, 2010) :

- **Les dérivés de l'acide benzoïque** :

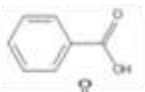
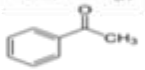
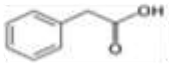
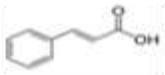
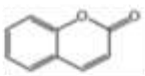
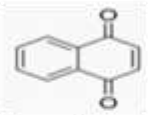
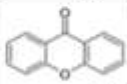
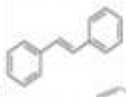
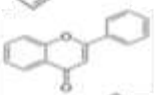
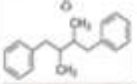
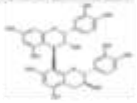
Ce sont des composés en $C_1$-$C_6$, peu abondants dans les plantes. Les acides hydroxybenzoïques sont, néanmoins, des constituants de structures complexes importants comme les tanins hydrolysables (Manach *et al.*, 2004). L'acide salicylique joue un rôle

important dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Rivas-San Vicente et Plasencia, 2011). Les dérivés de l'acide benzoïque peuvent être synthétisés soit à partir des dérivés de l'acide cinnamique par ß oxydation, ou directement à partir de l'acide shikimique (El-Basyquni *et al.*, 1964).

- **Les dérivés de l'acide cinnamique** :

Ces dérivés sont également désignés par phénylpropanoïdes (Macheix *et al.*, 2005) sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques.

**Tableau II. Structure des différentes classes de polyphénols (Crozier *et al.*, 2006 modifié)**

| Squelette | Classification | Structure de base |
|---|---|---|
| $C_6$-$C_1$ | Acides phénoliques |  |
| $C_6$-$C_2$ | -Acetophénone |  |
| $C_6$-$C_3$ | - Acide phénylacétique<br>- Acides cinnamiques et hydroxycinnamiques<br>- Coumarines |  <br>  <br>  |
| $C_6$-$C_4$ | Naphtoquinones | |
| $C_6$-$C_1$-$C_3$ | Xanthones |  |
| $C_6$-$C_2$-$C_3$ | Stilbènes |  <br>  |
| $C_6$-$C_3$-$C_6$ | Flavonoides |  |
| C6-C6-C6 | Lignanes |  |
| (C6-C1)n | Tannins hydrolysables | |
| $(C_6$-$C_3$-$C_6)$n | Tannins condensés |  |
| (C6-C3)n | Lignines | |

Les flavonoïdes représentent la plus grande classe de polyphénols. Chimiquement, ils peuvent être définis comme un groupe de composés polyphénoliques caractérisés par la présence de deux noyaux benzéniques reliés par une chaine à trois carbones, qui a tendance à former un hétérocycle oxygéné (Kennedy et Wightman, 2011). Ils dérivent tous de la flavone, précurseur commun (figure10). Selon leur degré d'oxydation, les flavonoïdes se distinguent en plusieurs sous classes : chalcones, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, flavan-3-ols, et les anthocyanins (Harborne, 1998 ; Mendes *et al.*, 2012). Ils sont synthétisés au niveau du chloroplaste et s'accumulent généralement dans les vacuoles. A l'exception de quelques familles chez les Caryophyllales dont les pigments sont les bétalaïnes, les fleurs et les fruits des Angiospermes sont colorés par les anthocyanes (Bruneton, 2009). Ils jouent ainsi un rôle primordial dans la pollinisation et la dispersion des végétaux (Macheix *et al.*, 2005).

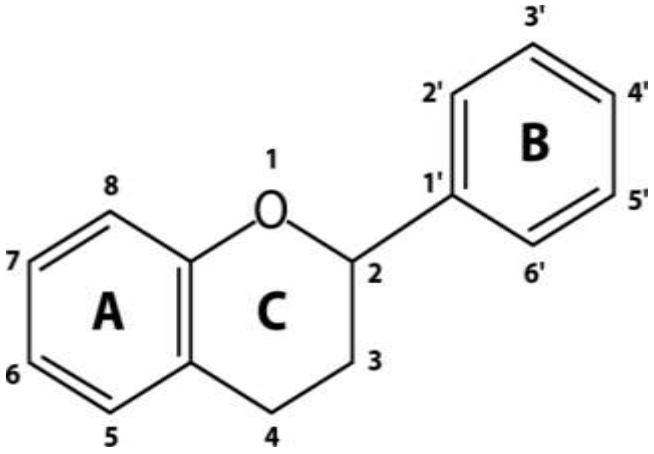



**Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 2009)**.

### 3.3. Biosynthèse des polyphénols :

Le métabolisme phénolique est un processus complexe résultant de l'interaction d'au moins cinq voies différentes (Lattanzio *et al.*, 2012 ; Caretto *et al.*, 2015) reliant le métabolisme primaire au métabolisme secondaire (figure 11) (Macheix *et al.*,2005). L'acide cinnamique, synthétisé à partir de la phénylalanine via la voie du shikimate, est le précurseur commun de la plupart des composés phénoliques chez les plantes supérieures (Yeh *et al.*, 2014). Chez les végétaux supérieurs la voie des polyacétates permet, par la condensation de trois acétyl Coa, la synthèse du second noyau des flavonoïdes, isoflavonoïdes et stilbènes (Macheix *et al.*, 2005; Noel *et al.*, 2005).

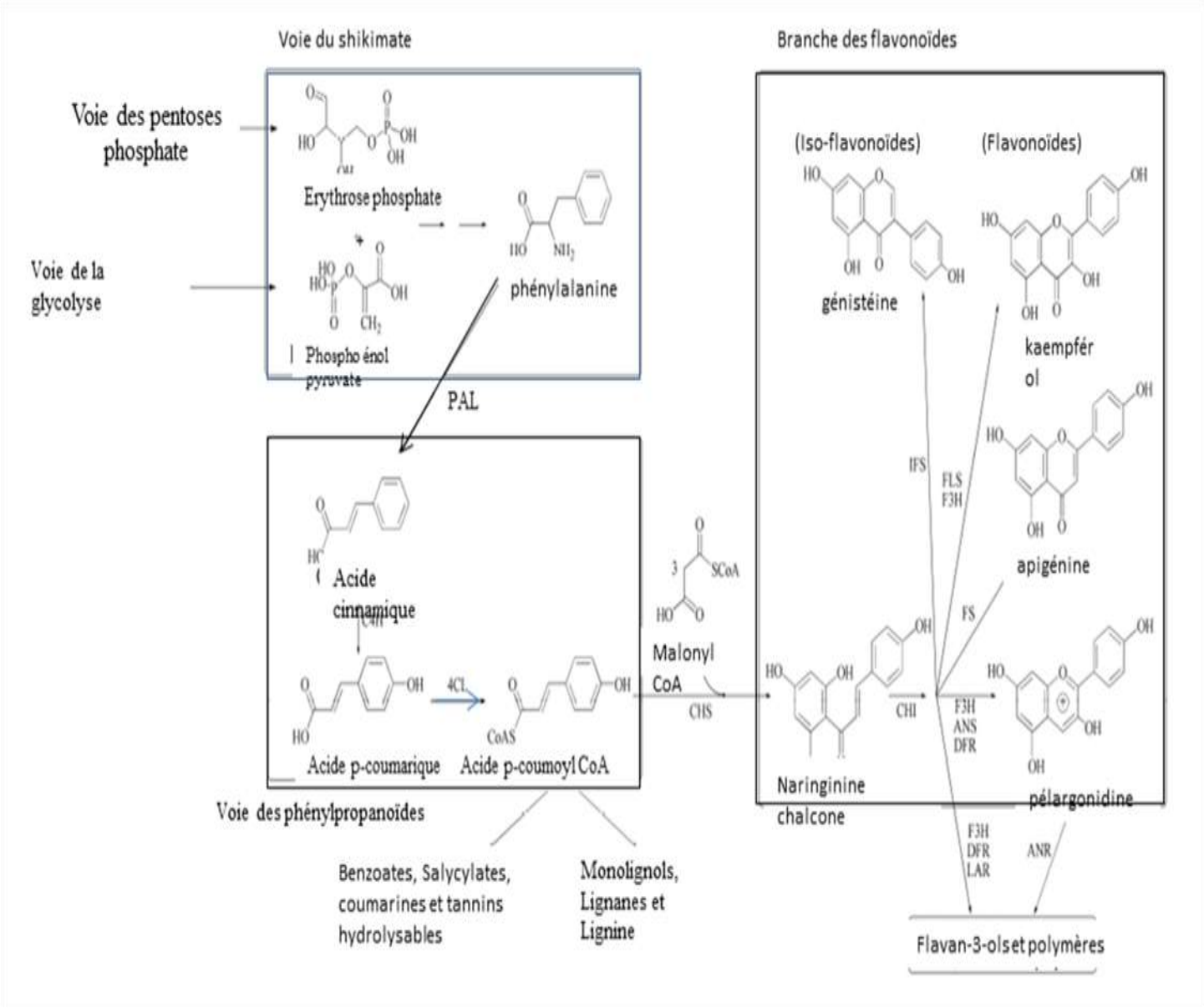



**Figure 11**: **Structure et voies de synthèse des polyphénols avec quelques exemples de structures. Les flèches indiquent les voies de synthèse (Caretto *et al.*, 2015)**

### 3.4. Propriétés écologiques et physiologiques des polyphénols :

A l'instar de tous les métabolites secondaires végétaux, le rôle des CP dans la plante est resté ignoré pendant longtemps (Crozier *et al.*, 2006). On assiste, ces dernières années, à un regain d'intérêt pour ces molécules (Lattanzio *et al.*, 2006 ; Vladimir-Knežević *et al.*, 2012 ; Csepregi *et al.*, 2016). Les CP ont joué un rôle dans le succès de la conquête des plantes du milieu terrestre (Borges, 2008).

Ils possèdent un large éventail de rôles physiologiques dans la plante (Lattanzio *et al.*, 2006). La lignine, polymère dérivé des phénylpropanoïdes, constitue une barrière mécanique contre les agressions par les agents microbiens (Harborne, 1998).

Les acides phénoliques interviennent dans la germination et la dormance des graines (Lattanzio *et al.*, 2006). Ils ont un rôle clé dans la protection des plantes contre les herbivores et les infections microbiennes, la pollinisation et la dispersion par la pigmentation des fleurs et des fruits respectivement (Bandaranayake, 2002 ; Mazid *et al.*, 2011).

Les CP des lixiviats des parties aériennes et souterraines des plantes et/ou de la litière végétale souterraine, retrouvés dans le sol interviendraient dans la régulation des processus biologiques du sol, ils contrôleraient le pool et la forme des nutriments disponibles pour les plantes et/ou des microorganismes (Lattanzio, 2013). Ce sont des agents allélopathiques, protecteurs contre les UV, comme ils interviennent dans les processus de signalisation et dans la formation des nodules dans les racines des légumineuses (Hocher *et al.*, 2011; Lira *et al.*, 2015).

### 3.4.1. Stress environnementaux et synthèse de polyphénols:

Les plantes, cibles permanentes d'attaques par des agents biotiques (Ferrenberg *et al.*, 2012) en modifiant 2015) et abiotiques (Ramegowda et Senthil-Kumar, 2015), disposent d'une multitude de mécanismes hautement sophistiqués et efficaces pour y faire face (Perez-Clemente *et al.*, leur métabolisme ; autrement dit en s'acclimatant (Caretto *et al.*, 2015).

Les CP, largement distribués dans le règne végétal, interviennent fortement dans ces mécanismes grâce à leur capacité anti-oxydante (Csepregi *et al.*, 2016). Les mécanismes de défense des plantes peuvent être physiques comme la synthèse de la lignine qui limite l'entrée des pathogènes et réduit la fécondité des insectes, comme ils peuvent également être chimiques (substances toxiques) (War *et al.*, 2012).

Ces mécanismes sont, néanmoins, coûteux pour les plantes en raison de l'énergie nécessaire à la biosynthèse des composés de défense au détriment de la synthèse des substances de croissance (Caretto *et al.*, 2015). L'allocation des ressources pour les substances chimiques de défense entrainerait une diminution de la croissance en détournant les ressources provenant du métabolisme primaire (Herms et Mattson, 1992).

Pour réduire ces coûts, la plante peut ne synthétiser les substances de défense qu'après avoir subi le stress, après l'attaque par un pathogène dans le stress biotique notamment (War *et al.*, 2012) ; cette stratégie appelée défense induite est risquée dans le cas d'une attaque rapide ou sévère.

Les plantes qui sont susceptibles de subir des dommages fréquents et/ou graves doivent plutôt investir dans les défenses constitutives, tandis que les plantes qui sont rarement attaqués peuvent se prévaloir principalement sur les défenses induites (Lattanzio, 2013). Ainsi les génotypes résistants ont une faible croissance même en absence de stress comparativement aux génotypes sensibles.

En outre, la proline connue comme substance clé dans la tolérance aux stress (Kaur et Asthir, 2015) et principale osmorégulateur (Parida *et al.*, 2007) pourrait jouer un rôle dans la synthèse des CP (Caretto *et al.*, 2015) en favorisant, par sa synthèse, la régénération de $NAHP^+$ (Ben Rejeb *et al.*, 2014) déclenchant le cycle des pentoses phosphate qui fournit les précurseurs nécessaires à la synthèse de métabolites phénoliques durant le stress (figure 12) (Shetty et Wahlqvist, 2004; Caretto *et al.*, 2015).

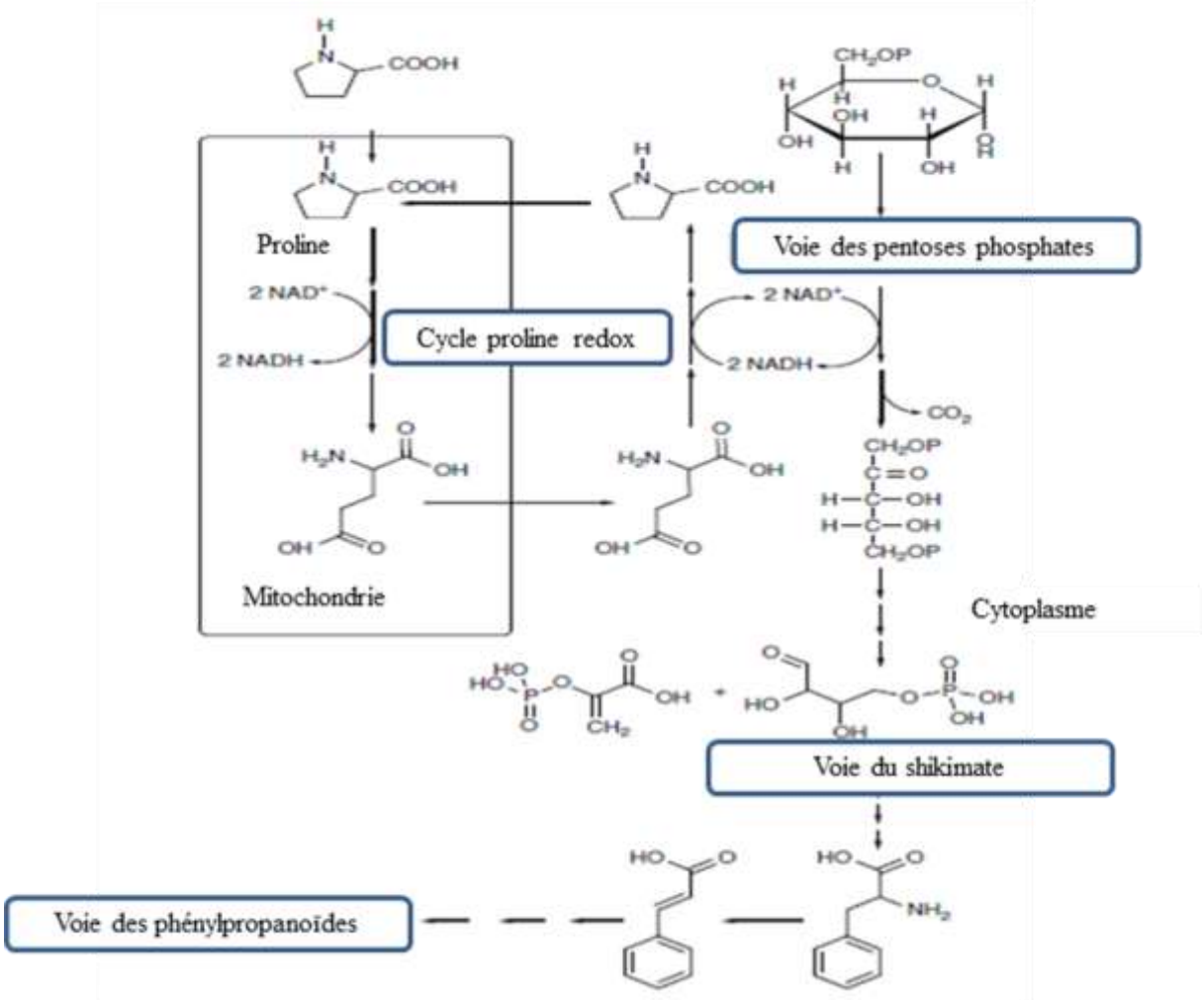



**Figure 12** : **Les relations entre le métabolisme primaire et secondaire et le rôle de la proline endogène à stimuler la voie des phénylpropanoïdes (Lattanzio, 2013)**

### 3.4.2. Régénération et synergisme des polyphénols :

Il a été rapporté que la combinaison de deux anti-oxydants a un effet synergique (Chaiyasit *et al.*, 2007). Les tocophérols, substances naturellement présentes dans la plupart des huiles végétales, sont connues pour être d'efficaces anti-oxydants lipophiles (Luzia et Jorge, 2011 ; Seppanen *et al.*, 2010) mais cette activité ne semble effective qu'en présence d'autres anti-oxydants endogènes (Liu *et al.*, 1999). Les CP, par réduction du radical α

tocophéroxyl, régénèrent l'α tocophérol (Zhou *et al.*, 2005) puis l'acide ascorbique régénère les CP (Figure 13) (Sakihama *et al.*, 2002 ; Dai *et al.*, 2008 ; Skibsted, 2012).

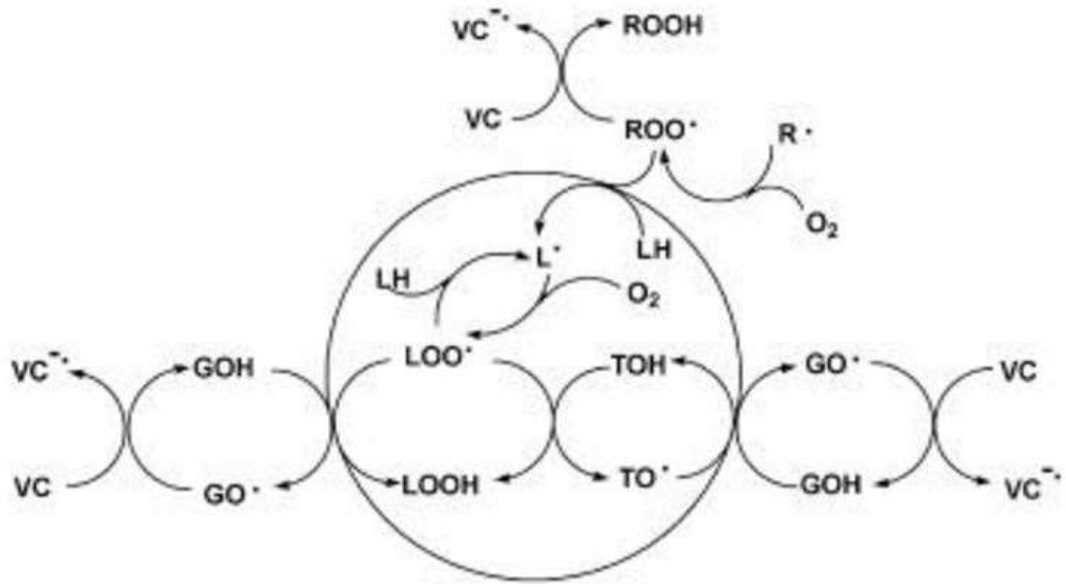



**Figure 13: Mécanisme synergique anti-oxydant des polyphénols (GOH), acide ascorbique (VC) et tocophérol (TOH) ; LH : acide linoléique ; LOOH : hydroxyde de l'acide linoléique (Dai *et al.*, 2008)**

### 3.4.3. Propriétés biologiques des polyphénols :

Les CP possèdent un large éventail d'activités biologiques. Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont été publiés sur leurs propriétés thérapeutiques telles que les effets anti-inflammatoires (Santangelo *et al.*, 2007 ; Shen *et al.*, 2012 ; Calabriso *et al.*, 2015), anti-athérosclérotiques (Calabriso *et al.*, 2015 ; Huseini *et al.*, 2015), anti-hémolytiques (Khalili *et al.*, 2014), anti-microbiens (Li *et al.*, 2014) et anti-parasitiques (Calixto Junior *et al.*, 2015).

Des essais *in vitro* sur l'activité anti-leishmanienne des CP se sont révélés très efficaces (Bero *et al.*, 2011 ; Mahmoudvand *et al.*, 2014 ; Calixto Junior *et al.*, 2015). Ces propriétés seraient en relation avec divers mécanismes (Barrajon-Catalan *et al.*, 2014) d'action tels que :

- l'activité anti-oxydante directe, le blocage des cytokines pro-inflammatoires,
- la modulation de la signalisation du stress du réticulum endoplasmique,
- l'inhibition de l'acétylation des histones, la modulation des gènes de régulation des voies métaboliques,
- la régulation épigénétique en modulant l'expression des micro ARN
- la déstabilisation de la membrane externe de microorganismes Gram négatif et les interactions avec la membrane (Li *et al.*, 2014).

### 3.4.3.1. Propriétés anti-oxydantes des polyphénols:

Les polyphénols sont connus pour leur capacité anti-oxydante (Dragovic-Uzelac *et al.*, 2009 ; Gawron-Gzella *et al.*, 2012). Ils agissent comme anti-oxydants (ArOH ) par deux principaux mécanismes : soit en donnant un électron ( a) ou un atome d'hydrogène (b) (Bendary et *al.*, 2013).

$$R^{\bullet} + ArOH \longrightarrow RH + ArO^{\bullet} \qquad (a)$$

$$R^{\bullet} + ArOH \longrightarrow R^{-} + ArOH^{\bullet +} \qquad (b)$$

Les radicaux $ArO^{\bullet}$ et $ArOH^{\bullet +}$ étant des radicaux stables (moins réactifs), arrêtent les réactions radicalaires en chaîne (Leopoldini *et al.*, 2004 ; Tsao *et al.*, 2010).

L'activité anti-oxydante des CP est en relation directe avec leurs structures (Amic *et al.*, 2003 ; Akhtar *et al.*, 2015). De nombreux travaux ont été réalisés pour expliquer ces relations (Rice-Evans *et al.*, 1996). La présence et le nombre de groupements OH liés au noyau aromatique ainsi que leur disposition dans la conformation ortho-dihydroxylé sont d'une grande importance (Kim *et al.*, 2008). La présence de groupes fonctionnels supplémentaires, comme la double liaison C═C et le groupe carbonyle C═O peuvent également affecter la capacité anti-oxydante des CP (Tsimogiannis et Oreopoulou, 2006).

Outre la capacité que possèdent les polyphénols à céder les électrons ou les hydrogènes, ils sont capables de chélater des ions de transition tels que le $Fe^{2+}$ et $Cu^{2+}$ (figure14 a) (Leopoldini et *al.*, 2011) et réduire directement la vitesse de la réaction de Fenton (figure14 b), empêchant ainsi l'oxydation provoquée par les radicaux hydroxyle (Bendary *et al.*, 2013).

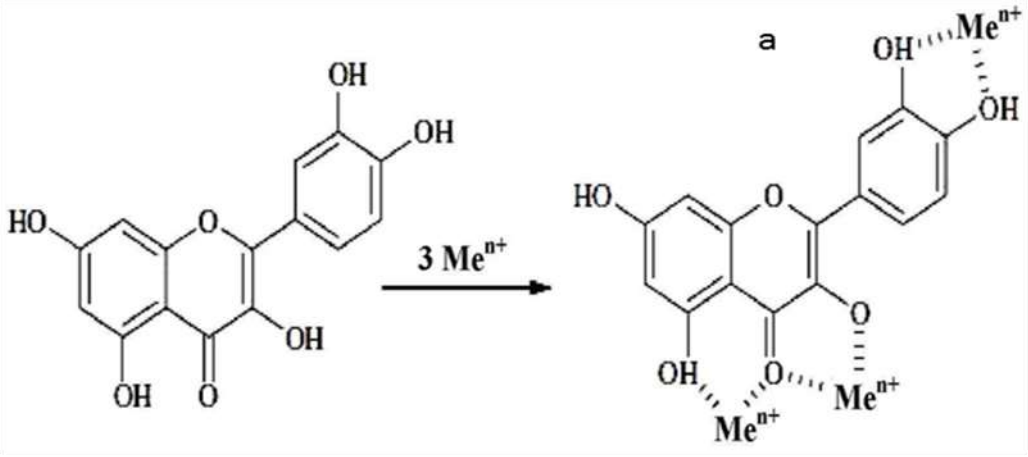



**Figure 14 : Piégeage des ERO (R$^{\bullet}$) par les flavonoïdes (FI-OH) et sites de liaisons des ions (Me$^{n+}$) (a) et réaction de Fenton (Bendary *et al.*, 2013; Kurek-Gorecka, *et al.*, 2014)**

**3.4.3.2. Propriétés pro-oxydantes** :

De nombreux composés sont connus pour avoir à la fois des propriétés anti-oxydantes et pro-oxydantes. Ces dernières peuvent être favorables ou préjudiciables aux systèmes biologiques (Alrawaiq et Abdullah, 2014). Ces auteurs ont rapporté que la quercétine, à de faibles concentrations, a un effet anti-oxydant alors qu'à des concentrations élevées, elle induit plutôt un effet pro-oxydant.

Un certain nombre d'études suggèrent l'effet pro-oxydant de l'épigallocatéchine gallate (EGCG) sur la fonction anti-cancéreuse à concentration élevée ; l'EGCG produit par auto-oxydation des ERO jouant un rôle important par leur effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Min et Kwon, 2014). Selon Lambert et Elias, 2010 *in* Yordi *et al.*, (2012), l'action pro-oxydante des CP, contrairement à l'action anti--oxydante, a une préférence plus spécifique contre certaines cibles cellulaires jouant ainsi un rôle important dans la prévention de certains cancers.

Par ailleurs, les composés phénoliques alimentaires peuvent présenter des activités pro-oxydantes en présence d'ions métalliques tels que le fer et le cuivre, en raison de leur capacité réductrice et en formant des chélates (Sakihama *et al.*, 2002). Cependant, le fort pouvoir réducteur des polyphénols peut également affecter des ions métalliques, en particulier $Fe^{3+}$ et $Cu^{2+}$, ce qui augmente leur capacité à former des radicaux hydroxyle très réactifs (Bouayed et Bohn, 2010).

### 3.4.3.3. Propriété antiparasitaire (activité anti-leishmanienne):

De nombreux travaux ont été rapportés sur l'activité anti-parasitaire des polyphénols végétaux en général (Anthony *et al.*, 2011) et anti-leishmanienne en particulier (Boutaleb-Charki *et al.*, 2011 ; Ezatpour *et al.*, 2015).

La leishmaniose est une maladie parasitaire causée par un protozoaire intracellulaire obligatoire du genre *Leishmania*. La maladie est transmise par les piqûres de phlébotomes infectés qui appartiennent aux genres *Phlebotomus* et *Lutzomyia* dans l'Ancien et le Nouveau Monde, respectivement (Mandell *et al.,* 2005 *in* Kimutai *et al.,* 2009). Elle est endémique dans les grandes régions des zones tropicales, subtropicales et le bassin méditerranéen (Chappui *et al.,* 2007).

#### 3.4.3.3.1. Distribution de la maladie :

La leishmaniose est un problème de santé publique dans le monde, particulièrement fréquente dans les pays en voie de développement (WHO, 2010).

Présentes sur quatre continents, les leishmanioses affectent plus de 88 pays dont 72 pays en voie de développement. 90 % des cas de leishmaniose viscérale se retrouvent dans les zones rurales pauvres (Desjeux, 2004).

L'Algérie compte parmi les pays les plus exposés à la leishmaniose qui constitue un véritable problème de santé publique (Izri *et al.,* 2014). Les trois formes sévissent (viscérale, cutanée et muco-cutanée). La leishmaniose viscérale (LV), forme la plus grave, causée par *L. infantum*, s'étend sur toute la partie Nord au niveau des étages humides et subhumides où le foyer le plus actif reste la Kabylie avec près de 50 % des cas (Bachi, 2006 ; Adel *et al.*, 2014 ; Mouloua, 2014). La leishmaniose cutanée, causée par plusieurs espèces de *Leishmania* (*L. infantum, L. donovani, L. major*, L. *killicki…*) (Eddaikra *et al.*, 2016) est la plus répandue ; elle regroupe à elle seule la quasi-totalité des leishmanioses du pays (Izri et Belazzoug, 2007). Les deux formes de leishmaniose sont endémiques en Algérie qui fait partie des sept pays les plus touchés (Desjeux, 2004).

#### 3.4.3.3.2. Le parasite et son cycle de vie :

Le cycle de vie de *Leishmania* implique deux hôtes différents (figure 15): les phlébotomes femelles et les mammifères (y compris les humains et les chiens) (Teixeira *et al.*, 2013). Dans l'intestin de l'insecte, le parasite existe sous la forme extracellulaire, allongée, dite promastigote flagellé. Les promastigotes sont injectés sous la peau lors d'un repas de sang et rapidement absorbés par les phagocytes mononucléaires où ils résident dans la vacuole parasitophore. Dans les phagocytes, les parasites se transforment en amastigotes ovoïdes. La multiplication massive des amastigotes conduit à la rupture des cellules et à la libération des parasites pour infecter d'autres cellules hôtes (Kolodziej et Kiderlen, 2005).

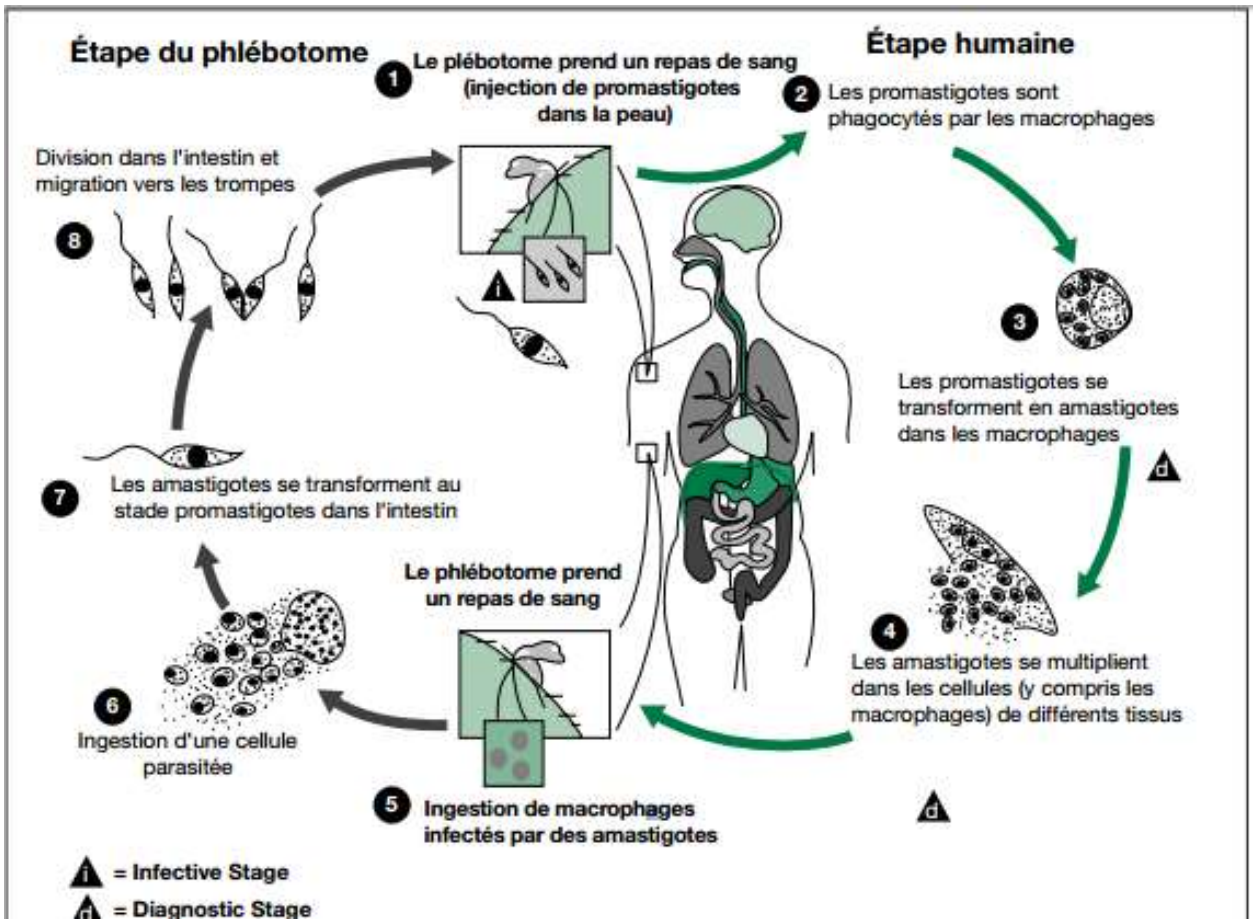



**Figure 15 : Cycle de vie de *Leishmania* (Carré *et al.*, 2010)**

### 3.4.3.3. 3. Traitement de la leishmaniose :

La prise en charge de la leishmaniose est lourde et nécessite l'hospitalisation. Il n'existe pour le moment aucun vaccin ni médicament prophylactique (WHO, 2010). Le traitement est alors curatif ; il s'agit d'une chimiothérapie basée sur les sels d'antimoine contenant des métaux lourds très toxiques (Marty, 2010 ; Iqbal *et al.*, 2016). Cependant, l'efficacité de ce traitement est limitée et liée à de néfastes effets secondaires, le coût très élevé et l'émergence des souches résistantes (Bachi, 2006 ; Iqbal *et al.*, 2016).

Le recours aux soins par les plantes, en particulier dans les régions où la maladie est endémique, reste le moyen le moins onéreux et qui peut s'avérer utile. En effet, ces pratiques traditionnelles avec des propriétés médicinales connues ont été utilisées pendant des siècles (Anthony *et al.*, 2005). Les plantes sont des sources précieuses d'agents anti-infectieux efficaces (Monzote, 2014). Ainsi, les tannins hydrolysables présentent une activité anti-leishmanienne intéressante et induisent la synthèse de l'oxyde nitrique et du facteur α de nécrose tumorale impliqués dans la destruction des cellules tumorales par activation des macrophages (Choi *et al.*, 2001 ; Kolodziej *et al.*, 2005).

Les travaux d'Ezatpour *et al.* (2015) ont montré que les extraits de *P. kinjuk* inhibent significativement la croissance des promastigotes de *leishmania major*, agent infectieux de la leishmaniose cutanée.

### 3.4.3.4. Propriété anti-hémolytique :

#### 3.4.3.4.1. Organisation du globule rouge et stress oxydant :

Le globule rouge (GR), encore appelé hématie ou érythrocyte est une cellule anucléée contenant une solution très concentrée d'hémoglobine (Wong, 2006), un pigment respiratoire, permettant le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus (Owen *et al.*, 1982 **;** Aguilar-Martinez, 2007 ; Pandey et Rizvi, 2011).

La membrane érythrocytaire est composée de deux couches de lipides riches en acides gras insaturés (figure 16) dans lesquelles sont intercalées de nombreuses protéines membranaires avec des fonctions variées de transporteurs d'ions, de récepteurs membranaires, fonctions d'antigènes, processus enzymatiques) (Asgary *et al.*, 2005 ; Pandey et Rizvi, 2011). La face interne de la bicouche est renforcée par un réseau de protéines flexibles dont 60 % sont représentées par les spectrines α et β (Wong, 2006). Ceci confère au GR une grande résistance aux déformations lors de son passage à travers les capillaires (Lenormand *et al.*, 2001).

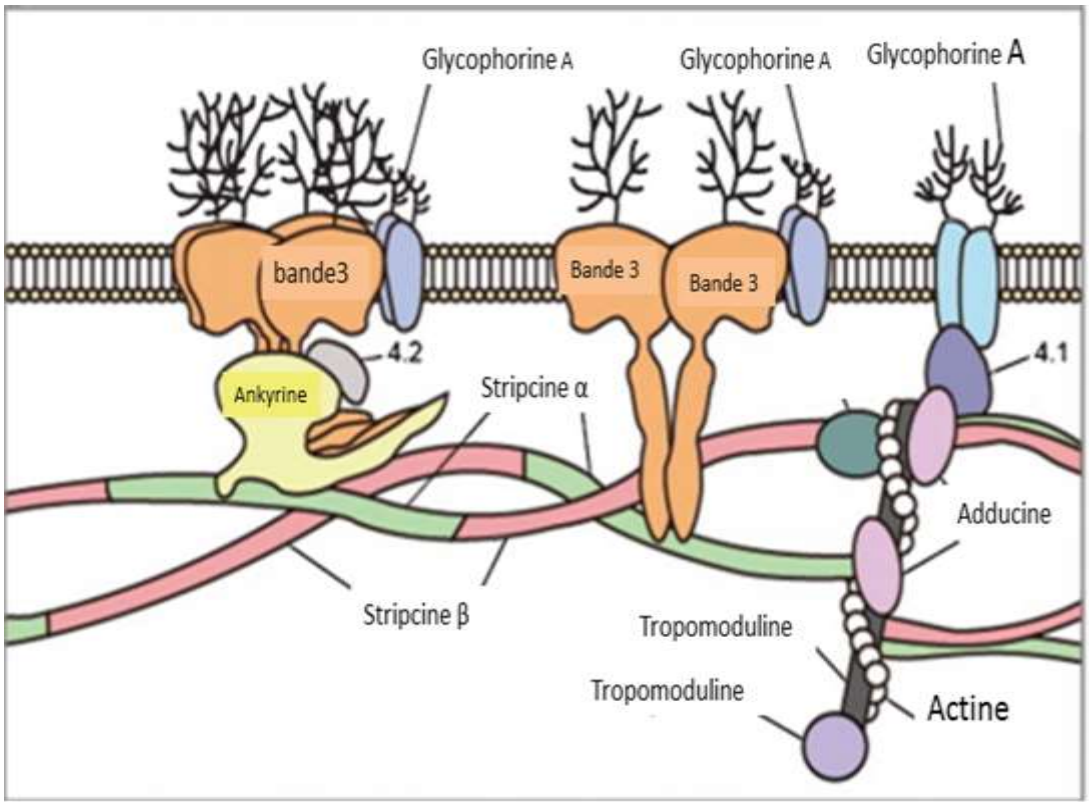



**Figure 16 : Structure schématique de la membrane érythrocytaire (d'après Kim *et al.*, 2015)**

### 3.4.3.4.2. Protection anti-hémolytique des polyphénols :

Les membranes des érythrocytes et l'hémoglobine sont continuellement exposées aux ERO et d'autres espèces radicalaires (Pandey et Rizvi, 2011) qui peuvent endommager de manière irréversible les macromolécules environnantes en particulier, les groupes amine et les groupes thiol des protéines, et les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés dans les lipoprotéines. Ce qui conduit à une diminution dans les niveaux d'acides gras polyinsaturés (Cazzola *et al* 2004 ; Mohanty *et al.,* 2014) et à l'hémolyse cellulaire (Asgary *et al.,* 2005). La calcium-ATPase contenant un ou plusieurs groupes sulfhydrile réactifs particulièrement sensibles à l'oxydation peut perdre son activité et entrainer la destruction prématurée des GR (Çimen, 2008). En outre, des quantités importantes de ERO quittent le RG et endommage les autres constituants du sang (Johnson *et al.,* 2005 ; Çimen, 2008).

Bien que le GR possède un large système anti-oxydant enzymatique et non enzymatique, sa capacité à neutraliser la grande quantité d'ERO produite (Çimen, 2008) et le stress oxydatif est limitée (Mohanty *et al.,* 2014).

Diverses investigations ont récemment été menées sur l'efficacité protectrice des extraits de plantes contre l'hémolyse (Nabavi *et al.,* 2012 ; Khalili *et al.,* 2014). Cette efficacité est souvent attribuée aux CP contenus dans l'extrait et leur interaction possible avec les lipides membranaires et les protéines des GR (Maheshu *et al.,* 2010 ; Khalili *et al.,* 2014).

Asgary *et al. (*2005) ont montré que les flavonoïdes protègent les GR de l'hémolyse par inhibition de l'oxydation des groupements thiol (–SH) des membranes érythrocytaires par le tetrathionate. Fiorani *et al.* (2002) et Fiorani *et al.* (2003) ont démontré que la myricétine et la quercétine s'accumulent en grandes quantités dans les GR et agissent en tant que substrats intracellulaires des enzymes anti-oxydantes à activité oxydo-réductase trans-membranaires.

## 3.5. Les polyphénols de *P. atlantica* et *P. lentiscus* :

Plusieurs travaux, principalement sur les huiles essentielles, ont été réalisés sur les substances naturelles de *P. atlantica et P. lentiscus* (Barazani *et al.,* 2003; Benhammou *et al.,* 2008 ; Aït Saïd *et al.,* 2011 b ; Arab *et al.,* 2014).

En effet, Aït Saïd *et al.* (2011a) ont étudié la variabilité intra-population des terpénoïdes de *P. atlantica*. Ils ont conclu à une augmentation de la concentration terpénique en fonction du degré d'aridité.

Les travaux de Benabderrahmane *et al.* (2009) et ceux Benabdallah *et al.* (2015) sur la même espèce, ont révélé d'importantes activités anti-microbiennes des extraits d'huiles essentielles de résine et des feuilles, vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes et fongiques.

Dans le but d'évaluer les activités anti-oxydante et anti-bactérienne, Benhammou *et al.* (2008) ont réalisé des chromatographies sur couches minces d'extraits éthanoliques de ces deux espèces et ont pu révéler, sous UV à 254 nm, des flavonols (couleurs jaunes), des acides phénoliques (fluorescence bleue), des flavones (violet), des anthocyanes (couleur rouge), de

l'acide gallique et l'acide para-coumarique. Des activités anti-oxydante et anti-microbienne élevées de ces extraits vis-à-vis des plusieurs souches bactériennes ont été mises en évidence.

Selon ces auteurs, ces activités sont probablement en relation avec la structure des polyphénols contenus dans les extraits. Belyagoubi-Benhammou *et al.* (2014) ont évalué l'activité anti-oxydante des flavonoïdes du fruit de *P. atlantica* en relation avec le solvant d'extraction. Cette étude a révélé une meilleure activité anti-oxydante de la fraction acétate d'éthyle comparativement à la fraction butanolique. Benamar *et al.* (2010) ont, quant à eux, obtenu une forte concentration en polyphénols dans les feuilles et une activité anti-cholinestérasique très importante des extraits.

Cinq génotypes de *P. atlantica* subsp. *Kurdica* ont été étudiés par l'équipe de Hatamnia (2014) pour évaluer le profil phénolique et l'activité anti-oxydante dans différentes parties du fruit (le noyau, l'enveloppe et la graine). Ils ont trouvé des différences significatives dans les teneurs en polyphénols de différentes parties du fruit des génotypes étudiés. En outre, les noyaux des différents génotypes renfermaient de l'acide ascorbique, l'acide p-coumarique et l'acide syringique.

Les travaux de l'équipe de Romani *et al.* (2002) sur les polyphénols des feuilles de *P. lentiscus* dans la région de Toscane (Italie) ont abouti à trois classes majeurs de polyphénols: (i) l'acide gallique et dérivés (galloyl de glucose et acide quinique), (ii) les glycosides de flavonol (notamment les glycosides de myricétine et quercétine); et les (iii) anthocyanines. la

La plus forte concentration concerne la première classe (5,3 % de matière sèche), suivie par la deuxième classe (1,5 %) pendant que Rodriguez-Perez *et al.*, (2013) dans leurs travaux sur un échantillon de feuilles prélevé sur un site de Bejaïa, dans lesquels, ils ont identifié et quantifié les principaux constituants phénoliques notamment le glycoside de myricétine, de catéchine, de glucogalline et de gallate de quercitrine.

Vaya et Mahmood (2006), en analysant les flavonoïdes foliaires de *P. lentiscus* d'Israël, ont non seulement confirmé la présence de myricétine comme flavonoïde majoritaire mais ont également révélé la présence de kaemphérol en quantité appréciable, composé dont l'absence déjà été signalée par Romani *et al.* (2002) est considéré comme caractère distinctif d'écotypes.

Tattini *et al.* (2006) ont tenté d'expliquer les mécanismes intégrés de réponse à l'action combinée de la salinité et des radiations solaires élevées en estimant entre autres, la peroxydation lipidique en relation avec l'accumulation des tannins hydrolysables et les flavonoïdes. Leurs résultats indiquent, d'une part la peroxydation lipidique plutôt induite par le stress salin que par le rayonnement solaire et d'autre part, une augmentation de la part de carbone alloué aux polyphénols en réponse aux deux stress combinés.

# *Deuxième partie : Partie expérimentale*

# *Matériel et méthodes*

# I. Matériel et méthodes :

## 1. Etude des polyphénols chez *P. atlantica* et *P. lentiscus in situ* :

Le travail expérimental de cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou et du Laboratoire des Substances Bioactives (LSBA) du Centre de Biotechnologie, Technopole de Borj Cedria de Tunisie.

Il s'articule autour de l'étude des polyphénols de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* du point de vue variabilité, écophysiologie et biologie.

### 1.1. Présentation des stations d'échantillonnage :

L'échantillonnage a été réalisé entre juin et août 2014. Les feuilles de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* ont été récoltées à partir de six différentes stations (figure 17).

**Figure 17: Situation géographique des stations d'échantillonnage (Source : Google earth, 2015 modifiée)**

### 1.1.1. Données climatiques et coordonnées géographiques:

Les coordonnées géographiques prises en utilisant le GPS Garmin 12XL et les principales caractéristiques climatiques de ces stations ont été résumées dans le tableau III.

**Tableau III. Principales coordonnées géographiques et climatiques des stations d'étude (Source** Le temps, 2015**)**

| Station | Latitude | Longitude | Altitude (m) | Tm (°C) | Précipitations ann. (mm) | Q2 | Etage bioclimatique |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Azeffoun (Littoral) | 36°53'N | 4°25'E | 50 | 6,91 | 880 | 124,72 | Subhumide doux |
| Ouzera | 35°21'N | 2°57'E | 577 | 5,1 | 638 | 79,44 | subhumide doux |
| Tarik Ibn Ziad | 35° 94'N | 2° 8' E | 787 | 6,62 | 525,47 | 54,53 | Semi-aride doux |
| Thniet El Had | 35°52'N | 1°56'E | 1353 | -0,07 | 429 | 41,97 | Semi-aride froid |
| Sidi Boutouchent | 35°50' N | 1°59'E | 1240 | 0,64 | 444 | 43,23 | Semi-aride frais |
| Ain Oussara | 35°21' N | 2°57' E | 734 | 3,16 | 349 | 35,96 | Aride frais |

Le quotient pluviométrique d'Emberger a été calculé à partir des données climatiques mensuelles de 2003 à 2013 (Températures minimales et maximales, pluviométrie) (source : Le temps, 2015) en utilisant la formule suivante.

$$\mathbf{Q_2 = 2000P / M^2 - m^2}$$

P : la pluviométrie annuelle en mm.
M : la température maximale du mois le plus chaud en °C.
m : la température minimale du mois le plus froid en °C.

Ce $Q_2$ et les températures minimales ont servi à situer les stations d'échantillonnage dans le climagramme d' Emberger (figure 18).

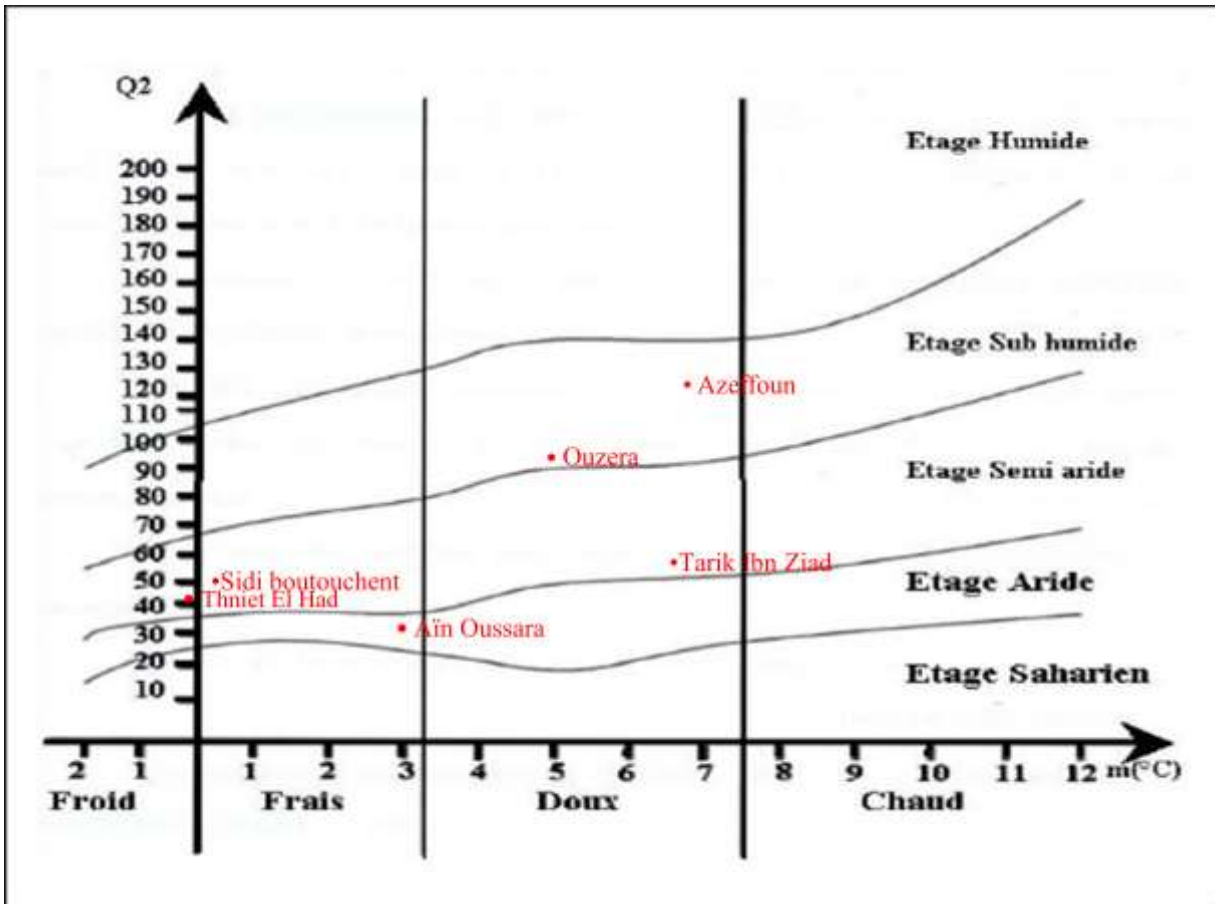



**Figure 18**: **Climagramme d'Emberger et situation des stations d'échantillonnage**

### 1.1.2. Caractéristiques pédologiques :

Le sol, support permettant l'ancrage des racines, constitue une source de nutriments minéraux pour la plante. Il est donc important de le caractériser afin d'examiner l'éventuelle influence sur les caractéristiques phénoliques des différentes populations de *P. atlantica* et de *P. lentiscus.* Aux quatre points cardinaux au pied de chaque arbre et à environ 10 cm de profondeur, nous avons prélevé un échantillon de sol d'environ 500 g.

Au laboratoire, les échantillons ont été séchés à l'air libre pendant une dizaine de jours puis tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de diamètre. Les 10 échantillons de chaque station sont ensuite réunis pour constituer un échantillon composite qui servira à la mesure du pH, à l'estimation des teneurs en matière organique (MO) et en calcaire total ($CaCO_3$) en utilisant les méthodes décrites par Mathieu et Pieltain (2003). Toutes les manipulations ont été réalisées trois fois.

### 1.1.2.1. Mesure du pH du sol :

Le pH du sol est un indice précieux, il donne une idée sur le degré de saturation du complexe adsorbant par les bases échangeables, le sol étant d'autant plus acide qu'il est plus éloigné de la saturation. Il a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre sur une suspension sol avec un rapport sol/eau de 2/5.

### 1.1.2.2. Dosage de la matière organique :

La matière organique assure de nombreuses fonctions au niveau du sol. Elle met à disposition pour la plante, par minéralisation, d'éléments nutritifs (Huber et Schaub, 2011). La teneur en matière organique du sol a été déterminée par la méthode de déshydratation puis calcination à 450 °C (perte au feu).

La perte au feu exprimée en pourcentage de la masse de l'échantillon déshydraté (après chauffage à 220 °C) est donnée par l'expression suivante :

$$\textbf{Perte au feu en \% } = (M_1\text{-}M_2/M_1\text{-}M_0)\ x100$$

$M_0$ : poids de creuset

$M_1$ : poids du creuset+l'échantillon déshydraté à 220 °C

$M_2$ : Poids du creuset+l'échantillon après incinération à 450 °C.

### 1.1.2.3. Dosage du calcaire total :

Le $CaCO_3$ a été déterminé par la méthode volumétrique, qui consiste à attaquer l'échantillon de sol par un volume en excès d'acide chlorhydrique (1N) pour décomposer les carbonates. L'HCl en excès est titré avec du NaOH (0,5N) en présence de phénolphtaléine à 1 %.

### 1.1.3. Echantillonnage du matériel végétal :

Au niveau de chaque station, des feuilles bien développées pour *P. atlantica*, espèce caducifoliée et des feuilles âgées d'une année pour *P. lentiscus*, espèce sempervirente, ont été prélevées sur dix arbres séparément. Ce matériel végétal est laissé sécher à température ambiante, à l'abri de la lumière afin d'éviter la photo-oxydation des polyphénols et à l'abri de l'humidité puis finement broyé.

Pour l'échantillonnage de *P. lentiscus*, nous avons tenu compte à la fois du gradient altitudinal et de la continentalité de la station ; ainsi la station d'Azeffoun est à 50 m d'altitude et influencée par le climat marin ; alors que les stations Ouzera et Tarik Ibn Ziad situées à 577 et 787 m respectivement, sont influencées par le climat continental.

En ce qui concerne l'échantillonnage de *P. atlantica*, il a été tenu compte à la fois de l'exposition et de l'altitude. En effet, les stations Thniet El Had et Sidi Boutouchent distantes d'environ 20 km et Situées à altitudes quasi identiques (1353 et 1240 m respectivement) sont

à exposition nord pour la première et sud pour la seconde tandis que la station d'Aïn Oussara se situe à 734 m d'altitude.

### 1.3. Extraction des polyphénols :

#### 1.3.1. Extraction des polyphénols totaux :

L'efficacité de l'extraction des polyphénols (PPT) dépend de plusieurs paramètres tels que la température, le type de solvant, la durée de l'extraction et le rapport solide/solvant (Li *et al.,* 2010). Plusieurs solvants sont habituellement utilisés (le méthanol, éthanol, eau, acétate d'éthyle). La nature chimique des polyphénols influe également. Dans notre étude nous avons opté pour une méthode la plus écologique, la plus simple, rapide et la moins couteuse (Stamatopoulos *et al.*, 2014), méthode décrite par Mahmoudi *et al.* (2013) et Mocan *et al.* (2014) avec quelques modifications. Ainsi, 0,5 g de matière végétale est mélangé avec 10 ml d'éthanol 70 %. Après agitation au vortex, le mélange est porté au bain-marie à une température de 50 °C pendant 20 min. La solution est centrifugée à 2400 g pendant 20 mn, le surnageant récupéré est ajusté à 10 ml avec de l'éthanol 80 % et stocké à – 20 °C.

#### 1.3.2. Extraction des aglycones phénoliques :

L'extraction des aglycones (Ag1) est réalisée selon protocole décrit par Robles *et al.* (2003) (figure 19). Ainsi, 1 g de poudre de feuilles du *P. lentiscus* est mis en suspension dans 80 ml HCl 2N. Le traitement acide permet de générer les aglycones (Agl) à partir des O-glycosylflavones ; la liaison C-O-C entre le sucre et la génine étant fragile. La solution est portée à une température de 80 °C, dans un bain-marie, pendant 50 mn avec insufflation d'air toutes les 10 min. cette méthode permet également l'extraction de certaines substances phénoliques qui se retrouvent à l'état libre.

La solution refroidie pendant environ 30 min, est filtrée et les Agl. sont extraits après lavage avec 2 x 60 ml puis 1 x 40 ml de diéthyl éther. Les différentes fractions éthérées sont ensuite réunies puis évaporées à l'air libre. Le résidu sec est repris dans 5 ml de l'éthanol puis conservé au congélateur à l'abri de la lumière. L'opération est répétée trois fois.

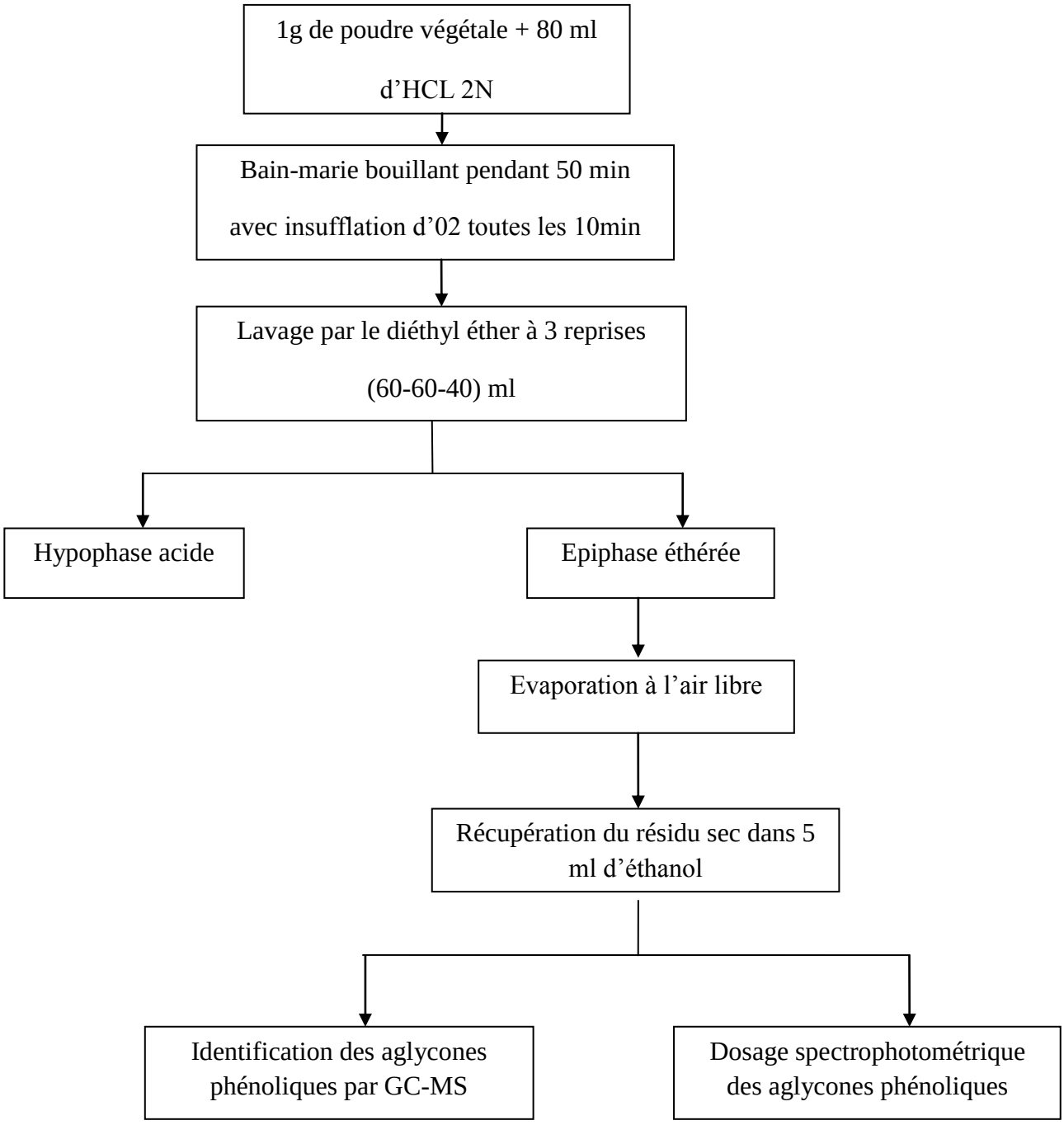



**Figure 19: Protocole d'extraction des aglycones phénoliques flavoniques**

## 1.3. Analyse qualitative des polyphénols :

### 1.3.1. Analyse des polyphénols par HPLC :

Les extraits éthanoliques des feuilles de *P. lentiscus* et *P. atlantica* (10 µl) ont été analysés par HPLC agilent série 1100 avec détecteur UV et une colonne Hypersil ODS-C18 5µm ; 4 x 250 mm. Comme phase mobile nous avons utilisé deux systèmes de solvants :

- Solvant A : acétonitrile
- Solvant B : eau distillée acidifiée à 0.2 % d'acide formique

Le gradient d'élution est réalisé selon le programme indiqué dans le tableau IV, avec un débit de 0,7 ml/min.

**Tableau IV. Gradient d'élution pour l'analyse HPLC**

| Temps (min) | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
|---|---|---|
| 6 | 35 | 65 |
| 9 | 60 | 40 |
| 14 | 80 | 20 |
| 25 | 100 | 0 |
| 30 | 35 | 65 |

### 1.3.2. Analyse des aglycones phénoliques par GC-MS:

L'analyse des aglycones est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectroscopie de masse (MS.) La GC est l'une des techniques de détection et de séparation de mélanges d'échantillons complexes les sensibles et les plus fiables de séparation (Ronald Hites, 1997 *in* Al-Huqail *et al.,* 2015). Elle permet la séparation et l'identification par comparaison aux spectres de références (Dhivya et Sivakumar, 2013).

L'analyse GC-MS des extraits éthérés de *P. lentiscus* et *P. atlantica* ont été réalisées sur un chromatogramme Agilent Technologies 6890 N couplé à un détecteur de masse Agilent 7890A, couplé à un spectroscope de masse 5972C Agilent avec un détecteur d'ions par impact électronique (70 eV). Une colonne HP-5 MS capillaire (30 m X 0,25 mm, revêtue d'un film silicone méthylphényle 5 % et diméthylpolysiloxane 95 %, de 0,25 µm d'épaisseur; Hewlett-Packard, CA, USA) a été utilisée.

La dérivatisation avant GC-MS est une étape préparatoire essentielle, ce qui réduit la polarité et augmente la volatilité et en même temps, la stabilité thermique des métabolites. Elle est basée sur des réactions silylation par N, N-bis (triméthylsilyl) trifluoro-acétamide (BSTFA) (figure 20) ; alkylation ou acylation (Little, 1999 ; Orata, 2012).

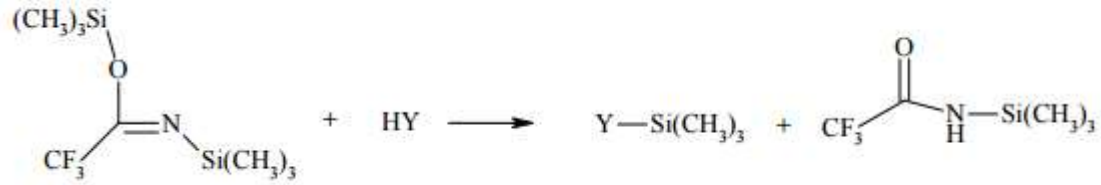



**Figure 20** : **Réaction de silylation en utilisant du N, N-bis (triméthylsilyl) trifluoro-acétamide (Little, 1999)**

Ainsi, une aliquote de 100 µl d'extrait a été séchée sous un flux d'azote gazeux, à laquelle 200 µl de BSTFA et 100 µl de pyridine ont été ajoutées. Après agitation au vortex pendant 1min, le mélange est mis à incuber pendant 30 mn à 60 °C puis évaporé sous flux d'azote. Le résidu sec est dissout dans 200 µl de chloroforme et 10 µl sont injectées dans l'appareil. La température de la colonne a été programmée pour passer de 150 à 220 °C avec une vitesse de 7 °C/min puis à 300 °C à une vitesse de15 °C/min et maintenue constante pendant 15 min. Le gaz vecteur est l'hélium N60 avec un débit de 0,9 ml/min. L'identification des composés a été basée sur des spectres de masse par rapport à Wiley Registre 9e édition / NIST 2011 bibliothèque spectrale de masse.

### 1.4. Analyse quantitative :

#### 1.4.1. Dosage des polyphénols totaux:

Les teneurs en PPT des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et *P. atlantica* ont été déterminées en utilisant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu basée sur le principe d'oxydo-réduction (Singleton et Rossi, 1965). Ainsi une aliquote de 100 µl de chaque extrait a été mélangée avec 2,5 ml de folin-ciocalteu (1/10), puis 2,5 ml de $NA_2CO_3$ (7, 5%) ont été ajoutées après 5 min. Les mélange ont été agités et mis à incuber pendant 60 mn à température ambiante et à l'obscurité. Les absorbances ont été lues à 740 nm au spectrophotomètre (UV-2450). Les teneurs en PPT sont exprimées en mg équivalent acide gallique/g de matière sèche (MS).

### 1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux:

Les flavonoïdes totaux (FT) dans les extraits éthanoliques sont dosés selon la méthode décrite par Li *et al.* (2010). Elle est basée sur la nitration du noyau aromatique portant un groupe catéchol (Pekal et Pyrzynska, 2014). Brièvement, 0,5 ml d'extrait a été introduit dans un tube à essai. Le volume a été complété à 3 ml avec de l'eau distillée puis 0,3 ml de $NaNO_2$ (1:20) a été ajouté. Après 6 min, 0,3 ml d'$AlCl_3$ (1 :10) ont été ajoutés puis 6min plus tard, 4,0 ml de NaOH 1M ont été additionnés. Le tout a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. La solution obtenue a été bien agitée et incubée pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 506 nm au spectrophotomètre (UV-2450). Les concentrations en FT sont déduites à partir d'une courbe étalon préparée à partir de la rutine et calculées en mg équivalent de rutine.

### 1.4.3. Dosage des aglycones flavoniques :

La méthode utilisée est celle décrite par Robles *et al.* (2003). Cette méthode est spécifique des flavones et flavonols (Pekal et Pyrzynska, 2014). Un volume de 100 µl de la solution à tester est mis à réagir pendant 20 min dans 5 ml d'une solution éthanolique de d'AlCl3 à 1 % (m/v). Les aglycones flavoniques sont dosés par spectrophotométrie d'absorption UV visible à une longueur d'onde de 435 nm (mesure de la formation du complexe coloré intervenant en présence des ions $Al_3^+$).

Les concentrations en aglycones flavoniques sont déduites à partir de la courbe étalon utilisant la quercétine comme référence et calculées en mg équivalent de quercétine.

### 1.4.4. Dosage des tannins hydrolysables:

Les tannins hydrolysables (TH) dans les extraits éthanoliques de feuilles de *P. lentiscus* et *P. atlantica* ont été déterminés par la méthode de Willis et Allen (1998) *in* Çam et Hisil (2010). Brièvement, 0,2 ml de chaque extrait ont été mélangés à 1,8 ml de $H_20$ et 1 ml $KIO_3$ à 2,5 %. Les mélanges réactionnels ont été agités au vortex puis mis à incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Les absorbances des mélanges de couleur rouge ont été lues à 550 nm contre une gamme étalon d'acide tannique. Les teneurs en tanins hydrolysables ont été exprimés en équivalent d'acide tannique mg/g de matière sèche.

## 2. Effet de la contrainte hydrique sur certains paramètres biochimiques et physiologiques des semis de *P. lentiscus* :

### 2.1. Matériel végétal et conditions de culture :

Les fruits de *P. lentiscus* ont été récoltés à Azazga (versant nord de la Kabylie) et Bouira (versant sud de la Kabylie) en décembre 2013. Les deux lots de fruits contenant les graines ont été trempés dans l'eau pendant 24 heures pour éliminer la pulpe.

Les graines flottant (non viables) ont été éliminées et le reste a été scarifié à l'acide sulfurique concentré pendant 15 min et immédiatement rincés et conservés sous l'eau du robinet pendant 24 heures pour éliminer toute trace d'acide sulfurique (Ates, 2011).

100 graines par population ont été mises à germer sur deux couches de papier filtre humidifié avec 10 ml d'eau distillée dans des boîtes à Petri à température ambiante. Après germination des graines et au stade deux feuilles (vingt-quatre plants pour chaque provenance ont été plantés dans des sacs contenant environ 2 kg de sol prélevés au pied de *P. lentiscus*. Les sacs ont été placés dans une serre à l'Institut de Technologie Moyen Agricole Spécialisé de Boukhalfa (ITMAS), dans des conditions naturelles, avec des températures atteignant 51,6 ± 3,84 °C en moyenne, et arrosés quand c'est nécessaire, environ deux fois par semaine.

Les semis des deux provenances ont été disposés sur huit rangés alignées par alternance (Azazga/Bouira). Au début du stress (15 Août 2014), la moitié des plants ont été soumis au stress hydrique par arrêt d'arrosage, également par alternance de rangées (stressés/non stressés), en suspendant l'arrosage. Après 12 jours de stress, deux plants ont péri. Nous avons donc repris l'arrosage 2 fois à deux jours d'intervalle puis repris le stress pendant 12 jours.

Après cette période, à l'exception des échantillons utilisés pour l'analyse de la teneur relative en eau, tous les plants ont été sacrifiés, mis dans des sachets en plastique étiquetés et congelés à -40 °C pour l'analyse des paramètres physiologiques. Les feuilles ayant servi au dosage des polyphénols ont été séchées à l'étuve à 40 °C jusqu'à stabilisation du poids sec, puis finement broyées.

### 2.2. Mesure de la teneur relative en eau :

Cinq plants stressés et cinq non stressés ont été choisis au hasard. La teneur relative en eau (TRE) a été évaluée selon la méthode décrite par Seelig *et al*. (2009) et calculée par la formule suivante:

$$\mathbf{TRE\ (\%) = [(PF-PS)/(PT-PS)]\cdot 100}$$

PF : Poids frais des échantillons de feuilles obtenu par pesée immédiatement après la récolte en utilisant une balance de précision;
PT : Poids à la pression de turgescence obtenu après la saturation des échantillons dans de l'eau distillée pendant 24 heures ;
PS : Poids sec obtenu après séchage des échantillons au four à 80°C pendant 24h.

### 2.3. Extraction et dosage de la proline :

Pour chaque échantillon, 100 mg de feuilles fraiches ont été mélangés avec 2 ml de méthanol 80 % (v/v) et ont été chauffés au bain marie à 85 °C pendant 1 heure. Après refroidissement, 1 ml d'extrait a été mélangé avec 1 ml de réactif de ninhydrine acide et 1 ml acide acétique glacial. Le mélange a été bien agité pendant quelques secondes et incubé au

bain marie à 100 °C pendant 30 min. Après refroidissement dans un bain de glace pendant 3 minutes, 5 ml de toluène ont été ajoutés à la solution et le mélange a été agité au vortex. La phase supérieure du mélange déshydraté avec un peu de sulfate de sodium anhydre a été recueillie. Les absorbances des échantillons ont été mesurées. La teneur en proline a été mesurée par méthode colorimétrique décrite par Thiam *et al.* (2013). La quantité de proline exprimée en mg de poids frais a été déterminée contre une courbe d'étalon proline. L'absorbance de la phase de toluène a été lue à 528 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-VIS Shimadzu UV mini-1240.

### 2.4. Dosage des pigments chlorophylliens :

Des échantillons de feuilles congelées (0,2 g) ont été analysés pour les teneurs en chlorophylle. Les feuilles ont été broyées dans 3 ml d'acétone 80 % froid en utilisant un mortier et un pilon pré-congelés. Les extraits d'acétone ont été centrifugés à 3000 g pendant 10 min à 4 °C et les culots obtenus ont été extraits une deuxième fois puis une troisième fois à l'acétone froide 80 % froid. Les surnageants successifs ont été rassemblés et centrifugés à 4000 g pendant 5 min. Les absorbances des extraits ont été lues à 626, 647, 663 et 470 nm en utilisant spectrophotomètre UV / VIS. Les teneurs en chlorophylle a (Chl a), chlorophylle b (Chl b) et caroténoïdes (Car) ont été calculées selon Porra (2002) :

$$\textbf{Chl a } (\mu g.ml^{-1}) = 12.68\ Abs_{664} - 2.65\ Abs_{647} + 0.30\ Abs_{626}$$
$$\textbf{Chl b } (\mu g.ml^{-1}) = -4.23\ Abs_{664} + 23.62\ Abs_{647} - 3.26\ Abs_{626}$$
$$\textbf{Car } (\mu g.ml^{-1}) = 5\ Abs_{470} + 2.846 Abs_{664}) - 14.876 Abs_{647}.$$

### 2.5. Mesure de la peroxydation lipidique :

Le malondialdéhyde (MDA) est considéré comme un indicateur de la peroxydation des lipides membranaires (Hodges *et al.*, 1999). Il est formé par auto-oxydation et dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés, amorcée par des radicaux dans les cellules (SINGH *et al.*,2015). C'est l'un des sous-produits de la peroxydation lipidique les plus abondants. Dans le milieu acide à chaud, le MDA forme un complexe avec l'acide thiobarbiturique, un chromagène rose-rouge avec un maximum d'absorption à 532 nm.

100 mg d'échantillons de feuilles fraiches ont été homogénéisées dans 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA à 0,1 %). L'homogénat a été centrifugé à 10 000 x g pendant 5 min à 4 °C. Une aliquote de 1 ml de surnageant a été mélangée avec 4 ml d'acide thiobarbiturique 0,5 % (TBA) préparée dans du TCA 20 %.Une autre aliquote de 1ml de surnageant a été ajoutée à 4ml de TCA 20 % sans ajouter de TBA. Les mélanges ont été incubés à 95 °C pendant 30 min.

Après arrêt de la réaction dans un bain de glace pendant 5 min, les échantillons ont été centrifugés à 10 000 xg pendant 10 minutes à 25 °C. Les absorbances des surnageants ont été lues à 440, 532 et 600 nm au spectrophotomètre UV-VIS Shimadzu UVmini-1240. Les taux de peroxydation ont été calculés en utilisant les formules données par Hodges *et al*. (1999) :

**$A= [(Abs_{532+TBA})-(Abs_{600+TBA})-(Abs_{532-TBA})-(Abs_{600-TBA})]$**
**$B=[(Abs_{440}+TBA)-(Abs_{600}+TBA)*0,0571)]$**
**Equivalent MDA ($nmole.ml^{-1}$)= $(A-B/157000)*10^6$**

- 535 nm : longueur d'onde d'absorption de MDA
- 600 et 440 nm : longueur d'onde d'absorption des substances autre que MDA (carbohydrates de et anthocyanes)
- 157000 : coefficient d'absorption molaire de MDA

## 3. Activités biologiques des polyphénols :

### 3.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols extraits des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus*

#### 3.1.1. Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium :

Dans le test du pouvoir réducteur, les composés antioxydants transforment le ferricyanure de potassium ($Fe^{3+}$) en ferrocyanure de potassium ($Fe^{2+}$). Celui-ci réagit avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferreux qui a un maximum d'absorption à 700 nm (Jayanthi et Lalitha, 2011).

Le pouvoir réducteur des PPT et des Agl des feuilles de *P. Lentiscus* L. a été déterminé selon la méthode décrite par Ebrahimazadeh *et al.* (2010).

Ainsi, 2,5 ml d'extrait à des concentrations croissantes en PPT et en Agl (0 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 et 80 µg/ml dans l'eau distillée) ont été mélangés avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferrocyanure du potassium ($K3Fe(CN)_6$) (1 %). Le mélange ainsi obtenu a été bien agité et incubé à 50 °C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés au mélange. Après centrifugation à 3000xg pendant 10 min, 2,5 ml de surnageant ont été mélangés à un même volume d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) (0,1 %). L'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. L'opération a été répétée trois fois.

#### 3.1.2. Activité anti-radicalaire :

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ($DPPH^{\bullet}$) est un radical azoté libre stable de couleur violacée, disponible commercialement sous forme d'un solide. Lorsqu'il est mis en solution dans l'éthanol, le radical $DPPH^{\bullet}$est caractérisé par un maximum d'absorbance à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical $DPPH^{\bullet}$est réduit (figure 21) et change de couleur en virant au jaune. Ce produit de la réaction ne possède plus de bande d'absorption autour de 517 nm. Ce test consiste donc à suivre la variation de l'absorbance à 517 nm, caractéristique du radical $DPPH^{\bullet}$, en présence du composé étudié (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Molyneux, 2004).

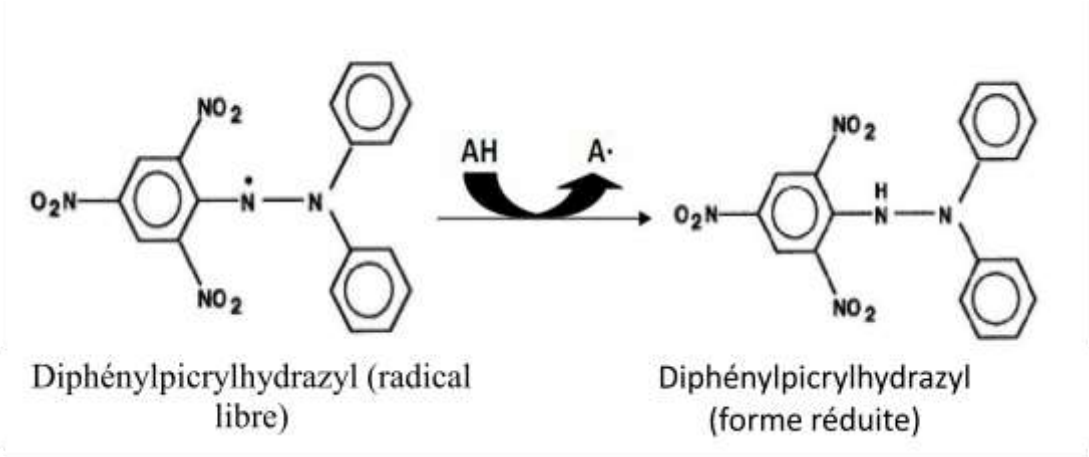



**Figure 21 : Structure de DPPH° (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004).**

La capacité de piégeage du DPPH$^{\bullet}$ par les CP a été déterminée suivant la méthode décrite par Brand-Williams *et al.* (1995). Brièvement, 20 µl d'Agl. et de PPT extraits à partir des feuilles et des fruits à différentes concentrations (80, 100, 150 et 250 µg/ml dans l'éthanol) ont été ajoutés à 2 ml d'une solution de DPPH$^{\bullet}$(0,1mMdans de l'éthanol).La cinétique de piégeage a été suivie jusqu'à atteindre l'état stationnaire. Les absorbances ont été lues comme suit : après 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 4,5 et 5,5 min puis toutes les min jusqu'à l'obtention d'un plateau. Le kaempférol et la rutine ont été utilisés comme standards pour les Agl et les et les PPT respectivement.

La capacité de piégeage du radical DPPH° a été calculée en utilisant la formule **suivante :**

**Le % de piégeage du radical DPPH° = $[(A_0-A_1)/A_0] \times 100$**

$A_0$: absorbance du contrôle à temps t = 0 en absence des composés à tester.
$A_1$: absorbance de l'échantillon à temps t (temps nécessaire pour atteindre l'état stationnaire), il varie suivant la substance testée et sa concentration

### 3.1.3. Activité anti-hémolytique :

#### 3.1.3.1. Principe :

Ce test permet de suivre l'évolution positive ou négative d'un antioxydant sur l'état des défenses d'un individu vis-à-vis des espèces radicalaires. Il s'agit de soumettre à une agression oxydante une suspension d'hématies. Les globules rouges vont donc mettre en jeu leurs équipements antioxydants pour lutter contre l'agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu (Okoko et Ere, 2012). Ainsi l'évaluation de l'activité anti-hémolytique se fait par mesure spectrophotométrique de l'hémoglobine à 540 nm. Dans ce test, la lyse érythrocytaire est induite par le $H_2O_2$ (10 mM dans PBS).

### 3.1.3.2. Matériel biologique :

Pour nos expériences, nous avons utilisé du sang humain prélevé à partir de donneur sain. L'activité anti-hémolytique des flavonoïdes a été déterminée selon le protocole décrit par Tedesco *et al.*, (2001). Brièvement, le sang récolté sur héparine ou EDTA (Ethyle diamine Tétra-Acétique) a été centrifugé à 3000xg pendant 3 min à 4 °C. Le surnageant constitué de plasma, de plaquettes et de la couche de globules blancs (buffycoat) a été délicatement ôté au moyen d'une pipette pasteur, les érythrocytes séparés (le culot) ont été lavés 2 fois par centrifugation (3000xg, 3min, 4 °C) dans le tampon phosphate salin (PBS) pH 7,4. Les érythrocytes lavés sont re-suspendus dans le même volume de tampon et sont conservés à 4 °C dans les limites de 6 heures de leur préparation.

100 µl de solution d'érythrocytes (5 %, v/v) sont incubés pendant 10min à 37 °C avec 100 µl de l'azide de sodium (Na $N_3$1mM) afin d'inhiber l'activité de la catalase (Tedesco et *al.*, 2001 ; Shiva-Shankar-Reddy *et al.*, 2007). 100 µl de substances à tester à différentes concentrations (50 ; 100 et 150 µg/ml) ont ensuite été ajoutés ainsi que 100 µl de $H_2O_2$ (10 mM dans PBS). La rutine et la quercétine ont été utilisées comme témoins.

Le mélange réactionnel des différents échantillons a été agité doucement, puis incubé à 37 °C au bain marie pendant 3 h. Une agitation douce est réalisée chaque 30 min.

Après incubation, chaque échantillon a été dilué par 8 volumes de PBS puis centrifugé à 3000xg pendant 3 min. Les surnageants ont été récupérés et les absorbances lues à 540 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(A_0 - A) / A0] \times 100$$

Avec :

$A_0$ : absorbance du contrôle en absence de la substance à tester.

A : absorbance de l'échantillon en présence de la substance à tester.

Pour chaque test, nous avons réalisé 3 essais.

## 3.2. Activité anti-leishmanienne des polyphénols de *P. atlantica et de P. lentiscus* :

Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire de substances bioactives au Centre de Biotechnologie de Bordj Cedria de Tunisie avec la collaboration de R. Essid et sous la responsabilité du Professeur F. Limam.

### 3.2.1. Culture du parasite :

Les formes amastigotes de *L. major* (LCO3) et *L. infantum* (LV20) ont été isolées à partir de patients tunisiens atteints de leishmaniose cutanée et cultivées à 26 °C sur milieu NNN (Novy, McNeal, Nicolle). Après une période d'incubation de 3 semaines, les amastigotes se différencient en promastigotes. Ces derniers sont transférés sur milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml pénicilline complétées avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS).

### 3.2.2. Test anti-promastigote :

Une fois la densité cellulaire de $10^6$ cellules/ml a été atteinte, les promastigotes de *L. infantum* et *L. major* ont été lavés deux fois avec une solution tampon saline phosphate (PBS) et centrifugés à 2500 tpm pendant 15 min. Pour évaluer l'activité anti-promastigote, 100 µl de la culture de parasites ont été remises en suspension dans une plaque de culture tissulaire à 96 puits, dans un milieu de culture frais selon la méthode de Gonzalez *et al.* (2005). En bref, les parasites sont incubés à $10^5$ cellules/puits pendant 72 h à 26 °C en présence de PPT et d'Agl en solution dans 1 % de DMSO (de $10^{-3}$ à $10^3$ µg/ml). Le DMSO a été utilisé à une concentration finale ne dépassant jamais 1 % qui est non toxique pour les parasites (Oliveira *et al.*, 2011). Le PBS stérile et 1 % de DMSO ont été utilisés comme témoins négatifs et l'amphotéricine B (98 % de pureté, de Sigma-Aldrich, USA) comme témoin positif.

### 3.2.3. Mesure de viabilité cellulaire :

#### 3.2.3.1. Principe de la réaction

L'activité anti-leishmanienne des PPT et des Agl de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* sur les formes promastigotes de L. *infantum* et de *L. major* a été déterminée à l'aide de la technique colorimétrique du Sel de tétrazolium [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium bromure] (MTT) décrite par Sereno et Lemesre (1997). Le test est basé sur la transformation du MTT en formazan par réduction enzymatique (le cycle tétrazolique qu'il contient est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan). La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

#### 3.2.3.2. Mode opératoire :

10 µl de MTT (Sigma Aldrich, USA) à 10 mg/ml ont été ajoutés à chaque puits de la microplaque à 96 puits. Celle-ci est mise à incuber pendant 4 h à 30 °C. La réaction a été arrêtée par addition de 100 µl de solution contenant de l'isopropanol 50 % (v/v) et de dodécylsulfate de sodium (SDS ; pH 5,4) à 10 %(v/v) dans chaque puits pour dissoudre le formazan insoluble formé après réduction de tétrazolium. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 560 nm en utilisant un lecteur de plaque ELISA (Synergy HT, Bio-TEK). Tous les essais ont été effectués en trois répétitions.

Le pourcentage d'inhibition (I) a été calculé en utilisant la formule suivante:
I (%) = 100× (absorbance des cellules en absence d'extrait - absorbance des cellules en présence d'extrait) / absorbance des cellules en absence d'extrait.

La viabilité des promastigotes a été évaluée par la détermination de la concentration en PPT et Agl qui inhibe la moitié de la population cellulaire (IC50) calculée à partir de la courbe d'inhibition sigmoïde (Tasdemir *et al.*, 2006).

Les extraits sont classés comme étant très actifs pour IC50 <10 µg/ml, actifs pour 10<IC50< 50µg/ml, modérément actifs pour 50<IC50<100µg/ml et non actifs pour EC50>100 µg/ml (Osorio *et al.*, 2007).

### 3.2.4. Test de cytotoxicité et index de sélectivité des polyphénols totaux et des aglycones phénoliques:

La cytotoxicité des PPT et des Agl a été évaluée en utilisant la lignée cellulaire macrophage RAW 264.7, maintenue dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de PBS en présence de pénicilline (50 U/ml) et streptomycine (50 µg/ml). La viabilité cellulaire a été évaluée après incubation avec du bleu trypan 0,1 % en comptant les cellules colorées au microscope optique.

Les macrophages ont été étalés sur une plaque à puits multiples 96 à $10^5$ cellules/puits, on laisse adhérer pendant une nuit à 37 °C sous $CO_2$ à 5 %; Après avoir renouvelé le milieu contenant 10 µl de PPT et de d'Agl à deux séries de dilutions (500 à 3.9 µg/ml pour les PPT) et (20 à 0.189 µg/ml pour les Agl), les cellules ont été incubées pendant 72 h à 37 °C et la viabilité a été estimée par le test MTT. L'indice de sélectivité (SI) est un paramètre définissant l'équilibre entre la cytotoxicité et l'activité biologique de l'extrait correspondant à la concentration active la plus élevée sans toxicité et exprimée par le rapport IC50 macrophage/IC50 du parasites (Weninger *et al.*, 2001). Pour une valeur de SI supérieure à 10, l'extrait est considéré comme efficace contre les parasites et sans danger pour le macrophage (Camacho *et al*., 2008; Monzote *et al.*, 2014).

## 4. Analyse statistique:

Les résultats sont représentés comme la moyenne ± l'écart type d'au moins trois essais. Les valeurs sont analysées au moyen du test de l'analyse de variance (ANOVA) à 1 facteur avec le logiciel STATISTICA. Les résultats sont considérés comme significativement différents à $p<0,05$. Le test de Newman- Keurls permet de distinguer les groupes.

Le test de Pearson permet d'étudier les corrélations entre variables ; il a été réalisé à l'aide du logiciel R.

L'analyse en composante principale (ACP), analyse multidimensionnelle exploratoire, permet de déterminer les corrélations éventuelles entre les différentes variables quantitatives (PPT, FT, TH et Agl) et entre ces variables et les individus-échantillons. Elle a été réalisée à l'aide du logiciel STATBOX.

Dans le cas de l'étude de l'activité anti-leishmanienne, les résultats obtenus ont été analysés par le test de régression non linéaire dose-réponse à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5 San Diego, Etats-Unis.

# *Résultats et discussion*

# 2. Résultats et discussion :

## 1. Caractéristiques pédologiques des stations d'étude :

Le sol, importante composante des facteurs environnementaux, exerce une forte pression sélective et d'adaptation des espèces végétales et par conséquent sur la distribution de la végétation (Rajakaruna et Boyd, 2008). En effet, le sol permet l'ancrage des plantes grâce à l'emprise qu'il exerce sur les racines ; comme il affecte la disponibilité et l'absorption des nutriments et de l'eau (Cécillon, 2009).

Les caractéristiques pédologiques des différentes stations, représentées par le pH, MO et $CaCo_3$, sont résumées dans le tableau V.

Le pH de ces stations présente des différences significatives (p=0.03) ; il varie de neutre pour les stations de Thniet El Had et de Sidi Boutouchent (Tissemsilt) avec des valeurs de 6,9 et 7,08 respectivement, à basique pour les stations de Ouzera (Médéa), Aïn Oussara et Ouzera avec 8,76 et 8,8 respectivement. Azeffoun et Tarik Ibn Ziad présentent un pH intermédiaire (7,5 et 7,83 respectivement).

La MO joue un rôle primordial dans la vie de la plante en lui fournissant les nutriments nécessaires et par la rétention d'eau et des cations, comme elle favorise l'agrégation du sol (effet anti-corrosif) (Van Wesemael, 2006). Le pourcentage de la matière organique du sol se situe entre 1,5 et 7 % ; Thniet El Had et Sidi Boutouchent sont les plus riches avec 7 et 5,5% alors qu'Ouzera et Aïn Oussara sont les plus pauvres avec 1,50 et 1,68 % respectivement. Les teneurs en $CaCO_3$ varient de 6,5 à 20 %. Selon la classification de Lozet et Mathieu (1990) cité par Djili *et al.* (1999), à l'exception de celle du sol d'Azeffoun qui en est pauvre avec 6,56 % (p=0,000), les teneurs de toutes les stations sont moyennes ; elles se situent entre 18 et 20 %.

**Tableau V. Caractéristiques chimiques du sol des stations d'échantillonnage**

| Paramètres / Stations | pH | MO (%) | $CaCO_3$ (%) |
|---|---|---|---|
| Azeffoun (AZ) | 7,50±0,1 | 2,38±0,35 | 6,56±0,31 |
| Ouezra (OU) | 8,76±0,1 | 1,5±0,09 | 18,12±2,1 |
| Tarek Ibn Ziad (TIZ) | 7,83±0,06 | 2,85±0,39 | 19,37±1,56 |
| Thniet El Had (TEH) | 6,90±0,1 | 7,08±0,56 | 19,53±0,27 |
| Sidi Boutouchent (SB) | 7,08±0,1 | 5,5±0,33 | 19,50±0,97 |
| Aïn Oussara (AOS) | 8,8±0,1 | 1,68±0,27 | 18,33±0,90 |

## 2. Variabilité phénolique chez *P. atlantica* et *P. lentiscus :*

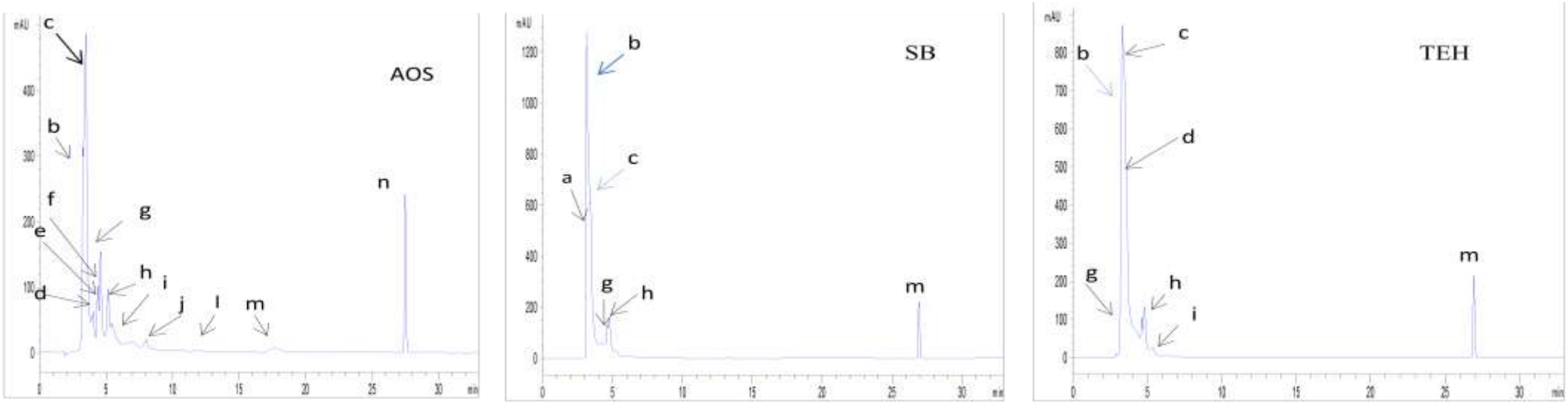
### 2.1. Variabilité qualitative :

Les résultats de l'analyse qualitative des extraits éthanoliques de feuilles de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* obtenus par HPLC sont présentés dans les figures 22 et 23. Nous avons pu détecter 13 composés et identifier 12 (Tableau VI); l'acide gallique, la catéchine hydratée et l'apigénine ont été identifiés dans tous les échantillons des deux espèces. L'acide chlorogénique n'a été détecté que dans les échantillons de *P. atlantica* des stations Thniet El Had et d'Aïn Oussara. La daïdzéine, une isoflavone, n'a été détectée que chez *P. lentiscus* au niveau des stations d'Azeffoun et d'Ouzera. Nous constatons également que les échantillons de Aïn oussara sont qualitativement les plus riches ; 12 composés y ont été révélés. En outre, certains composés présents à des concentrations assez importantes ou faibles n'ont pas été identifiés.

Ces résultats montrent que *P. atlantica* est qualitativement plus riche que *P. lentiscus.* En effet, 13 composés ont été détectés chez la première et uniquement 6 composés chez la deuxième. *P. lentiscus*, espèce sclérophylle et symperverante à feuilles coriaces, orienterait ses voies métaboliques d'une part vers la synthèse des constituants de la cuticule et d'autre part vers la synthèse des terpènes. Selon Aït Saïd (2011), *P. lentiscus* totaliserait 49 composés terpéniques contre 41 seulement chez *P. atlantica.* Cette dernière étant caducifoliée et à cuticule plus fine (Al-Saghir *et al.,* 2006), privilégierait la synthèse de composés phénoliques plutôt que d'autres constituants.

Pour faire face aux conditions d'aridité de l'été, les espèces méditerranéennes peuvent adopter soit une stratégie de tolérance permettant à la plante de mener normalement ses fonctions vitales, même dans les conditions de pénurie d'eau, ou de résistance (évitement) par la chute des feuilles, la réduction de l'appareil végétatif, la réduction de la transpiration par le biais de la fermeture des stomates, etc. (Bussotti *et al.*, 2005).

Les espèces du genre *Pistacia,* espèces xérophytiques, présentent diverses formes d'adaptation (Al-Saghir *et al.,* 2006 *;* Aït Saïd, 2011) reflétant une bonne plasticité phénotypique.




**Solvant A** : Acétonitrile acide formique

Solvant B : eau à 0.2%

Programme :

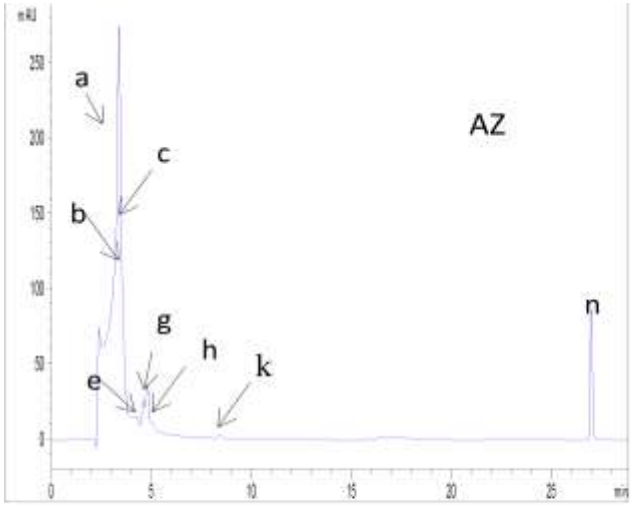
| Temps (mn) | % A | % B |
|---|---|---|
| 6 | 35 | 65 |
| 9 | 60 | 40 |
| 14 | 80 | 20 |
| 25 | 100 | 0 |
| 30 | 35 | 65 |

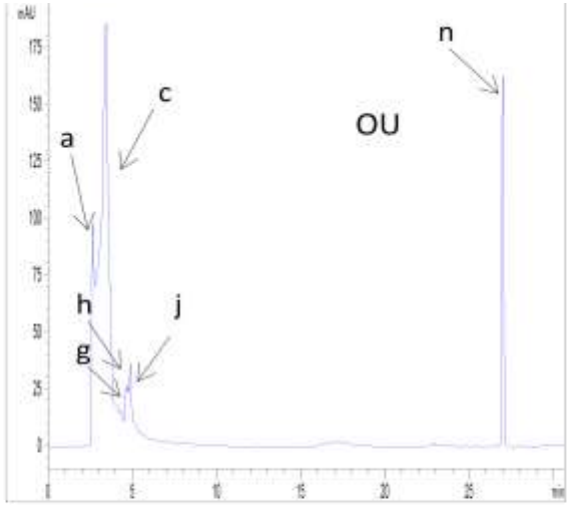
Colonne : Hypersil™ ODS C18 (5 µm ; 4mmx250 mm)
Débit : 0,7ml.mn$^{-1}$
Longueur d'onde = 280nm

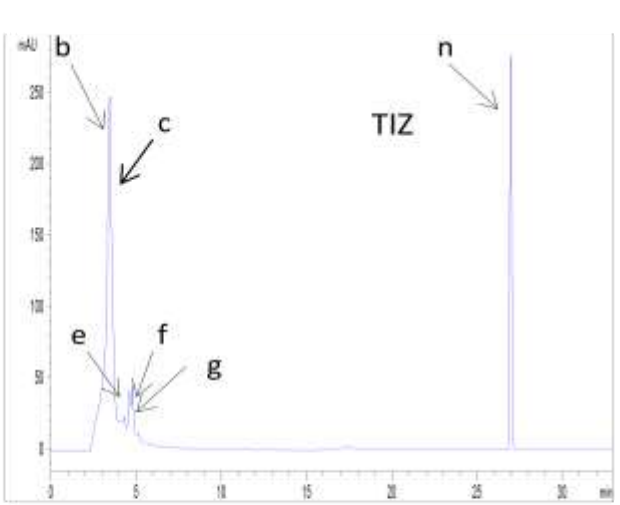
**Légende:**

a: Non identifié
b: Apigénine
c: Acide gallique
d: Non identifié
e: Acide tannique
f: Acide procatéchique
g: Catéchine hydratée
h: Non identifié
i: Acide chlorogénique
J: Non identifié
k: Daïdzeine
l: Acide trans cinnamique (3-Phenylacrylic acid)
m: Naringinine
n: Hydroxytoluène (standard interne)

**Figure 22: Profils HPLC des extraits éthanoliques de *P. atlantica***
(AOS :Aïn Oussara, SB : Sidi Boutouchent,TEH :Thniet El Had)




**Solvant A** : Acétonitrile Solvant B : eau à 0.2% acide formique

Programme :

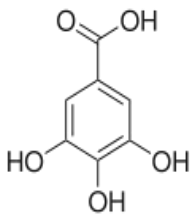
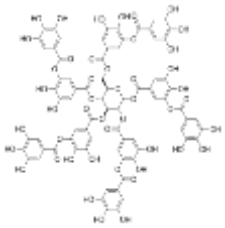
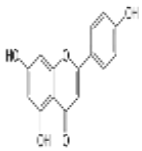
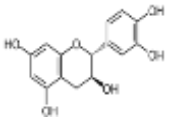
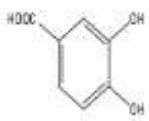
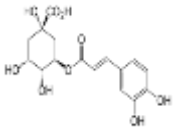
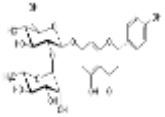
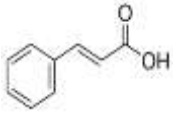
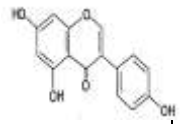
| Temps (mn) | % A | % B |
|---|---|---|
| 6 | 35 | 65 |
| 9 | 60 | 40 |
| 14 | 80 | 20 |
| 25 | 100 | 0 |
| 30 | 35 | 65 |

Colonne : Hypersil™ ODS C18 (5 µm ; 4mmx250 mm)
Débit : 0,7ml.mn$^{-1}$
Longueur d'onde = 280nm

Légende:
a: Non identifié
b: Apigénine
c: Acide gallique
d: Non identifié
e: Acide tannique
f: Acide proto-catéchique
g: Catéchine hydratée
h: Non identifié
i: Acide chlorogénique
J: Non identifié
k: Daïdzeine (4',7-Dihydroxyisoflavone)
l: Acide trans cinnamique
m: Naringinine [(2S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one]
n: Hydroxytoluène (standard interne)

**Figure 23: Profils HPLC des extraits éthanoliques de : *P. lentiscus*** (AZ: Azeffoun (Tizi-Ouzou), OU : Ouzera (Médéa), TIZ : Tarik-Ibn-Ziad (Tissemsilt)

**Tableau VI. Composés phénoliques révélés et identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques de *P. atlantica* et de *P. lentiscus*** (AZ: Azeffoun, OU : Ouzera (Médéa), TIZ : Tarik-Ibn-Ziad (Tissemsilt)

| Espèce | Structure des PC / Stations | Acide gallique  | Acide tannique  | Apigénine  | Catéchine hydrate  | 3,4 dihydroxybenzoïque  | Acide chlorogénique  | Naringinine  | Ac.Trans Cinnamique  | Daidzéine  |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *P. atlantica* | Thniet El Had (TEH) | + | + | + | + | | + | | | |
| | Sidi Boutouchent (SB) | + | | + | + | | | | | |
| | Aïn Ouessassa (AOS) | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| *P. lentiscus* | Azeffoun (AZ) | + | + | + | + | | | | | + |
| | Ouezra (OU) | + | + | + | + | | | | | + |
| | Tarik Ibn Ziad (TIZ) | + | + | + | + | | | | | |

Très peu d'études ont été réalisées sur les polyphénols des deux espèces (Vaya et Mahmood, 2006 ; Rodriguez-Perez *et al.*, 2013) et pas du tout, à notre connaissance, sur leur variabilité phénolique.

Des dérivés de l'acide gallique et de myricétine ont déjà été identifiés chez *P. lentiscus* (Romani *et al.*, 2002 ; Rodriguez-Perez *et al.*, 2013) alors que la daidzéine, l'acide chlorogénique et l'apigénine n'ont pas été signalés par ces auteurs.

Les dérivés de lutéoline, de quercétine et kaempférol n'ont pas été révélés dans nos échantillons par HPLC soient parce qu'ils sont absents ou présents à des concentrations non détectables dans les échantillons ou encore parce qu'ils n'absorbent pas à 280 nm. En effet, les dérivés de flavonols absorbent entre 350-386 nm (Harborne *et al.*, 1998).

Romani *et al.* (2002) ont signalé l'absence de dérivés de kaempférol et ont conclu à un caractère distinctif de P. *lentiscus* dans la famille des Anacardiaceae. Vaya et Mahmood (2006) et Rodriguez-Perez *et al.* (2013) en ont détecté dans les échantillons de *P. lentiscus* provenant d'Israel et de Béjaia respectivement, ce qui suggérerait la présence de plusieurs écotypes.

La situation est plus tranchée et plus nette en examinant les profils des extraits éthérés, obtenus après hydrolyse acide de la poudre de feuilles *P. atlantica* et de *P. lentiscus*, par GC-MS, présentés dans les figures 24et 25 et récapitulés dans le tableau VII. Plus de vingt cinq composés ont été détectés dont treize identifiés ; cinq (5) ne se retrouvent que chez *P. lentiscus.*

Selon Cheynier (2012), la diversité des structures est associée à des rôles spécifiques dans les plantes, d'où leur distribution spécifique.

En effet, Phlorogucinol, produit de dégradation de phloredzine, est connu pour ses propriétés de régulateur de croissance (Sarkar et Naik, 2000 ; Steephen *et al*., 2010 ; Gosch *et al*., 2010) et sa stimulation de la prolifération des pousses axillaires (Steephen *et al*., 2010). Ce composé est absent dans tous les échantillons de *P. atlantica*, espèce à croissance arborescente.

L'acide β-phénylacétique (AAP), substance naturelle à activité auxinique, retrouvée chez de nombreuses espèces, a été isolée des racines de *Taraxacum* par Power et Browning en 1912 (Sajid *et al*., 2012). C'est un stimulateur de la croissance et il intervient dans la morpho-régulation (Czerpak *et al*., 1994 ; Giridhar *et al*., 2003).

Bien que les activités biologiques de l'AAP soient inférieures à celles de l'acide indol acétique (AIA), les niveaux endogènes de l'AAP sont beaucoup plus élevés que ceux de AIA dans divers tissus de la plante chez de nombreuses espèces (Sajid *et al.*, 2012 ; Sugawara *et al*., 2015). L'AAP favoriserait, chez *Pisum sativum,* la prolifération des racines secondaires (Schneider *et al*., 1985 *in* Sugawara *et al.*, 2015).

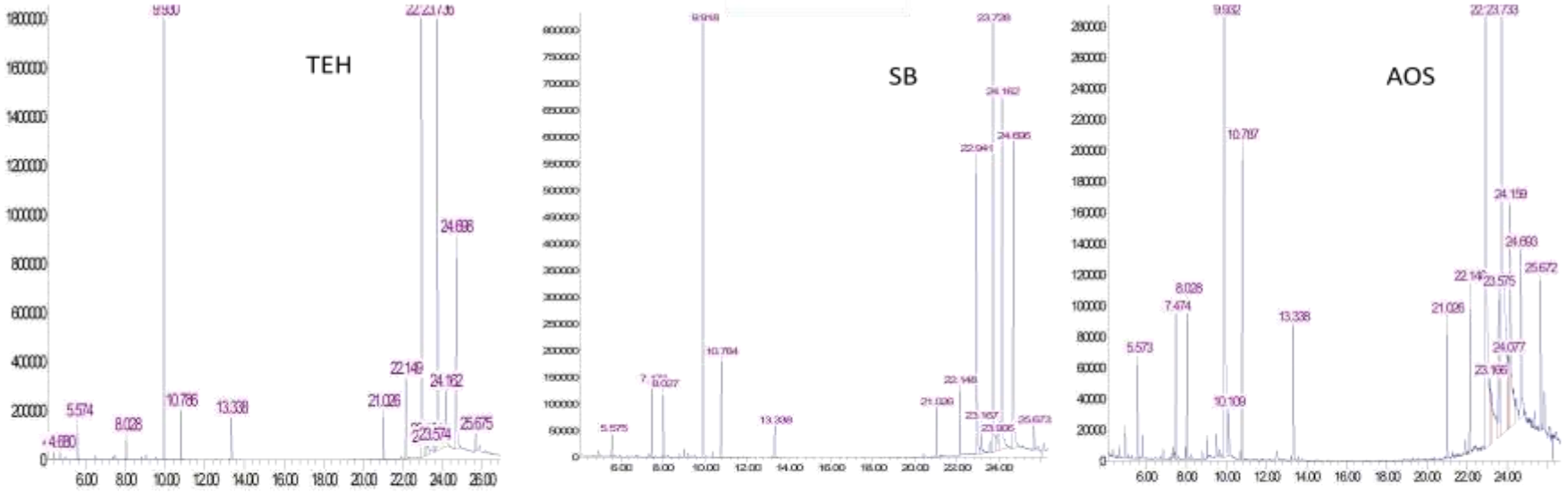
Selon Kiran Ghanti *et al.* (2009), l'AAP induit la prolifération des pousses chez le pois chiche. Sa présence spécifiquement dans les feuilles de *P. lentiscus* serait alors

probablement en relation avec la prolifération des racines secondaires et des branches. En outre, l'AAP est un inhibiteur du phototropisme en réagissant avec les flavines (Vierstra et Poff, 1981).

Par ailleurs, selon Piotrowska-Niczyporuk et Bajguz (2014), l'AAP stimulerait le système anti oxydant enzymatique et non enzymatique chez *Chlorella vulgaris*.

Le 4-Hydroxy-phenyl-ethanol (tyrosol) détecté chez les deux espèces, a également été retrouvé chez de nombreuses espèces végétales (Zine El Aabidine *et al.,* 2010 ; Mas *et al.,* 2014) ainsi que chez certains agents pathogènes tels que *Candida albicans* (Albuquerque et Casadeval, 2012). La résistance de l'olivier à *Spilocaea oleagina* serait due au tyrosol et ses dérivés (Zine El Aabidine *et al.,* 2010 ; Mas *et al.,* 2014). Il a été identifié comme étant une phytotoxine impliquée dans la résistance de l'orme à la graphiose causée par *Ceratocystis ulmi* (Venkatasubbaiah *et al.,* 1991).

L'acide shikimique, un intermédiaire de la voie de biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine, de l'acide cinnamique et ses dérivés, a été isolé pour la première fois à partir de l'anis étoilé (*Illicium religiosum*) par Eykman en 1885 (Chen *et al.,* 2014). Son accumulation dans les feuilles de *P. lentiscus* indique qu'il ne représente pas uniquement un intermédiaire de la voie du shikimate mais qu'il serait probablement un produit final à rôle physiologique. En effet, selon Aldesuquy et Ibrahim (2000), l'acide shikimique retarderait la sénescence des feuilles en stimulant la biosynthèse des chlorophylles.



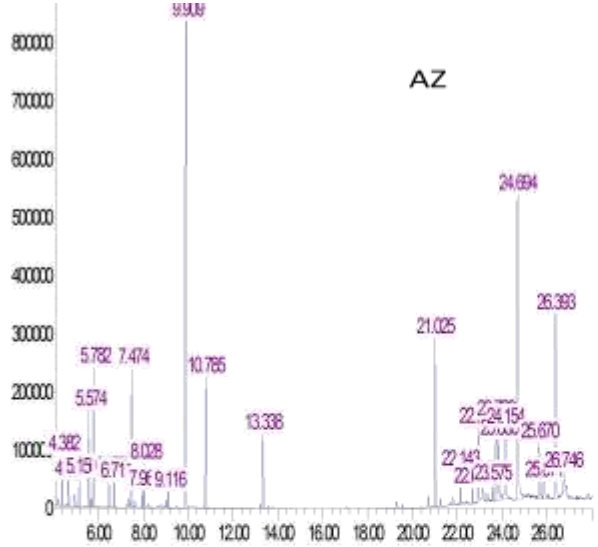

Température initiale 150 °C
Température maximale 325°C
Programme;
150°C pendant 1 min
7°C/min jusqu'à 220°C pendant 5 min
5°C/min jusqu'à 300°C pendant 15 min

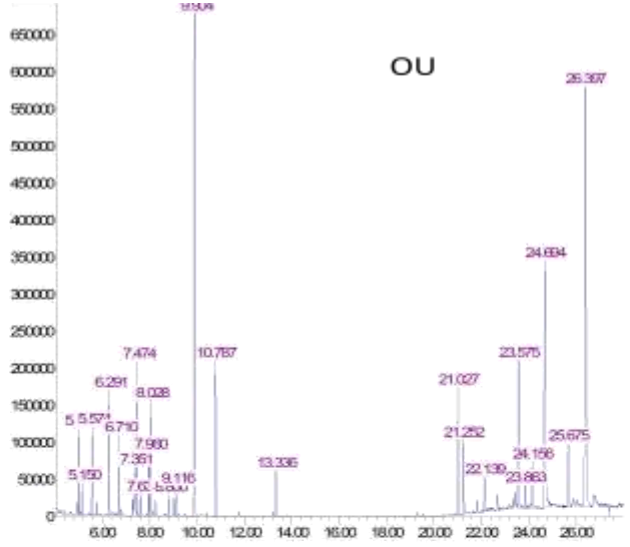
Pression 13.332 psi
Débit 1 mm.min$^{-1}$
Vitesse moyenne 38.051 cm.sec$^{-1}$

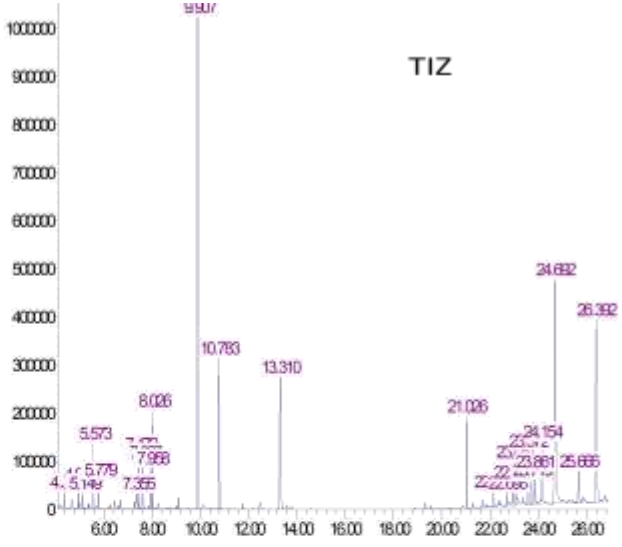
Gaz vecteur: Hélium N 60 avec un débit 0,9 ml.mn$^{-1}$

Column Agilent 19091S-433: 2169.66548 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm

**Figure 24 : Profils GC-MS des extraits éthanoliques obtenus après hydrolyse acides des composés phénoliques des feuilles des populations de *P. atlantica*** (TEH : Thniet El Had, SB : Sidi Boutouchent, AOS : Aïn Oussara)




Température initiale 150 °C
Température maximale 325°C
Programme;
150°C pendant 1 min
7°C/min jusqu'à 220°C pendant 5 min
5°C/min jusqu'à 300°C pendant 15 min

Pression 13.332 psi
Débit 1 mm.min$^{-1}$
Vitesse moyenne 38.051 cm.sec$^{-1}$

Gaz vecteur: Hélium N 60 avec un débit 0,9 ml.mn$^{-1}$

Column Agilent 19091S-433: 2169.66548 HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 325 °C: 30 m x 250 µm x 0.25 µm

**Figure 25: Profils GC-MS des extraits éthanoliques obtenus après hydrolyse acide des composés phénoliques des feuilles de *P. lentiscus*** (AZ : Azeffoun, OU : Ouzera , TIZ : Tarik Ibn Ziad)

**Tableau VII. Aglycones phénoliques identifiés dans les extraits éthérés de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* par GC-MS**

| Espèces | *P. atlantica* | | | | *P. lentiscus* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tm (min) | Thniet El Had | Sidi boutouchent | Aïn Oussara | Azeffoun | Ouezra | Tarik Ibn Ziad |
| 4-Hydroxy-phenyl-ethanol (Tyrosol) | 4.95 | + | + | + | + | + | + |
| acide β - Phenyllacetique | 5.15 | | | | + | + | + |
| acide p-Hydroxy-benzoïque | 5.57 | + | + | + | + | + | + |
| Phloroglucinol | 5.78 | | | | + | + | + |
| Ac. Gentisique | 7.47 | + | + | + | + | + | + |
| Ac. Shikimique | 7.96 | | | | + | + | + |
| Ac. Protocatechique | 8.02 | + | + | + | + | + | + |
| Ac. syringique | 9.021 | + | + | + | | + | |
| 4-hydroxy-Phenyllactate | 9.11 | | | | + | + | + |
| Ac. Gallique | 9.90 | + | + | + | + | + | + |
| Catéchine | 21.82 | | | | + | + | + |
| α-tocophérol | 23.57 | | + | + | + | + | + |
| Quercétine | 24.15 | + | + | + | + | + | + |
| Myricétine | 8.02 | + | + | + | + | + | + |

Les catéchines (flavan-3-ols) ont été signalées comme étant d'importantes substances de défense chez le thé (Liu *et al*, 2012). Selon Bais *et al*. (2003), la (-) catéchine est excrétée dans les exsudats racinaires chez *Centaurea maculosa* et joue le rôle de substance allélopathique inhibant la germination d'espèces natives. Perry *et al*. (2005) quant à eux, lui attribuent un deuxième rôle intra-spécifique par auto-inhibition, inhibition de la croissance racinaire des plantules et inhibition de la germination des graines qui restent dormantes dans le sol pendant plusieurs années. Cette influence inter et intra spécifique permet le contrôle de la structure de la communauté végétale et microbienne (Walker *et al.*, 2003).

La présence de composés appartenant à une classe spécifique de métabolites au niveau du genre peut être particulièrement intéressante dans le domaine de la pharmacognosie (Crockette et Robson, 2011).

Ainsi, l'acide shikimique est utilisé comme réactif en synthèse organique dans les domaines de la recherche fondamentale et appliquée en chimie organique en particulier pour obtenir divers médicaments (Bochkov *et al.,* 2012). Il sert en effet, de matière première dans la synthèse de médicaments antiviraux tels que le tamiflu (Kojima *et al.,* 2015).

Le salidroside, la forme glycosidique du tyrosol est très abondant dans l'extrait de *Rhodiola sachalinensis* (22,54 mg/g d'extrait sec (Choe *et al.,* 2012). Selon Panossian *et al.,* (2014), les multiples propriétés médicinales du genre *Rhodiola* seraient dues au tyrosol et ses dérivés glycosylés.

### 2.2. Variabilité quantitative :

#### 2.2.1. Les principaux composés identifiés par HPLC :

Les concentrations des quatre composés identifiés (Protocatechine + catéchine hydratée, Apigénine+ acide gallique) par HPLC dans les extraits éthanoliques des feuilles de *P. atlantica* et *P. lentiscus* sont données dans le tableau VIII et illustrées par la figure 26.

La figure 26 confirme la richesse de *P. atlantica* comparativement à *P. lentiscus*. Les teneurs les plus élevées en « acide gallique + apigénine » se retrouvent dans les populations de Thniet El Had et Sidi Boutouchent avec 35 et 32 mg/ml respectivement alors que la population d'Aïn Oussara s'individualise avec la teneur la plus élevée en « protocatéchine + catéchine », soit 2 mg/ml. Rappelant que la station d'Aïn Oussara est caractérisée par un climat aride frais et par un sol relativement pauvre en matières organiques (1,7 %) alors que les stations de Thniet El Had et de Sidi Boutouchent sont caractérisées par un climat semi-aride froid à exposition nord pour la première et semi aride frais exposition sud pour la deuxième et par un sol très riche en matières organiques (7 et 5,5 %) respectivement.

**Tableau VIII. Concentrations (mg/ml) des principaux composés identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques des feuilles de populations de *P. atlantica* et *P. lentiscus***

| Espèces | Composés / Stations | Protocatechine + catéchine hydratée | Apigénine+ acide gallique |
|---|---|---|---|
| *P. atlantica* | Thniet El Had (TEH) | 1,61±0.74 | **34,98±7,88** |
| | Sidi Boutouchent (SB) | 1,14±0.49 | **32,10±5.24** |
| | Aïn Oussara (AOS) | **2,33±0,98** | 21,87±5.70 |
| *P. lentiscus* | Azeffoun (AZ) | 1,27±1,79 | 18,85±13,34 |
| | Ouzera (OU) | 0,47±0,04 | 17,00±8.53 |
| | Tarik ibn Ziad (TIZ) | 0,64±0,20 | 14,75±5.24 |

Nous avons également constaté une forte variabilité intra-spécifique, notamment au niveau de la population de *P. lentiscus* d'Azeffoun qui présente 18,85±13,34 mg/ml d'acide «gallique + apigénine» et 1,27±1,79 mg/ml de «protocatéchine + catéchine».

Les populations de *P. lentiscus*, bien qu'elles présentent une variabilité interindividuelle importante, se regroupent formant un nuage allongé selon l'axe II reflétant une variabilité intra spécifique de « protocatéchine+catechine ». Ceci suggérerait la présence d'un seul chimiotype alors qu'en se qui concerne *P. atlantica*, les populations de Thniet El Had et de Sidi Boutouchent sont assez proches l'une de l'autre avec des concentrations assez élevées en composés phénoliques et constitueraient un chimiotype distinct. La population d'Aïn Oussara quant à elle, constituerait un autre chimiotype avec la teneur la plus élevée en «protocatéchine + catéchine».

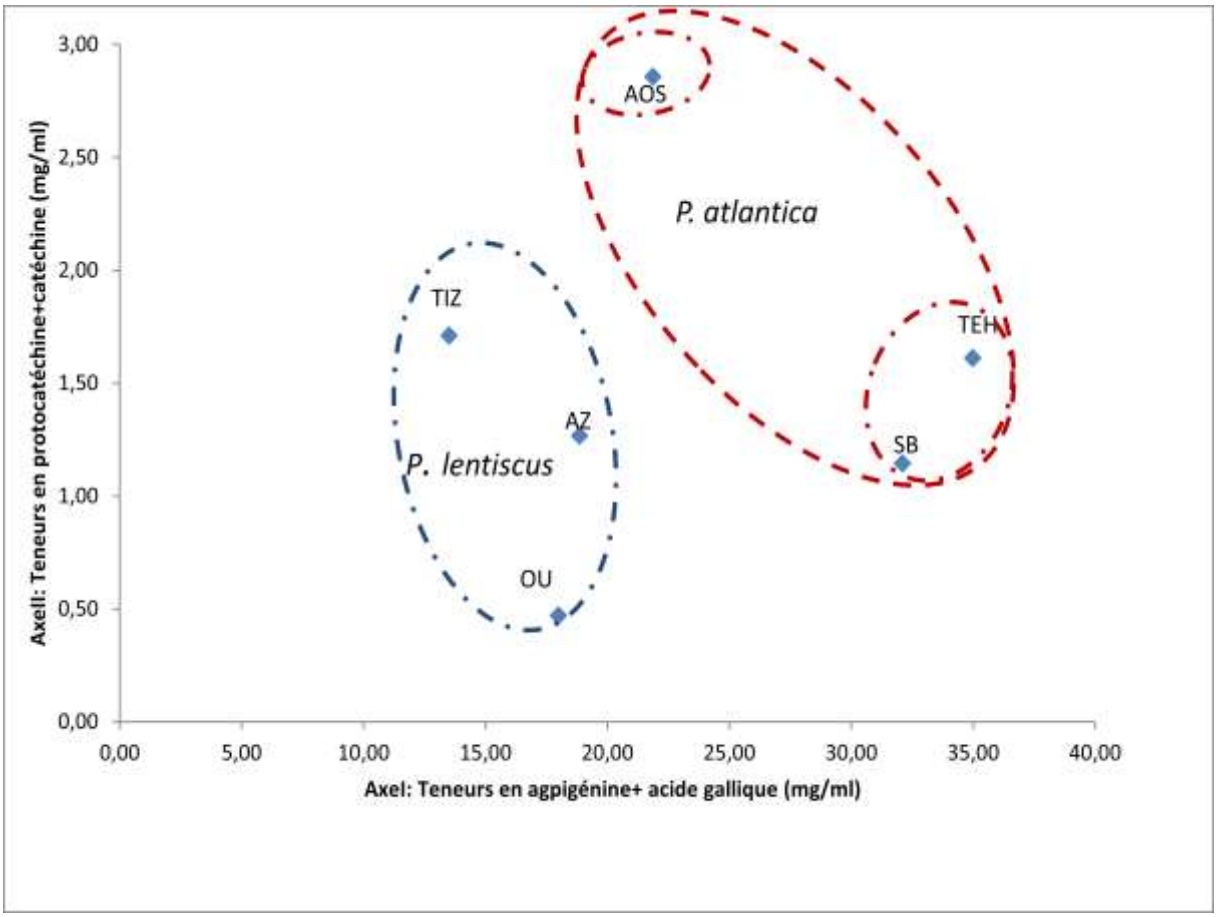



**Figure 26: Représentation graphique des teneurs en principaux composés phénoliques identifiés par HPLC dans les extraits éthanoliques des feuilles des populations de *P. atlantica* et *P. lentiscus.***

TEH : Thniet El Had, SB ; Sidi Boutouchent, AOS : Aïn Oussara, AZ : Azeffoun, OU : Ouzera, TIZ : Tarik Ibn Ziad.

### 2.2.2. Dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux, des tannins hydrolysables et des aglycones phénoliques:

Les teneurs absolues en PPT, en FT, TH dans les extraits éthanoliques ainsi que les Agl obtenus par hydrolyse acide de la poudre de feuilles de *P. atlantica* et *P. lentiscus* sont présentés dans la figure 27 A, B, C et D. La figure 27 A, B et C montre que les concentrations en PPT, FT et TH dans les extraits de feuilles de *P. atlantica* sont plus homogènes ; elles varient de (26,54±2,8) à (28,56±2,6), (5,71±1,1) à (6,67±1,1) et de (156,49 ±9,5) à (165,08±20,2) mg/g de ms respectivement comparativement à celles de *P. lentiscus* statistiquement plus hétérogènes (p=0,0000) [(16,69±2,51) à (21,70±4,4), (8,37±1,1) à (10,34±1,4) et (67,98±9,4) à (127,63±15,5) mg/g de ms] respectivement. Les concentrations en PPT et en TH sont plus élevées dans les extraits éthanoliques de *P. atlantica* (27,69±1,03 et 160,15±4,43) respectivement que dans ceux de *P. lentiscus* (19,30±2,51 et 89,88±32,83). La situation est inversée en ce qui concerne les FT (figure 27 B) où les concentrations sont plus élevées dans les extraits éthanoliques de *P. lentiscus* (9,50±1,2) mg/g de ms. Les concentrations en Agl (figure 27 D) présentent quant à elles, une variation inter et intra

spécifique avec (432,72±158,87) mg/g de ms chez (*P. atlantica* et 444,91±148,58) mg/g de ms chez *P. lentiscus*.

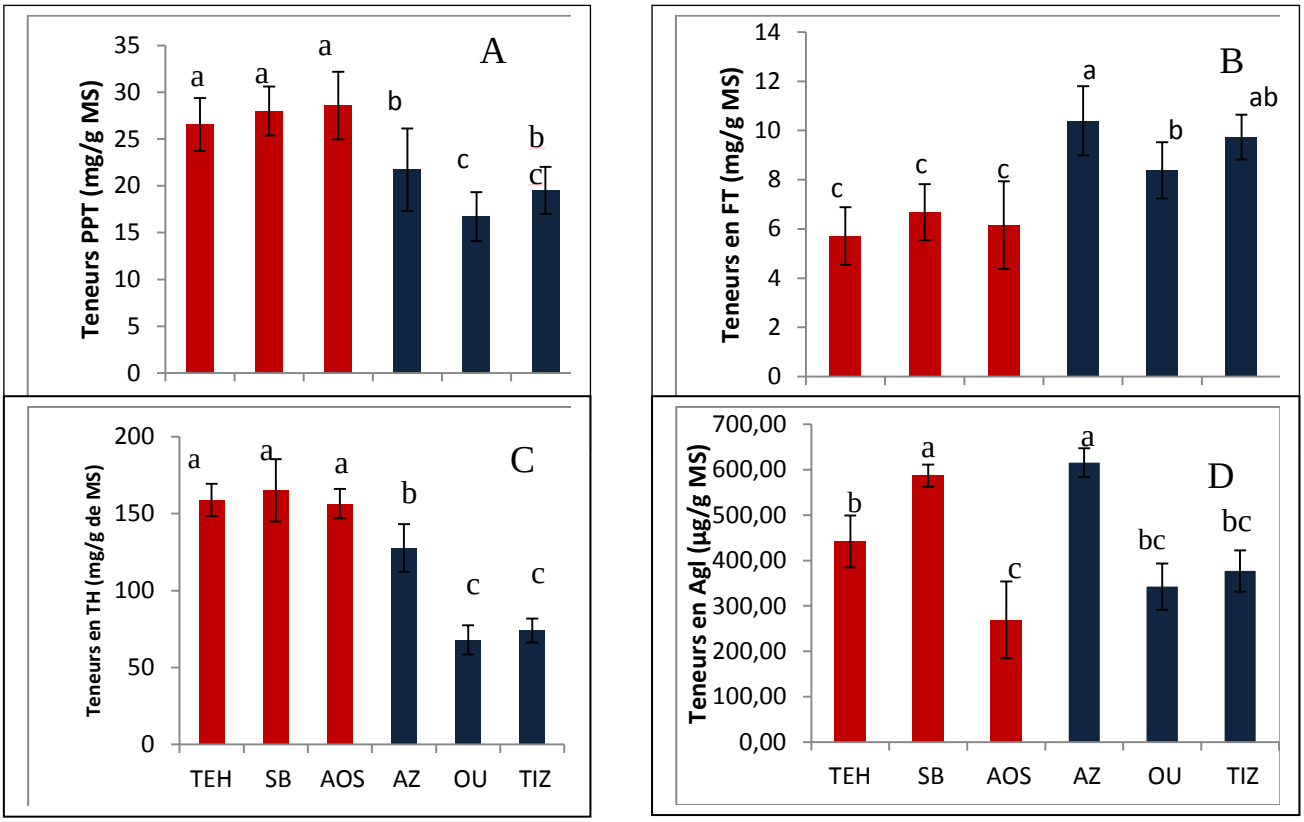



**Figure 27 : Teneurs en polyphénols totaux (PPT) (A), en flavonoïdes totaux (FT) (B), en tannins hydrolysables (TH) (C) des extraits éthanoliques et en aglycones phénoliques des extraits éthérés (D) des populations de *P. atlantica* ( *P. lentiscus* .**

TEH : Thniet El Had, SB ; Sidi Boutouchent, AOS : Aïn Oussara, AZ : Azeffoun, OU : Ouzera, TIZ : Tarik Ibn Ziad. Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$)

L'analyse en composante principale (ACP) sur ces caractères indique que les axes I et II expliquent 75 % d'information. L'axe I est principalement formé par les variables PPT, TH, « Api+acide gal », Alt, $CaCO_3$, MO et pH du sol. Les trois variables PPT, TH, « Api+acide gal » sont positivement corrélées entre elles (R= 0,95, 0,57 respectivement) (tableau IX; figure 28). La variable FT est négativement corrélée avec quasiment l'ensemble des variables phénoliques (R = -0,64, -0,69 et -0,51 respectivement). La variable Alt n'est corrélée qu'avec « Apigénine+acide gallique » (R=0,59) qui caractérise plutôt l'axe II tandis que Q2 est négativement corrélé avec PPT (R=-0,58) et positivement corrélé avec FT. L'axe II est formé par les variables Agl et « protocatéchine + catéchine » qui ne sont pas corrélées (R=-0,39). Ceci suggère que les facteurs climatiques et édaphiques influent fortement sur la synthèse des composés phénoliques.

Cette suggestion est étayée par les résultats de Kraus *et al*. (2004) selon qui les teneurs en polyphénols et en tannins condensés dans les feuilles augmentent fortement sous l'effet de

carence en éléments nutritifs du sol. Les expériences de Giel et Bojarczuk (2011) ont, de surcroit, montré une augmentation dans les concentrations en polyphénols foliaires chez *Rhododendron* avec l'augmentation de la teneur en $CaCo_3$.

Nos résultats concordent avec ceux de Chun-Ming *et al.* (2011) qui constatèrent une augmentation de FT dans feuilles de peuplier avec la chute des températures d'automne.

En examinant de plus près les projections des individus, on constate que les populations de *P. atlantica* de Thniet El Had et de Sidi Boutouchent sont caractérisées par l'axe I avec des teneurs élevées en PPT et TH et des teneurs plus faibles en FT. Ces deux stations sont très proches l'une de l'autre sur le climagramme d'Emberger. La population d'Aïn Oussara est par contre caractérisée par l'axe II et s'isole avec de faibles teneurs Agl et des teneurs élevées en « protocatechine+catéchine ».

La situation est moins nette pour les populations de *P. lentiscus.* Ce qui confirme l'hétérogénéité polyphénolique de l'espèce constatée par l'analyse de la variance (p=0.0000) et par les teneurs des principaux composés dosés par HPLC. Pour cette espèce, on remarque que les populations des stations Ouzera et Tarik Ibn Ziad sont caractérisées par des teneurs assez faibles en PPT, TH et en Agl et des teneurs élevées en FT pendant que la population de la station d'Azeffoun s'éloigne des populations de la même espèce et se rapproche plutôt de la population de *P. atlantica* de la station de Sidi Boutouchent avec des teneurs élevées en Agl.

La figure 29 montre que l'axe I oppose en général les populations de *P. atlantica* caractérisées par de fortes teneurs en PPT, TH et « Api+acide gal » aux populations de *P. lentiscus* caractérisées par de fortes teneurs FT.

Ces variations pourraient être d'origine génétique (Pilepic et Males, 2012) ou environnementale (Siracusa *et al*., 2012).

Selon Gobbo-Neto et Lopes (2007), la réponse des plantes aux différents facteurs environnementaux est en relation avec le rôle de chaque classe de composés phénoliques. Ainsi, les flavonoïdes voient leur synthèse augmentée avec l'intensité des radiations UV alors que les tannins et les acides phénoliques simples qui absorbent à des longueurs d'onde plus courtes, restent inchangés.

**Tableau IX. Matrice des corrélations entre variables**

| | FT | PPT | Agl | TH | Api+Ac. Gal | ProCat+ Cat | Alt | Q2 | CaCO3 | MO | pH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FT | 1 | **-0,64** | 0,23 | **-0,69** | **-0,51** | **-0,56** | -0,45 | **0,5** | -0,06 | -0,2 | -0,06 |
| PPT | **-0,64** | 1 | 0,3 | **0,95** | **0,57** | 0,47 | 0,46 | **-0,58** | **-0,49** | **0,51** | **-0,49** |
| Agl | 0,23 | 0,3 | 1 | 0,33 | 0,1 | -0,39 | -0,09 | 0,28 | **-0,71** | 0,38 | **-0,71** |
| TH | **-0,69** | **0,95** | 0,33 | 1 | **0,58** | 0,44 | 0,39 | -0,42 | -0,45 | **0,5** | -0,45 |
| Api+Ac. Gal | **-0,51** | **0,57** | 0,1 | **0,58** | 1 | 0,36 | **0,59** | -0,36 | -0,46 | **0,66** | -0,46 |
| ProCat+Cat | **-0,56** | 0,47 | -0,39 | 0,44 | 0,36 | 1 | 0,06 | -0,35 | 0,13 | -0,05 | 0,13 |
| Alt | -0,45 | 0,46 | -0,09 | 0,39 | **0,59** | 0,06 | 1 | **-0,76** | -0,46 | **0,79** | -0,46 |
| Q2 | **0,5** | **-0,58** | 0,28 | -0,42 | -0,36 | -0,35 | **-0,76** | 1 | 0,25 | **-0,47** | 0,25 |
| $CaCO_3$ | -0,06 | **-0,49** | **-0,71** | -0,45 | -0,46 | 0,13 | -0,46 | 0,25 | 1 | **-0,86** | **1** |
| MO | -0,2 | **0,51** | 0,38 | **0,5** | **0,66** | -0,05 | **0,79** | **-0,47** | **-0,86** | 1 | **-0,86** |
| pH | -0,06 | **-0,49** | **-0,71** | -0,45 | -0,46 | 0,13 | -0,46 | 0,25 | **1** | **-0,86** | 1 |

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil alpha=0,05 (test bilatéral)

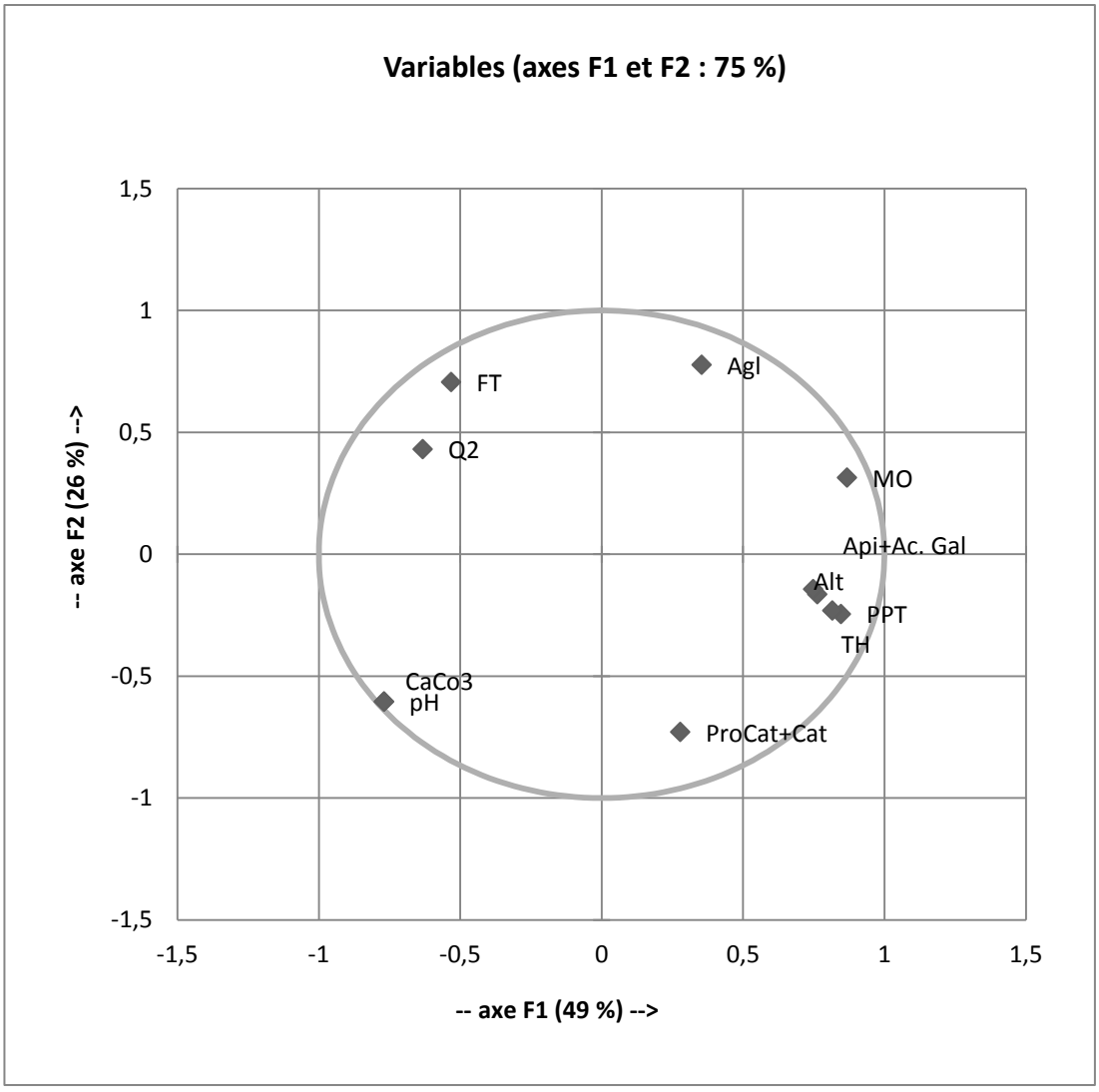



**Figure 28 : Analyse en composante principale des populations de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* en fonction des caractères phénoliques et des caractères pédoclimatiques des stations (projection des variables)**

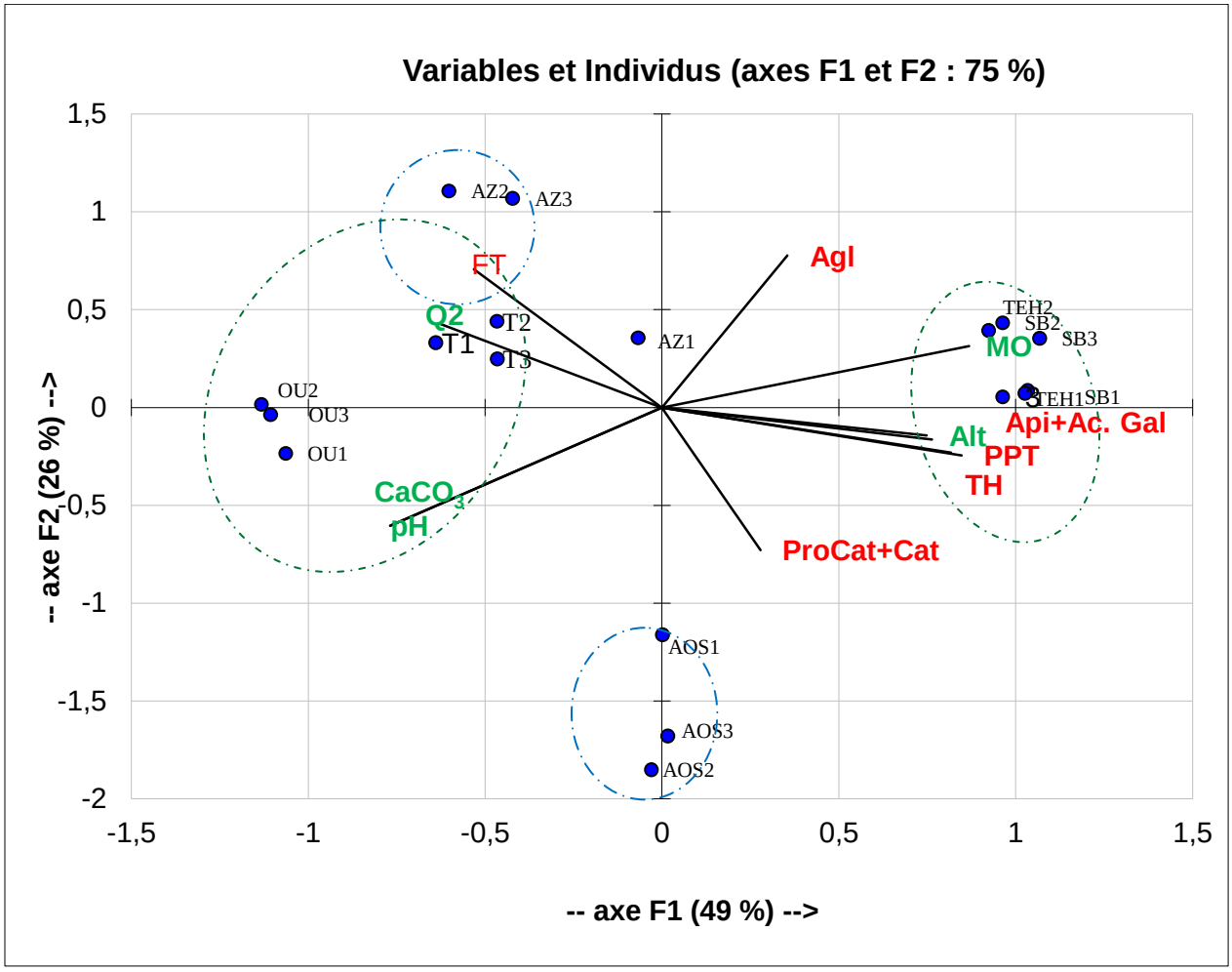



**Figure 29: Analyse en composante principale des PPT, FT, TT et Agl des populations de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* (projection des individus)**

Nos résultats concordent avec ceux de Close *et al.* (2007) qui ont travaillé sur l'acclimatation phénolique d'*Eucalyptus nitens* à l'irradiation UV-A croissante dans un gradient de fertilisants, la réponse n'est pas évidente. En effet, les teneurs en gallotanins augmentent significativement sous l'effet des rayons UV-A et de la carence en fertilisants dans le sol alors que les flavonols ne sont pas influencés.

Ils concordent également avec ceux obtenus par Pilepic et Males (2012) qui ont trouvé des différences significatives entre certains taxa d'*Hypericum.* Ces auteurs, en échantillonnant sur deux années successives présentant des différences climatiques, ont observé des comportements différents selon les espèces; chez certaines, il y a une augmentation des polyphénols totaux, chez d'autres une diminution pendant qu'il n'y a eu aucune différence

significative chez un troisième groupe d'espèces. Les polyphénols synthétisés dans les plantes à travers les voies métaboliques, en réponse aux divers stress biotiques et abiotiques sont en effet, sous contrôle génétique et épigénétique strict (Caretto *et al.*, 2015).

Cirak *et al.* (2014) ont constaté d'importantes variations intra-spécifiques dans les polyphénols d'*Hypericum montbretii* qu'ils attribuent en partie, aux facteurs environnementaux et à la plasticité de l'espèce sans ignorer toutefois la diversité génétique des plantes.

Nikolova et Gevrenova (2006) ont également constaté des variations inter populationnelles d'ordre quantitatif chez deux sous-espèces de *Veronica chamaedrys.* Selon ces auteurs, ces fluctuations seraient en relation avec l'altitude mais que d'autres facteurs pourraient être en cause.

## 3. Effet de la contrainte hydrique sur quelques caractères physiolo

## giques et biochimiques des semis de *P. lentiscus* :

Dans cette partie, nous étudions le comportement physiologique et biochimique des semis de *P. lentiscus* face au stress hydrique dans des conditions expérimentales (figure 30).

**Figure 30**: **plantules de *P. lentiscus* âgées de 7 mois à la fin du stress hydrique** (AT : plantules témoins provenant d'Azazga ; AS : plantules stressées provenant d'Azazga ; BT : plantules témoins provenant de Bouira BS : plantules stressées provenant de Bouira)

### 3.1. Teneur relative en eau:

La TRE est un indice clé dans l'étude du stress hydrique (Talbi *et al.,* 2015). Les plantules témoins des deux populations montrent des valeurs de TRE foliaire similaires (figure 31). Elles sont de (96 ± 3) et (95 ± 1) % pour les plantules provenant d'Azazga et de Bouira respectivement. Cependant, la différence entre les plants témoins et les plants stressés est significative pour les deux populations (p = 0,002).

En plus du stress hydrique imposé aux semis de *P. lentiscus,* ces derniers ont été exposés à des conditions environnementales telles que les températures élevées d'été, l'ensoleillement et la lumière intentes. La TRE, liée à l'absorption d'eau par les racines et à sa perte par la transpiration, est considérée comme un moyen d'évaluer l'état hydrique de la plante (Anjum *et al.*, 2011).

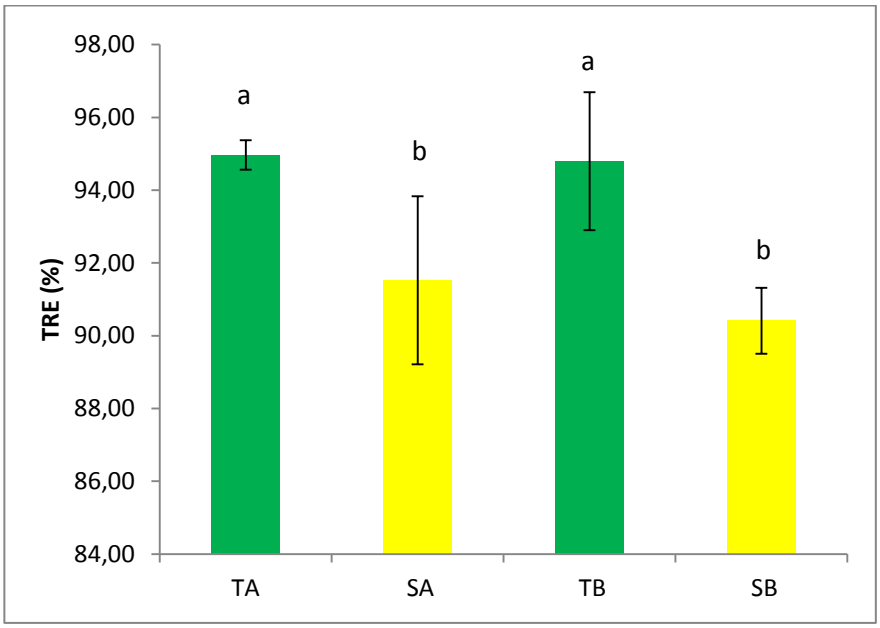



**Figure 31: Variations dans la TRE (%) de deux populations de *P. lentiscus* sous l'effet du stress hydrique**

TA : Plants témoins d'Azazga, AS: Plants stressés d'Azazga, TB ; Plants témoins de Bouira, SB: Plants stressés de Bouira. Les valeurs sont des moyennes ± écartype Basées sur quatre répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (p = 0,002)

La faible diminution dans la TRE chez les deux populations est similaire à la tendance observée par Catoni *et al*. (2013); *P. lentiscus* est l'une des espèces sclérophylles qui maintiennent une TRE élevée (Saura–Mas et Lloret, 2007). Cette faible réduction de la TRE

en réponse à une sécheresse sévère a été signalée chez certaines espèces sclérophylles telles que *Quercus ilex* et *Q. humilis* (Gulías *et al.*, 2002) et peut être le résultat de la régulation stomatique stricte en réponse à la sécheresse imposée (Rivas *et al.*, 2013). Pour ces auteurs, le maintien des TRE à un haut niveau contribue à maintenir les processus physiologiques cellulaires et la croissance et indique un mécanisme de tolérance au stress plutôt qu'un mécanisme d'évitement (Nami *et al.*, 2012).

### 3.2. Teneurs en proline :

Dans les conditions de contrôle, les deux populations *P. lentiscus* provenant d'Azazga et de Bouira présentent des teneurs en proline similaires avec 13,26 ± 2,15 et 11,83 ± 1,57 umol/g PF respectivement (figure 32). Dans les plants stressés chez les deux populations, l'augmentation dans les teneurs est d'environ deux fois en moyenne (24,41±3,02 et 26,10±3,63 umol/g PF respectivement (p =0,00000).

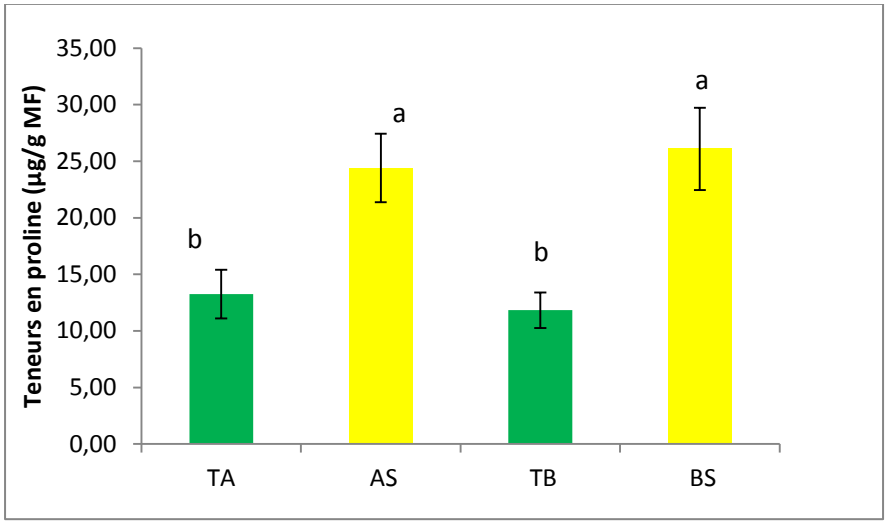



**Figure 32 : Variations dans les teneurs en proline (µg /g MF) chez deux populations de *P. lentiscus* sous l'effet du stress hydrique.**
TA : plants témoins provenant d'Azazga, AS: plants stressés provenant d'Azazga, TB : plants témoins provenant de Bouira, BS : plants stressés provenant Bouira. Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur quatre répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (p = 0,00000)

La proline joue un rôle important dans la tolérance au stress. Son accumulation est la première réponse des plantes exposées à un déficit hydrique afin de réduire les altérations à l'intérieur des cellules (Sankar *et al.*, 2007; Anjum *et al.*, 2011).

Des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus chez plusieurs espèces ayant subi le stress hydriques. Nous pouvons citer *Cocos nucifera* (Gomes *et al.*, 2010) et la canne à sucre (Medeiros *et al.*, 2013). La proline est une substance organique efficace ; elle joue un rôle important non seulement comme osmolyte conférant un ajustement osmotique, mais aussi dans la détoxification des ERO et la stabilité cellulaire (Gao *et al.*, 2008; Kusvuran *et al.*,

2013 ; Ben Rejeb *et al.*, 2014). Selon Gao et *al.* (2008), la concentration élevée en proline permet le maintient de la teneur en eau relativement élevée préservant la plante du stress.

### 3.3. Teneurs en pigments :

Dans des conditions d'arrosage, les deux populations présentent des différences significatives dans les teneurs de tous les pigments foliaires (valeur de p <0,05) (figure33) ; les semis de Brouira ont montré des valeurs plus élevées que ceux d'Azazga alors que le rapport Chl a/b dans les semis d'Azazga a été plus élevé que dans les semis de Bouira.

Le stress hydrique induit une diminution remarquable dans l'ensemble des pigments (valeur de p <0,05). Tous les pigments ont diminué chez la population Bouira plus que chez celle Azazga ; Chl a, chl b et les car (c + x) ont diminué respectivement de 42,29 %, 32,32 % et 21,43 % de la population d'Azazga alors qu'ils étaient 47,05 %, 46,00 % et 24,49 % à Bouira. La diminution du rapport chl a/chl b est non significative.

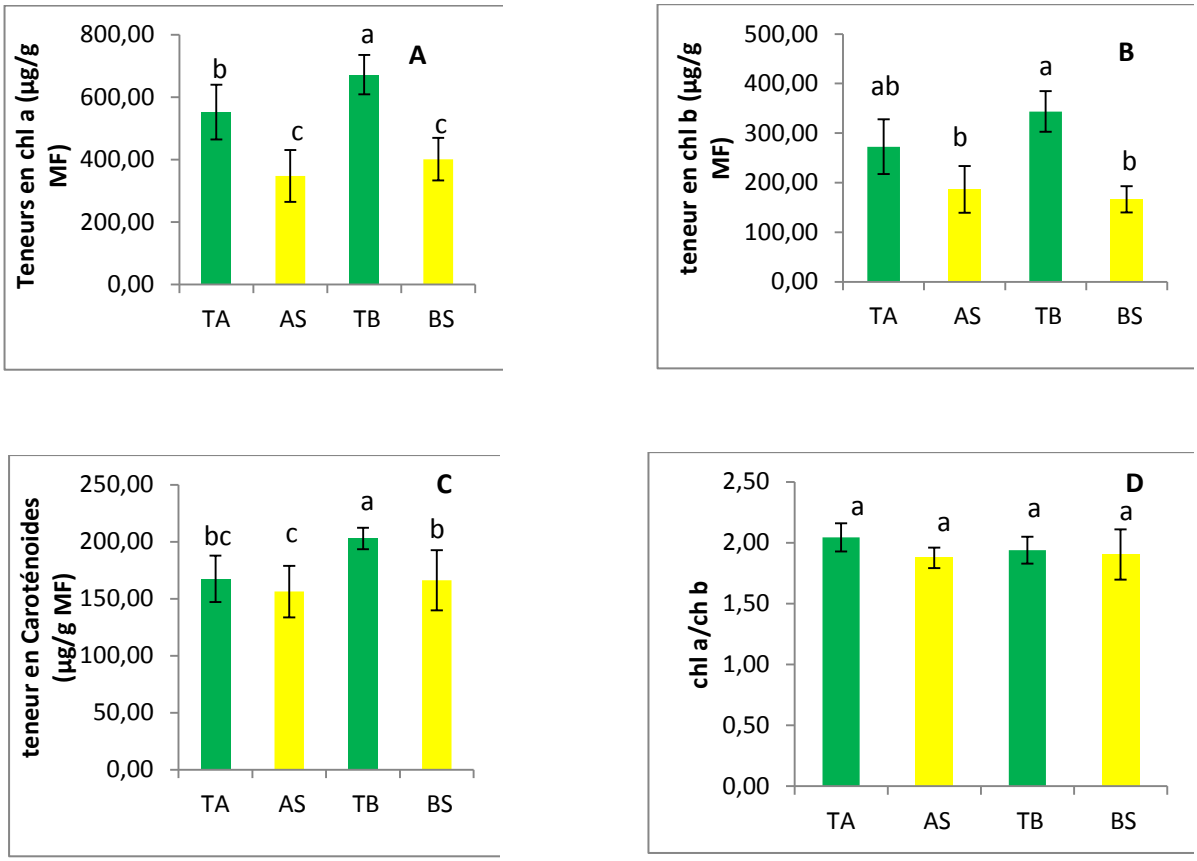



**Figure 33: Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en pigments (µg/g MF) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. lentiscus***. A: Chl a; B: chl b; C: caroténoïdes (c+x); D: Chl a/Ch b.

TA: plants témoins provenant d'Azazga, AS: plants stressés provenant d'Azazga, TB: plants témoins provenant de Bouira, BS: plants stressés provenant Bouira). Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur quatre répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$).

Le stress hydrique provoque généralement une diminution des pigments photosynthétiques (Liu C. *et al.*, 2011; Li-Feng , 2014; Rajasekar et Manivannan, 2015). Nikolaeva *et al.* (2010) ont rapporté que la chl a et la chl b diminuent sous l'effet du stress hydrique tandis le rapport chl a/chl b reste inchangé.

Par ailleurs, le rapport chl a/chl b a augmenté de façon significative chez *Broussonetia papyrifera* et *Platycarya longipes* mais diminue chez *Cinnamomum bodinieri* (Liu Y.B. *al.*, 2011). La diminution de la teneur en chlorophylle dans les feuilles des plants stressés pourrait être due à l'augmentation de l'activité de la chlorophyllase conduisant à la dégradation de la chlorophylle (Ajithkumar et Panneerselvam, 2013; Ajithkumar et Panneerselvam, 2014) et donc à la dégradation du complexe protéino- chlorophylle des thylakoïdes sous de sévères conditions de sécheresse (Li-Feng, 2014). La perte de chlorophylle contribuerait à la survie des plantes sévèrement stressées en réduisant la quantité de photons absorbés par les feuilles (Munne-Bosch et Alegre, 2000), ce qui empêche la surexcitation du photosystème II (Anderson *et al.*, 1992 *in* Aït-Saïd *et al.*, 2013).

Pour Jain *et al.*, (2013) , la diminution de la chlorophylle serait due à une diminution de biosynthèse de la chlorophylle plutôt que sa dégradation. Aït-Saïd *et al.* (2013) qui ont travaillé *in situ* sur des individus adultes de *P. lentiscus*, ont constaté que les caroténoïdes augmentent en été. Cette différence serait probablement due à la phase de développement de la plante, l'intensité, la durée et le taux de progression de stress (Laube *et al.*, 2015).

### 3.4. Peroxydation lipidique :

Les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires sont particulièrement sensibles à l'activité des ERO (Sharma *et al.*, 2012). La peroxydation des lipides à des taux physiologiques ou faibles (conditions subtoxiques) permet la stimulation des systèmes de défense antioxydants constitutifs ou la signalisation de l'activation des voies de production des protéines anti-oxydantes dans les réponses adaptatives (Ayala *et al.*, 2014)**.**

Dans notre étude, les concentrations en MDA dans les feuilles des deux populations de semis témoins présentent des différences significatives ($p = 0,28$) (figure 34); ces concentrations sont de 4,09 ± 0,41 nmol/ml et 2,44 ± 1,02 nmol/ml dans les populations d'Azazga et de Bouira respectivement. Comparés aux témoins, les concentrations en MDA dans les feuilles de semis stressés des deux populations augmentent significativement ($p = 0,0016$), L'augmentation du taux de MDA dans la population Bouira est de 121,31 %, alors qu'elle n'est que de 30,80 % de la population d'Azazga. Ceci correspondrait à une plus grande protection contre le stress oxydatif, chez la population provenant d'Azazga, qui peut résulter d'un système anti-oxydant plus efficace (Gao *et al.*, 2008).

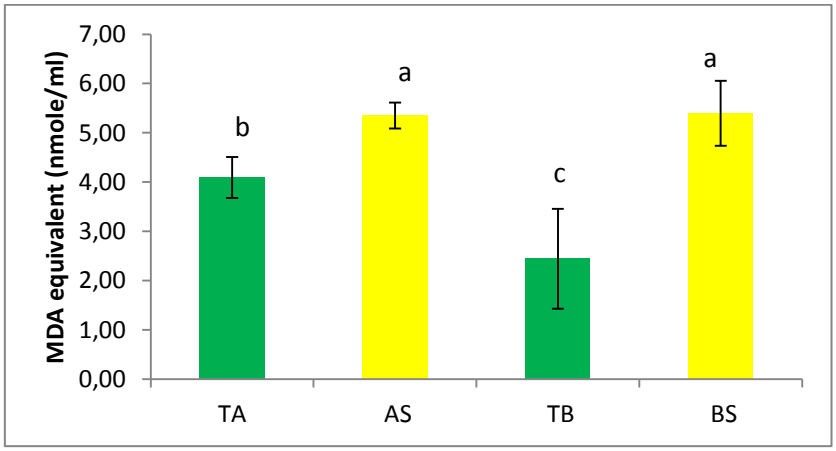



**Figure 34: Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en MDA (nmol/ml) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. Lentiscus*.**
TA: plants témoins provenant d'Azazga, AS: plants stressés provenant d'Azazga, TB: plants témoins provenant de Bouira, BS: plants stressés provenant Bouira). Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur quatre répétitions. Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur trois répétitions. Les différentes lettres indiquent des différences significatives (p = 0,0016)

La Peroxydation des lipides membranaires, principalement les acides gras polyinsaturés associés aux phospholipides ou glycolipides membranaires, est très importante du point de vue de la production des ERO, et considérée comme l'un des rares exemples de la production de radicaux centrés sur le carbone dans les cellules (Bhattacharjee, 2014).

La peroxydation lipidique est souvent liée à une diminution de l'activité des systèmes antioxydants enzymatiques (Dacosta et Huang, 2007) et non enzymatiques (Abbas *et al.*, 2014) chez les espèces sensibles au stress. Bien que la peroxydation des lipides puisse conduire à des modifications structurelles dans les membranes des plantes stressées (Yang *et al.*, 2007), elle est considérée comme un processus essentiel et naturel ayant lieu dans des cellules végétales.

Certains produits de la peroxydation lipidique ont des effets cytotoxiques sur les cellules mais d'autres sont des effecteurs (Skorzynska-Polit, 2007 ; Bhattacharjee, 2014) et peuvent induire l'acclimatation au stress en stimulant l'expression des gènes codant pour des fonctions de détoxification et peuvent être associés à la réparation des membranes endommagées (Bhattacharjee, 2014).

### 3.5. Teneurs en polyphénols :

Les résultats de dosage des FT présentés dans la figure 35 montrent des différences non significatives entre les semis témoins et les semis stressés (p = 0,59) de la population de *P. lentiscus* d'Azazga, tandis qu'une nette augmentation a été observée dans les semis stressés provenant de Bouira (p= 0,19). Les teneurs en PPT sont également similaires à la fois chez les semis témoins que chez ceux ayant subi un stress hydrique (p=0,5). Ces teneurs varient de 87,41 ± 5,37 à 105,11 ± 1,2. mg/g de MS.

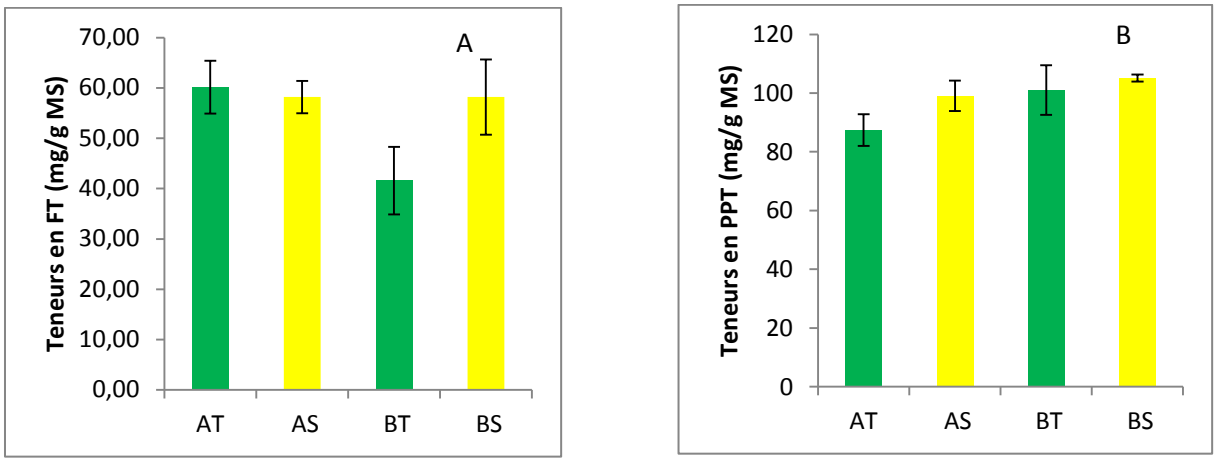



**Figure 35: Influence du stress hydrique sur les variations dans les teneurs en FT et en PPT (mg/g MS) dans les feuilles de semis des deux Populations de *P. Lentiscus*.**
TA: plants témoins provenant d'Azazga, AS: plants stressés provenant d'Azazga, TB: plants témoins provenant de Bouira, BS: plants stressés provenant Bouira). Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur quatre répétitions. Les valeurs sont des moyennes ± SE Basées sur quatre répétitions.

Nos résultats sont similaires à ceux Daniels *et al.* (2015) qui n'ont constaté aucune différence significative dans les teneurs en polyphénols chez *Gethyllis multifolia*. Ils sont également similaires à ceux de Gleadow et Woodrow (2002) sur les polyphénols et les tannins condensés chez *Eucalyptus cladocalyx.* Ils s'opposent cependant avec ceux de mais pas avec ceux Bettaieb *et al.* (2011) qui ont constaté une augmentation du taux de polyphénols chez *Salvia officinalis* L. sous l'influence de la contrainte hydrique. Mckiernan *et al.* (2014) quant à eux, ont constaté une réduction dans les concentrations en polyphénols totaux chez *Eucalyptus globulus* et *E. viminalis*. Selon Gleadow et Woodrow (2002), la régulation en réponse au stress hydrique est complexe et peut impliquer des modifications dans la voie du shikimate.

Les travaux de Brossa *et al.* (2009) sur les flavonoïdes de *Quercus ilex* ont montré une diminution de leur taux en été par rapport à l'hiver, mais leur comportement varie au niveau individuel de ces substances ; l'épicatéchine et le gallate d'épicatéchine n'ont montré aucun changement au cours des saisons, tandis que le taux des hexosides de flavonols diminuent de l'hiver à l'été.

Liu Y.B. *et al.* (2011) en étudiant deux arbustes du désert, *Caryopteris mongolica* et *Reaumuria soongorica,* ont constaté que les flavonoïdes ont augmenté chez la première tandis qu'ils ont diminué chez la seconde. Cependant, la teneur en anthocyanes augmente dans les deux arbustes, indiquant différentes réponses de régulation dans la voie des flavonoïdes.

Pour Rajabbeigi *et al.* (2013), les traitements de sécheresse et des rayons UV-B affectent le profil phénolique alors que le contenu phénolique est resté inchangé.

Boscaiu *et al.* (2010), dans leur étude sur les composés phénoliques comme marqueurs de stress, ont démontré que la plupart des espèces méditerranéennes présentent des teneurs élevées en PPT et en FT en été, période la plus stressante du climat méditerranéen avec des températures élevées et des étés pratiquement sans précipitations. Par contre *Gypsophila struthium* et *Ononis tridentata* au contraire, semblent maintenir leur niveau relativement constant toute l'année.

Salem *et al.* (2014) dans leur étude sur l'effet du stress hydrique sur *Carthamus tinctorius*, ont constaté des différences quantitatives dans les différentes classes de polyphénols des fleurs de cette espèce sous l'effet du stress hydrique. En effet, les teneurs en PPT et FT présentent une augmentation significative sous l'effet du stress modéré et une forte diminution des teneurs sous l'effet du stress sévère.

A la lumière de tous ces travaux, il nous semble évident que les polyphénols de *P. lentiscus*, à l'instar des autres espèces notamment les espèces méditerranéennes sont influencés par les facteurs environnementaux, bien que leurs teneurs totales paraissent inchangées. Il est donc très probable qu'il y ait augmentation dans les teneurs individuelles de certains polyphénols et une diminution d'autres.

## 4. Activités biologiques des polyphénols de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* :

### 4.1. Propriétés antioxydantes des polyphénols extraits des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus*

#### 4.1.1. Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium :

Le potentiel antioxydant de certains composés est lié à leur pouvoir réducteur (Nithya et Saraswathi, 2010). Les tests du pouvoir réducteur peuvent ainsi servir d'importants indicateurs de l'activité antioxydante dans un extrait de plante. Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure est basé sur la réduction des ions ferriques ($Fe^{3+}$) en ions ferreux ($Fe^{2+}$) qui est suivie par le changement de couleur du jaune au vert bleuâtre. L'intensité de la couleur dépend du potentiel de réduction des composés présents dans le milieu. L'absorbance à 700 nm est proportionnelle à l'intensité de la couleur et par conséquent au pouvoir réducteur et à la capacité antioxydante des composés (Ebrahimzadeh *et al.,* 2010 ; Jayanthi et Lalitha, 2011).

Le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des PPT et Agl des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus* à différentes concentrations, exprimé par les valeurs des absorbances à 700 nm, est présenté par la figure 36. Le pouvoir réducteur de tous les extraits augmente en relation avec la concentration en polyphénols. Le test de corrélation de Pearson

révèle des corrélations positives significatives entre la concentration des différents extraits et leur pouvoir réducteur (R= 0.95). Cette forte corrélation pourrait suggérer que le potentiel antioxydant de *P. lentiscus* serait dû aux composés phénoliques comme constituants (Olszewska et Michel, 2009).

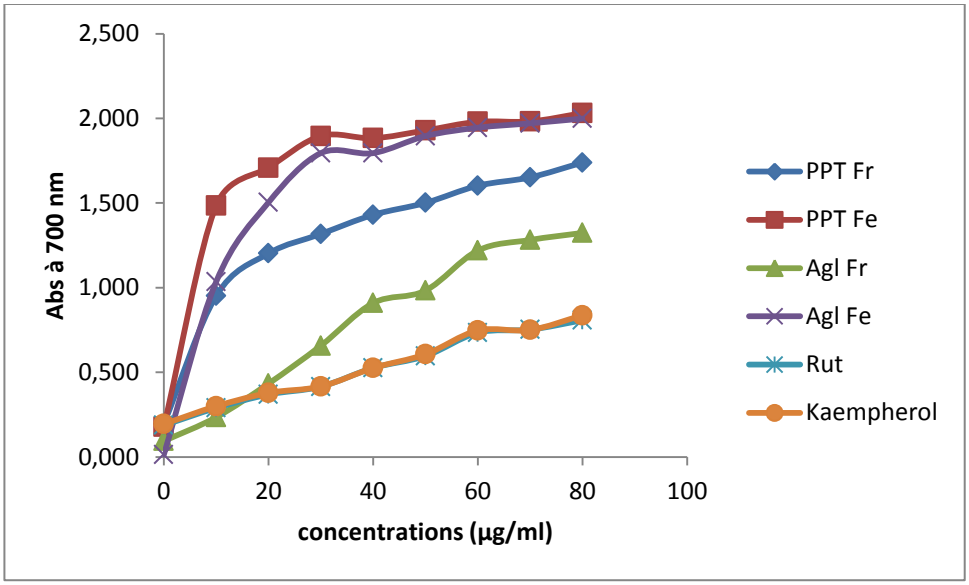



**Figure 36: Pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium des PPT et des Agl de la drupe et des feuilles de *P. lentiscus* à différentes concentrations**

La corrélation entre le taux de polyphénols et leur capacité antioxydante a été mise en évidence chez plusieurs espèces du genre *Pistacia* (Gentile *et al.*, 2007 ; Benhammou *et al.*, 2008 ; Hosseinzadeh *et al.*, 2012).

Krishnaiah *et al.* (2010) ont constaté une forte corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols de *P. lentiscus.* Les travaux d'Atmani *et al.*, (2009) ont montré que les extraits de *P. lentiscus* présentent le pouvoir réducteur le plus élevé relativement aux extraits de *Fraxinus angustifolia* et de *Clematis flammula.*

En outre, le meilleur pouvoir réducteur est obtenu avec les PPT et Agl des feuilles (1,48±0,02 à 2,03±0,03) et (1,03±0,06 à 1,99±0,03) respectivement, suivi par les PPT et Agl de la drupe (0,95±0,07 à 1,74±0,02) et (0,23±0,005 à 1,32±0,02) respectivement. Alors que leurs standards respectifs, rutine et kaemférol présentent le pouvoir réducteur le moins bon (0,19±0,007 à 0,81±0,02). Les travaux d'Olszewska et Michel (2009) ont montré que les polyphénols des feuilles présentent un pouvoir réducteur plus élevé que ceux du fruit.

### 4.1.2. Activité anti-radicalaire :

Les extraits phénoliques des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus* présentent une activité anti-radicalaire significativement plus élevée que les standards de référence utilisés, la rutine et le kaempférol (p=0,0000). Cette activité est dose dépendante.

La cinétique de l'activité anti-radicalaire des PPT et des Agl extraits à partir des feuilles et de la drupe *P. lentiscus* à différentes concentrations (µg/ml), vis-à-vis du radical

stable DPPH$^{\bullet}$ a été étudiée et illustrée par les figures 37, 38 et 39. Ces courbes présentent deux étapes : une étape rapide très courte et une étape lente.

La comparaison entre les courbes des différents extraits permet de distinguer trois grandes allures qui se dégagent : une cinétique de réaction rapide, moyenne et lente :

- La figure 37 (Agl) et (PPT) montre le scavenging de DPPH° par les Agl et PPT des feuilles de *P. lentiscus*. Il peut être partagé en deux parties : dans la première, la diminution du % de DPPH$^{\bullet}$ résiduel est rapide pour les quatre concentrations et dans la deuxième, elle devient assez lente et atteint progressivement le plateau pour les Agl alors que pour les PPT, le plateau est vite atteint pour les concentrations de 100, 150 et 250 µg/ml.
- La figure 38 (Agl) et (PPT) qui présente le scavenging de DPPH° par les Agl et PPT de la drupe de *P. lentiscus* montre également une diminution rapide jusqu'à la cinquième minute puis à l'inverse des feuilles, le plateau est atteint plus rapidement pour les Agl que pour les PPT.
- La figure 39 (Kaemp) et (Rut) présente le scavenging de DPPH°par les standards Kaemphérol (Agl) et rutine (forme glycosylée) ; celui-ci atteint assez rapidement le plateau.

Le piégeage de radicaux libres se fait selon deux mécanismes aboutissant au même résultat mais influençant la cinétique de piégeage (Prior *et al.,* 2005 ; Barhe et Tchouya, 2016) : l'étape rapide est réalisée selon le mécanisme de libération d'atome d'hydrogène alors que l'étape lente est plutôt due à un mécanisme de transfert d'électron (PRIOR *et al.,* 2005). Selon Tsimogiannis et Oreopoulou (2006), l'étape rapide pourrait éventuellement être attribuée aux hydroxyles très réactifs du noyau B des flavonoïdes.

Le pourcentage de piégeage DPPH°$^{\bullet}$ est fonction de la concentration. Les PPT et les Agl des feuilles présentent les meilleurs IC50 (concentration neutralisant 50% des radicaux DPPH$^{\bullet}$) avec 1,09 µg/ml et 4,08 µg/ml respectivement. Ceux de la drupe sont plus élevés, 168,99 et 290,49 µg/ml respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux retrouvés dans plusieurs travaux (Shabir *et al.,* 2011 ; Kanoun *et al.,* 2014). Selon ces auteurs, les extraits de feuilles présentaient de meilleurs IC50 que ceux des fruits, des fleurs et des écorces. L'activité antioxydante des polyphenols de *Myrtus communis* L. évaluée par le test ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est plus élevée dans les extraits de feuilles que dans ceux de la drupe (Amensour *et al.,* 2010).

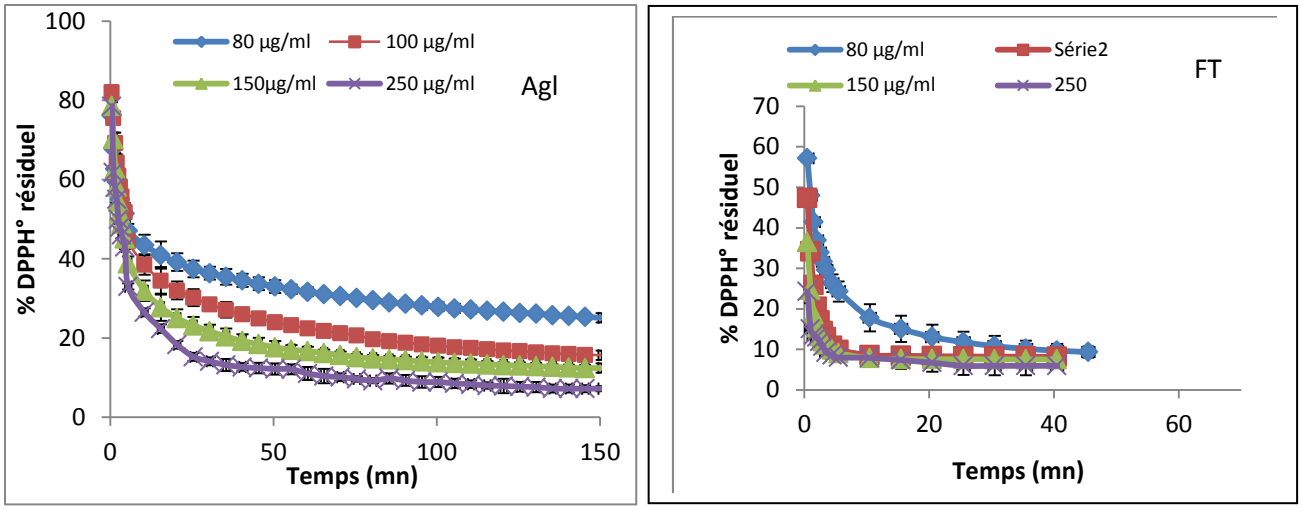



**Figure 37: Pourcentage de DPPH° résiduel à différentes concentrations des Agl et des PPT des feuilles de *P. lentiscus* en fonction du temps (min)**

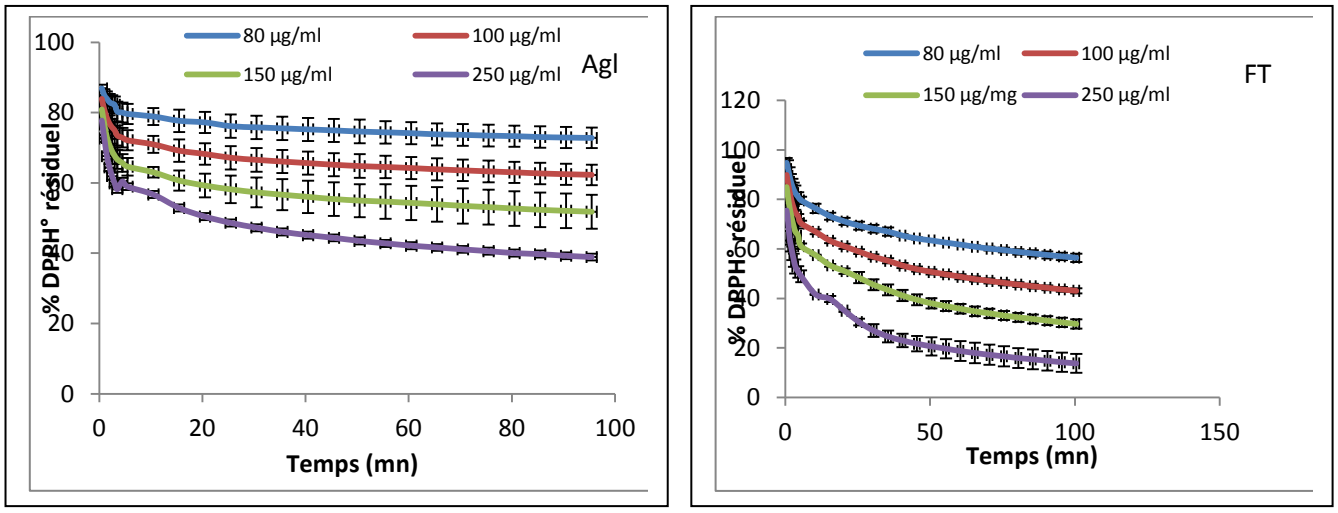



**Figure 38: Pourcentage de DPPH° résiduel à différentes concentrations des Agl (A) et des PPT de la drupe de *P. lentiscus* en fonction du temps (min)**

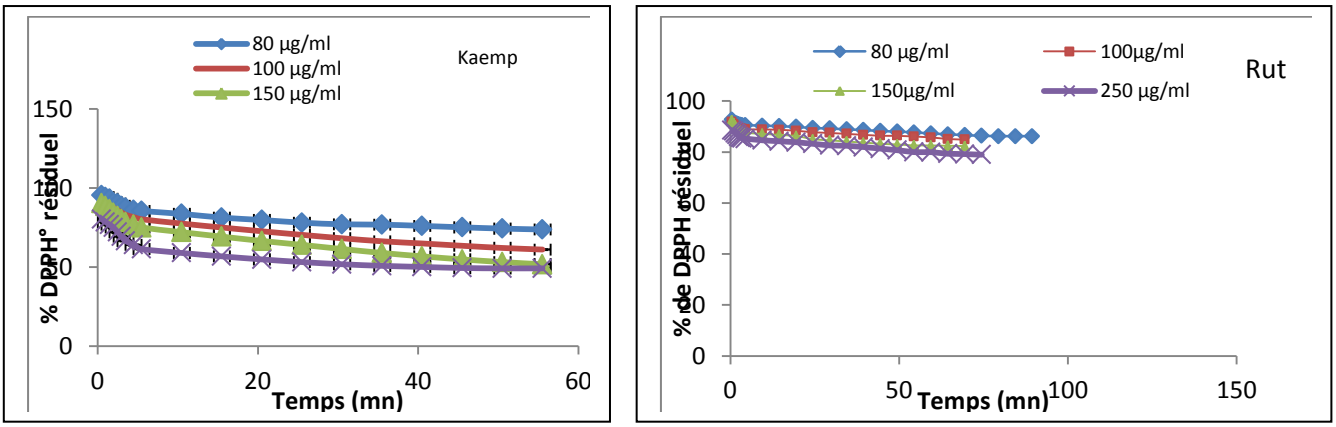



**Figure 39: Pourcentage de DPPH° résiduel à différentes concentrations des kaempférol et de la rutine en fonction du temps (min)**

Par ailleurs, comme le pouvoir réducteur sur le ferrocyanure, les PPT présentent un des IC50 supérieurs à ceux de leurs homologues Agl alors le kaempférol présente une meilleure activité anti-radicalaire que la rutine avec des IC50 respectifs de 2,93 et 12,63 mg/ml. Ceci serait probablement dû à la présence, dans les extraits, de fortes concentrations en PPT libres (formes non glycosylées). En effet, selon Hadj Salem *et al.* (2011), la glycosylation affecterait négativement la capacité antioxydante des flavonoïdes. Le kaempférol et la rutine, standards de référence utilisés dans cette étude, présentent des IC50 particulièrement élevés comparativement à ceux des extraits de feuilles et de la drupe. L'efficacité des extraits serait alors due à l'effet synergique des polyphénols en mélange (Hajimehdipoor *et al.,* 2014).

### 4.1.3. Activité anti-hémolytique:

L'hémolyse *in vitro* des érythrocytes humains, induite par $H_2O_2$, a été utlisée pour évaluer l'effet protécteur des flavonoïdes extraits des feuilles et des drupes de *P. lentiscus* L vis-à-vis des RL causant des lésions sur les membranes érythrocytaires.

La figure 40 montre que tous les extraits présentent une activité anti-hémolytique élévée qui augmente avec l'augmentation de la concentration. Le pourcentage d'inhibition hémolytique le plus élevé a été enregistré par la quercétine, quelque soit la concentration (IC 50= 83,44±1,95 µg/ml ; tableau X), suivie par les PPT des feuilles (IC50=100,72±0,17 µg/ml). Les PPT extraits de drupes, les Agl de drupes et ceux des feuilles arrivent ensemble en troisième position. La rutine quant à elle présente le pourcentage d'inhibition le plus faible ($p<0,05$).

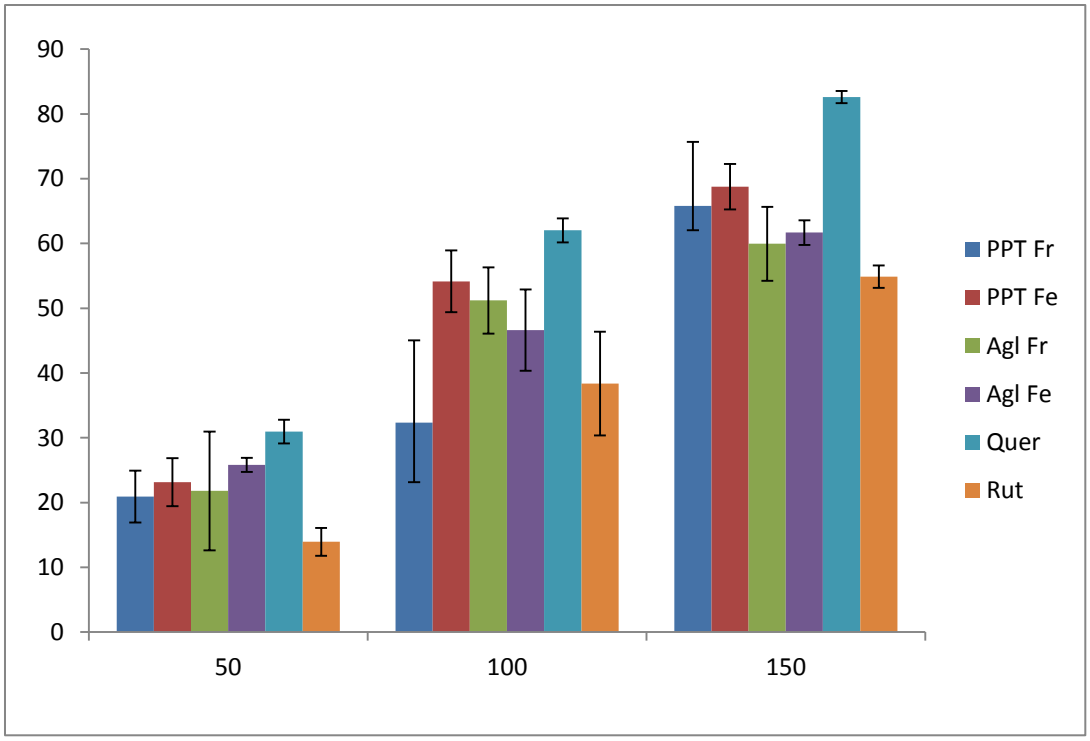



**Figure 40 : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse par les PPT et les Agl des feuilles et de la drupe de *P. lentiscus***

**Tableau X. IC50 (inhibition de l'hémolyse) des différents extraits des PPT et des Agl des feuilles et du fruit de *P. lentiscus***

| | IC 50 (µg/ml) |
|---|---|
| Quer | 83,43±1,95 |
| PPT Fe | 100,72±0,17 |
| Agl Fr | 114,87±4,76 |
| Agl Fe | 115,12±7,82 |
| PPT Fr | 124,87±21,01 |
| Rut | 135,15±1,95 |

Les érythrocytes sont considérés comme des cibles de choix pour l'attaque par les radicaux libres en raison à la fois de la présence d'acides gras polyinsaturés dans la double membrane et au rôle transporteur d'oxygène, puissant générateur d'espèces réactives de l'oxygène (Ajila et Prasada Rao, 2008).

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par James et Alewo (2014) sur l'activité anti-hémolytique des extraits de *Gymnema Sylvestre*, selon qui les extraits foliaires sont plus actifs que ceux des autres organes de la plantes. Cependant, selon ces mêmes auteurs, la quercétine est la moins active. Nos résultats sont également en concordance avec ceux obtenus par Meenu Krishnan *et al.* (2015) sur l'activité anti-hémolytique des extraits de fruits de *Solanum aculeatissimum* Jacq. où la quercétine présente l'activité antihémolytique la plus élevée.

L'efficacité de la protection hémolytique des extraits de feuilles et de drupes de *P. lentiscus* serait due à la capacité des composés phénoliques, dont les flavonoïdes, à neutraliser les radicaux libres générés par $H_2O_2$, protégeant ainsi les membranes érythrocytaires de la lyse (Divya *et al.,* 2012). En effet, la myricétine, la quercétine ainsi que leurs dérivés respectifs sont les composés majoritaires dans les extraits de *P. lentiscus* (Romani *et al.,* 2002, Rodriguez-Perez *et al.,* 2013). Cette protection hémolytique est plus élevée que celle des écorces de grenade (IC50= 254 µg/ml) (Sumathy *et al.,* 2013) et celle de différents organes de *Gymnema Sylvestre* (IC50<40 mg/ml ) (James et Alewo, 2014).

Généralement, un bon inhibiteur est un agent ayant une activité antioxydante qui varie proportionnellement avec sa concentration (Thephinlap *et al.,* 2013 ; Bouhlali *et al.,* 2015). En effet, les feuilles de *P. lentiscus* sont plus riches en PPT que les drupes (9,50±0,2 mg/ml ms et 4,33±0,4 mg/ml ms respectivement).

L'inhibition de l'hémolyse est également fonction de la structure des molécules contenues dans l'extrait. Selon DAI *et al.* (2006), les composés portant une fonction *ortho*-dihydroxylés (myricétine et quercétine) sont plus efficaces que ceux qui en sont dépourvus (kaemphérol).

Les flavonoïdes glycosylés ont un effet protecteur inférieur à celui des aglycones non seulement parce qu'ils présentent une faible capacité antioxydante que les aglycones (Ioku *et al*., 1995 ; Hadj Salem *et al.,* 2011) mais aussi à cause de leurs nature hydrophile (KITAGAWA *et al.,* 2004) ; la nature relativement lipophile des aglycones faciliterait leur pénétration à travers la membrane érythrocytaire.

### 4.2. Activité anti-leishmanienne des extraits de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* :

Les *leishmania* sont responsables d'un taux élevé de mortalité et de morbidité dans le monde et les plantes médicinales pourraient constituer une source intéressante de composés naturels avec des activités antiparasitaires et constituer une alternative la résistance de l'agent pathogène au traitement par chimiothérapie et les d'effets secondaires de ce dernier (Tiuman *et al.,* 2011).

#### 4.2.1. Activité anti-promastigote :

Dans cette partie de l'expérimentation, nous avons testé l'efficacité de l'activité anti-leishmanienne des PPT et des Agl de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* sur les promastigotes de deux souches de Leishmania (*L. major* et *L. infantum*). Les PPT et les Agl de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* présentent tous une activité anti-leishmanienne positive. Selon les résultats présentés dans le tableau XI, *L. infantum* est plus sensible que *L. major* vis à vis des

différentes classes de CP. Les Agl présentent un meilleur pourcentage d'inhibition de croissance des promastigotes aussi bien chez *P. atlantica* que chez *P. lentiscus* IC50<10 µg/ml (figure 41). Cependant, cette activité est inférieure à celle de amphotéricine B avec un IC50 de 0,22 ± 0,09 µg/ml pour *L. infantum* et de 0,80 ± 0,18 µg/ml pour *L. major*.

**Tableau XI. Activité anti-leishmanienne (IC50 ± SD) et activité cytotoxique (CL50 ± SD) des PPT et Agl de *P. atlantica, P. lentiscus* et de l'amphotéricine B**

| | | IC50 *L. infantum* ($\mu g.ml^{-1}$)± SD | IC50 *L. major (µg/ml)±SD* |
|---|---|---|---|
| ***P. atlantica*** | PPT | 15,41±0.29 | 16,85±0.25 |
| | Agl | 1,91±0.17 | 2,76±0.35 |
| ***P. lentiscus*** | PPT | 12,77±0.11 | 13,31±0.16 |
| | Agl | 1.25±0.27 | 2,03±0.32 |
| Amphotéricine B (contrôle positif) | | 0,22±0.09 | 0,80±0.18 |

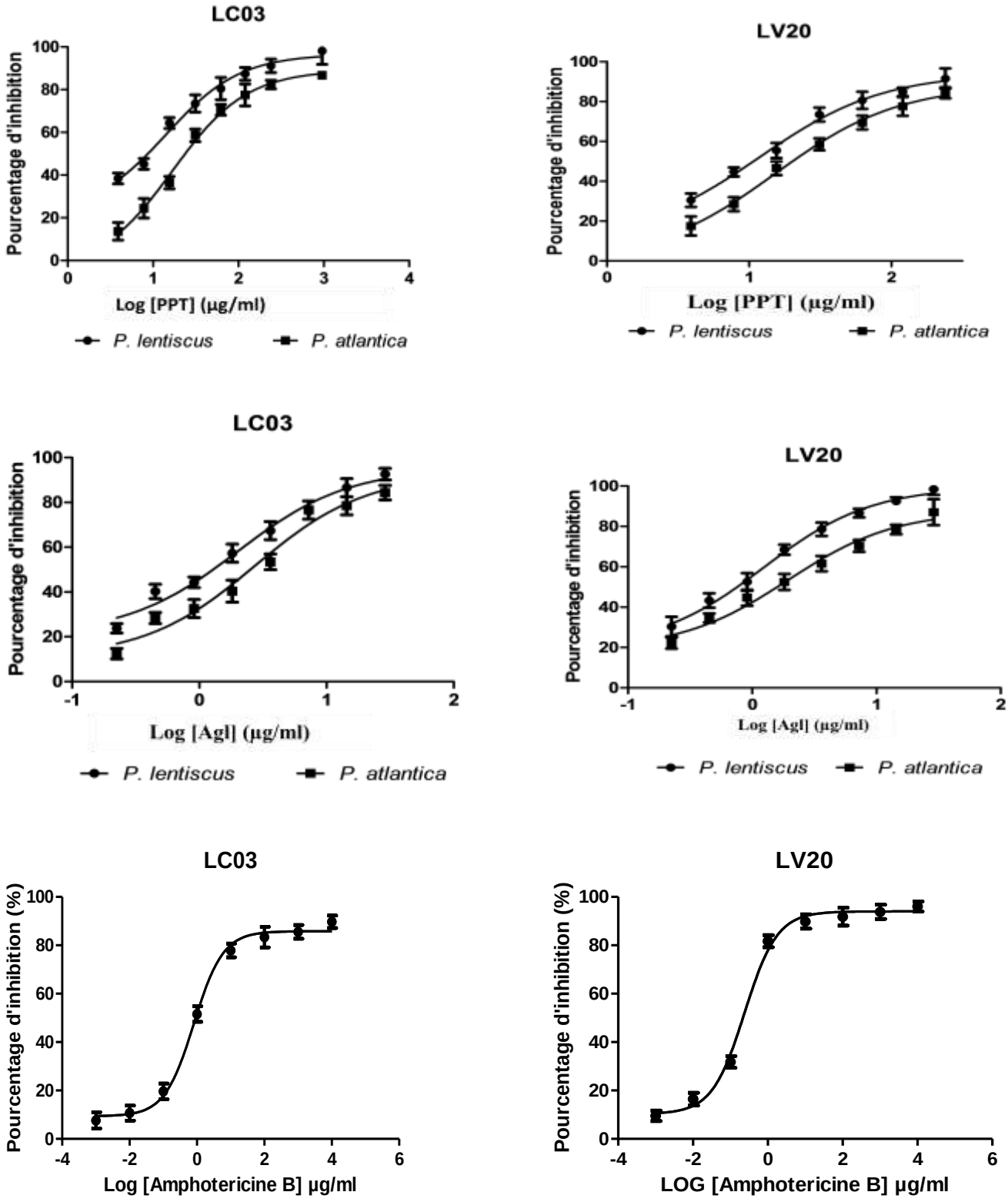



**Figure 41: Inhibition de la croissance de *L. major* LCO3) et *L. infantum* (LV20) à différentes concentrations de PPT et d'Agl de *P. atlantica,* de *P. lentiscus* et d'Amphotérine B**

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Essid *et al.,* (2015) sur l'activité anti-leishmanienne des huiles essentielles d'extraits de plantes médicinales vis-à-vis de *L. major* et de *L. infantum.* Selon ces auteurs, *L. infantum* est plus sensible que *L. major.* Ils diffèrent néanmoins de ceux obtenus par Aïssa *et al.* (2012) sur l'activité anti-leishmanienne des esters dérivés lipophyles du tyrosol pour qui *L. major* et plus sensible que *L. infantum*.

### 4.2.2. Cytotoxicité et index de sélectivité des polyphénols totaux et des aglycones phénoliques :

Une faible cytotoxicité sur les cellules macrophages a été observée (SI> 10) pour tous les extraits testés et l'amphotérine B (Tableau XII). Les travaux de Pacifico *et al.* (2014) sur les propriétés protectrices de l'extrait éthanolique de *P. lentiscus* sur les cellules humaines de neuroblastome SK-B-NE(C)-2, ont montré des résultats similaires aux nôtres avec uniquement 10% d'inhibition de croissance cellulaire à une concentration de 100 µg/ml d'extrait.

**Tableau XII. Activité cytotoxique (CL50 ± SD) des PPT et Agl de *P. atlantica, P. lentiscus* et de l'amphotéricine B**

| | | LC50 Raw80 *(µg/ml)±SD* | IS *L. infantum* | IS *L. major* |
|---|---|---|---|---|
| ***P. atlantica*** | PPT | 197,7±0.23 | 12,82 | 11,73 |
| | Agl | 70,02±0.23 | 36,65 | 25,36 |
| ***P. lentiscus*** | PPT | 134,9±0.26 | 10,56 | 10,13 |
| | Agl | 30,76±0.16 | 24,60 | 15,15 |
| Amphotéricine B (contrôle positif) | | 9,23±0.13 | 11,53 | 41,95 |

*P. atlantica* et *P. lentiscus* sont utilisées pour diverses propriétés médicinales. Les extraits des différentes parties de la plante montrent diverses activités (antiathérogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne, hypotensive, anticancéreuse, anti arthrite, anti-nociceptique) (Nahida *et al.*, 2012 ; Bozorgi *et al.*, 2013).

L'efficacité de l'activité anti-leishmanienne des PPT et des Agl de *P. atlantica* et de *P. lentiscus* bien qu'inférieure à celle de Amphotéricine B s'expliquerait par la présence dans les extraits d'un mélange de molécules à activité variant de très bonne à absente.

En effet, les flavones et flavol-3-ols présentent généralement, l'activité anti-leishmanienne la plus élevée ; celle-ci est positivement influencée par le nombre de groupements hydroxyle alors qu'elle est négativement influencée par la méthylation de ces groupements. La glycosylation la diminue drastiquement.

Les dérivés de l'acide cinnamique en revanche, présentent une activité anti-leishmanienne modérée. Parmi les isoflavones, la daidzéine et l'acide gallique sont dépourvus d'activité (Tasdemir *et al.*, 2006).

Il a été démontré que la quercétine (Muzitano *et al.*, 2006), l'acide chlorogénique (Montrieux *et al.*, 2014) et la myricétine (Tasdemir *et al.*, 2006) inhibent fortement la croissance des promastigotes de *L. amazonensis* par induction de la production d' ERO perturbant le fonctionnement des mitochondries (Fonseca-Silva *et al.*, 2011).

Sifaoui *et al.* (2014) ont testé l'efficacité d'extraits de feuilles de plusieurs variétés d'olive sur plusieurs souches de *leishmania*. Selon ces auteurs, l'activité anti-leishmanienne vis-à-vis de *L. tropicana* et *L. major* est corrélée à la concentration en flavonoïdes des extraits de feuilles d'olive.

Par ailleurs, la nature de la fraction glucidique influe sur l'activité anti-leishmanienne (Muzitano *et al.*, 2006 ; Sidana *et al.*, 2013) qui interviendrait dans l'optimisation de l'interaction avec la membrane du macrophage (Bozue *et al.*, 2005). Ainsi, les composés dont le sucre est le xylose seraient beaucoup moins actifs que ceux contenant du D-glucose (Sidana *et al.*, 2013).

# *Conclusion et perspectives*

**Conclusion et perspectives :**

La biodiversité présente un impact important sur le fonctionnement des écosystèmes. En effet, plus un écosystème est riche en espèces plus, il est apte à résister et à faire face aux perturbations.

Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence les rôles écologiques des composés phénoliques des plantes. En effet, source de protection contre les facteurs biotiques et abiotiques, ils confèrent aux espèces végétales une bonne capacité d'adaptation dans les environnements les plus défavorables.

Par ailleurs, les plantes riches en composés phénoliques sont connues pour leurs vertus thérapeutiques représentant un atout économique dans le domaine de pharmacothérapie puisqu'elles constituent une précieuse alternative aux substances médicamenteuses de synthèse.

La végétation du bassin méditerranéen et de l'Algérie en particulier est à dominance arbustes et arbres ligneux sclérophylles ou malacophylles.

Notre présente étude s'est intéressée à *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica*, deux espèces très représentatives de la végétation algérienne et bien adaptés aux conditions de stress hydrique notamment. Notre objectif est de voir si cette adaptation au stress est en relation avec les teneurs en composés phénoliques de ces deux espèces. Pour cela, nous avons mené une étude écophysiologique et biologique des composés phénoliques de *P. atlantica* et de *P. lentiscus*.

Nos résultats ont mis évidence en premier lieu que les deux méthodes d'analyse qualitative utilisées pour la révélation et l'identification des CP (HPLC et GC-MS) se sont avérées complémentaires.

L'analyse qualitative par HPLC, des polyphénols sur des extraits éthanoliques foliaires a montré que *P. atlantica* est plus riche en composés phénoliques en totalisant 12 composés détectés contre 5 uniquement chez *P. lentiscus.*

La caractérisation de ces polyphénols nous a permis de proposer des orientations vers des voies métaboliques distinctes chez les deux espèces quant à leur stratégie d'adaptation aux conditions d'aridité : *P. lentiscus* favoriserait la voie terpénique et la voie de synthèse des lipides de revêtement alors que *P. atlantica* favoriserait la voie polyphénolique.

L'analyse en GC-MS des aglycones phénoliques, indique la présence, chez *P. lentiscus,* de substances comme le phlorogucinol et l'acide β phényl acétique qui sont totalement absentes chez *P. atlantica*. Ces substances sont probablement en relation avec leurs rôles physiologiques au niveau de l'espèce. Le phlorogucinol par exemple, est connu pour ses propriétés de régulateur de croissance et de stimulateur de la prolifération des pousses axillaires, et l'acide β phényl acétique acide stimulerait la croissance des branches et des racines secondaires.

L'étude quantitative aussi bien par HPLC que par des dosages spectrophotométriques a révélé une variabilité inter spécifique : *P. atlantica* étant plus riche en polyphénols totaux et en tannins hydrolysables mais plus pauvre en flavonoïdes totaux que *P. lentiscus*.

Le dosage de ces classes de polyphénols a, en outre, révélé une homogénéité relative chez *P. atlantica* contrairement à *P. lentiscus*, plus hétérogène. L'analyse en composante principale a permis de faire ressortir une bonne corrélation entre teneurs en polyphénols et les caractéristiques édapho-climatiques suggérant l'implication des polyphénols dans la stratégie adaptative.

Une variation dans les paramètres physiologiques de *P. lentiscus* sous contrainte hydrique a été retrouvée puisque nous avons noté :

- une faible diminution de la teneur relative en eau des semis stressés ; caractéristique des espèces méditerranéennes bien adaptées et tolérantes à la sécheresse.
- une diminution du taux de chlorophylles, (en raison d'une inhibition de leur biosynthèse ou à leur dégradation par la chlorophyllase) considéré comme un moyen de protection contre la photoihnibition évitant la surexcitation du photosystème II.
- Enfin, les teneurs globales en polyphénols de *P. lentiscus* n'ont pas été influencées par contrainte hydrique en dépit de l'impact des facteurs environnementaux sur les polyphénols des végétaux en général. En revanche, une peroxydation lipidique exprimée par l'augmentation du taux de MDA chez les deux populations pourrait être impliquée dans le mécanisme de signalisation cellulaire et d'acclimatation.

L'étude réalisée *in vitro* sur les activités biologiques des CP des feuilles et des drupes de *P. lentiscus* ont montré que ces derniers sont doués d'un pouvoir réducteur et d'une activité oxydante intéressante. Ce qui s'est traduit par une bonne protection hémolytique des globules rouges humains ; les polyphénols totaux ayant présenté la meilleure activité que les aglycones phénoliques ; les CP des feuilles se sont avérés relativement plus efficaces que ceux des drupes.

Il serait souhaitable d'étudier les différents composés purifiés afin d'explorer un effet synergique ou antagoniste et d'élargir cette étude *in vivo* sur des animaux pour une investigation de leur efficacité et de leur cytotoxicité.

Les polyphénols de *P. lentiscus* et de *P. atlantica* ont révélé une activité anti-leishmanienne sur les promatigotes, forme flagellée libre dans le tube digestif du phlébotome, vecteur de la maladie.

Ces résultats représentent un travail préliminaire réalisé pour la première fois sur les propriétés antiparasitaires de ces polyphénols.

Plusieurs perspectives s'offrent à nous dans l'avenir :

Il serait souhaitable de poursuivre sur les amastigotes, forme intracellulaire de l'hôte vertébré de ces espèces entre autre l'homme, mais aussi sur les autres espèces qui sévissent en Algérie.

En considérant l'hétérogénéité de *P. lentiscus,* il serait intéressant d'une part d'élargir l'échantillonnage en augmentant le nombre de stations et le nombre d'individus par station. En effet, la multiplication des provenances permettrait de confirmer ou d'infirmer nos résultats et de généraliser les conclusions. D'autre part, identifier de manière exhaustive les composés phénoliques des deux espèces afin de mieux appréhender les stratégies d'adaptation aux conditions environnementales, notamment les variations individuelles en fonction de la contrainte qui pourrait enrichir le travail actuel.

Des variations phénoliques inter et intra spécifiques ont été observées, elles pourraient être soit d'origine environnementale ou génétique. Il serait souhaitable de réaliser une étude en serre des polyphénols des deux espèces selon les provenances afin de vérifier l'influence des deux types de facteurs.

# *Travaux valorisants*

## Travaux valorisant la thèse :

**CHEHRIT-HACID F., DERRIDJ A., MOULTI-MATI F., MATI A.** (2015). Drought Stress Effect on Some Biochemical and Physiological Parameters; Accumulation of Total Polyphenols and Flavonoids in Leaves of Two Provenance Seedling *Pistacia lentiscus.* IMPACT: International Journal of Research in Applied 3 (9) : 127−138.

**CHEHRIT-HACID F., DERRIDJ A., MOULTI-MATI F., MATI A., KABLY L., OUKFIF C., ZITOUN L., TOUATI O.** (2008). Influence du sexe et de l'âge des feuilles sur les teneurs en hétérosides flavoniques chez *P. lentiscus.* 4 ème séminaire Scientifique et technique sur l'environnement 03,04 et 5 juin 2008.

**HACID-CHEHRIT F., MATI-MOULTI F., DERRIDJ A.** (2013). Activité anti-hémolytique des flavonoides extraits du fruit et des feuilles de *Pistacia lentiscus***.** 5ème Symposium International des Plantes Aromatiques et Médicinales Maroc, 14-16 novembre 2013.

**IMPACT: International Journal of Research in Applied Natural and Social Sciences (IMPACT: IJRANSS)**
**ISSN(E): 2321-8851; ISSN(P): 2347-4580**
**Vol. 3, Issue 9, Sep 2015, 127-138**
**© Impact Journals**

# DROUGHT STRESS EFFECT ON SOME BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS; ACCUMULATION OF TOTAL POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS IN LEAVES OF TWO PROVENANCE SEEDLING *PISTACIA LENTISCUS*

**FATMA CHEHRIT-HACID[1], AREZKI DERRIDJ[2], FARIDA MOULTI-MATI[3] & ABDERRAHMANE MATI[4]**

[1]M. Mammeri University, Department of Biology, Laboratory of Biochemistry and Biotechnologies, Tizi-Ouzou, Algeria

[2] M. Mammeri University, Department of Agronomy, Laboratory of Natural Resources, Tizi-Ouzou, Algeria

[3,4]M. Mammeri University, Department of Biochemistry, Laboratory of Biochemistry and Biotechnologies, Tizi-Ouzou, Algeria

## ABSTRACT

In Mediterranean climate which characterized by warm, dry summers, cool and wet winters, drought stress affects growth and survival of species. Study of the impact of drought on some biochemical features would contribute to understand strategies of *Pistacia lentiscus* to cope with Mediterranean field conditions. Seedlings of *P. lentiscus* were subjected to summer drought in greenhouse by without watering. Seeds of plants growing in the Azazga region (North Slope of Kabylie) and Bouira one (southern slopes of Kabylie) were used to obtain seedling. Relative water contents, proline (osmotic solute), pigments, lipid peroxidation, total polyphenols, total flavonoids are investigated.Drought induced a slight but significant decrease in relative water content and an increase in the proline level indicating the maintenance of osmotic balance. Total polyphenols and total flavonoids were not influenced by the drought.

**KEYWORDS:** Drought Stress, Mediterranean, *Pistacia Lentiscus*, Lipid Peroxidation, Total Polyphenols, Total Flavonoids

## INTRODUCTION

The Mediterranean climate which characterized by warm, dry summers and cool, wet winters (Daget, 1997; Spano et al 2003) was considered the most vulnerable regions to climate change with a pronounced warming and a sharp decrease in precipitation in the spring and summer seasons (Gao and Giorgi, 2008).In its ecosystems, the summer water deficit is considered the main environmental constraint for plant growth and survival (Galmès et al 2007)that can seriously reduce crop productivity and causes changes in biomass accumulation, grown rate and many other physiological or structural traits (Chatanya et al 2003;Sepanlo et al 2014).

In response to drought stress, plants adopt various mechanisms. Plants witch accomplishestheir life cycle when water is plentiful; those tolerate the drought by accumulating high concentrations of substances, allowing to withstand dehydration such as secondary metabolites (Kleinwächter and Selmar, 2015), compatible solutes(Bartels and Phillips, 2010); and those avoid water deficit by a suite of traits that modulate water utilization such as Root system traits and C3/C4 or CAM photosynthesis (Mullet, 2009).

Pistacia lentiscus L. is a dioecious, evergreen small tree or shrub of the Anarcadiaceae family up to 8 m tall, widely distributed in a variety of habitats in Mediterranean ecosystems (Correiaand Diaz Barradas, 2000); it behaves as a

thermophilous species, growing in warm areas at low altitude and medium altitudes (Flexas et al 2001). Thus, it may be used for reforestation programs under Mediterranean climatic conditions (Garcia-Fayos and, Verdu 1998). It's one of the most important Mediterranean "keystone" species (Naveh, 1995) and is an interesting model species for evaluation of drought effects (AïtSaïd et al 2013). The present study was aimed todetermine drought tolerance among tow populationsof *Pistacialentiscus* with reference to lipid membrane peroxidation, chlorophyll, proline and polyphnenol contents.

## MATERIAL AND METHODS

### Plant Material and Culture Conditions

The fruits of *Pistacia lentiscus* plants growing in the regions Azazga (North Slope of Kabylie) and Bouira (southern slopes of Kabylie) were used in this study. The two batches of the fruit containing the seeds were soaked in water for 24 hours to remove the pulp. The floated seeds (non-viable) were removed and the remainder was scarified with concentrated sulfuric acid for 15 minutes and immediately rinsed and kept under tap water for 24 hours to remove all traces of sulfuric acid (Ates, 2011). 100 seeds per population were germinated on two layers of filter paper moistened with 10 ml of distilled water in Petri dishes incubated at room temperature. After 15 days of incubation, the seeds of the two provenances germinated with 86.36 ±9.24 81 and 81,82±10.79 % respectively. At the two leaves stage (twenty four seedlings for each provenance were planted in bags containing about 2 kg of soil collected in the area of growth of the species; the bags were placed in a greenhouse at the Institute of Agricultural means specialized technology, under natural conditions with temperatures reaching 51, 6± 3,84 °C in average, and watered as needed, about twice a week.At the beginning of stress (mid-August), half of the plants were subjected to water stress by suspending watering for twelve days. Because two plants were dead, others were watered twice and then stressed for twelve days.

### Relative Water Content (RWC)

Five plants from each treatment were randomly selected. The relative water content was evaluated according to the method described by Seelig et al (2009), briefly Fresh weight of the sample leaves (FW) was obtained by weighing them immediately after sampling using a precision balance; Weight at full turgor pressure (TW) was obtained after saturating samples in water for 24 hours, and dry weight (DW) was obtained after oven drying samples at 80C for 24h.

$$RWC\ (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)]\cdot 100$$

### Proline Contents

For each sample, 100mg of dry leaves were mixed with 2mL of 80% of methanol (v/v) and heated in a Water bath at 85°C for 1hour. After cooling, 1mL of leaf extract was mixed with 1mL of acidic ninhydrin reagent and 1mL glacial acetic acid. The mixture was well shaked for few seconds and incubated in a water bath at 100°C for 30mintes. After an ice cooling period of 3 minutes, 5mL of toluene were added to the mixture and vortexed again. The upper phase of the mixture was collected and dehydrated with a pinch of anhydrous sodium sulfate. Then, absorbances of leaf samples were measured and calculated. Proline contents were measured by colorimetric method as described by Thiam et al (2013). The amount of proline, on a fresh-matter basis of plant leaves, was determined according to a calibration straight graph constructed from a series of standard proline solutions. The absorbance of toluene phase was estimated at 528 nm using UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer Shimadzu. Appropriate proline standards were included for the calculation of proline in the samples. Each measure was repeated three times to ensure reproducibility of results.

**Leaf Pigment Content**

Frozen leaves samples (0.2 g) were analyzed for chlorophyll contents. The leaves were ground in 3 ml cold 80% acetone using a pestle and mortar. Acetone extracts were centrifuged at 3000 g for 10 min and the resulting pellets were extracted in cold 80% acetone. This operation was repeated three times. The successive supernatants were pooled and centrifuged at 4000 g for 5 mintes for clarification. The absorbance of the acetone extracts was recorded at 626, 647, 663 and 470 nm using UV/VIS spectrophotometer. The amounts of Chlorophyll were calculated according to Porra (2002).

**Lipid Peroxidation**

100 mg of leaves samples were homogenized in 5 ml of 0.1% trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at 10 000 × *g* for 5 minutes at 4 °C. Aliquot of 1 ml supernatant was mixed with 4ml of 0.5% thiobarbituric acid (TBA) prepared in TCA 20%, and incubated at 95 °C for 30 min. After stopping the reaction in an ice bath for 5 minutes, samples were centrifuged at 10 000 × *g* for 10 min at 25°C. The supernatant absorbance at 532 nm was measured usingUVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer Shimadzu. Lipid peroxidation rate equivalents (nmolmalondialdehyde $ml^{-1}$) were calculated by using the formulae given by Hodges et al. (1999).

**Polyphenol Extraction**

The samples of *Pistacia*leaves were dried in the open air and in the dark. Samples were grounded in the blender before the extraction. The mean particle size(d=0.3092±0.16 mm).Plant samples (0.5 g) were extracted by 80% ethanol (5ml) at 50°C for 30minutes. The solutions were centrifuged at 2400 g for 20 minutes, the supernatant was recovered and adjusted with 80% ethanol and stored at - 20 ° c.

**Total Flavonoid Determination**

The method used to determine total flavonoids is derived from the protocol described by Li et al. (2010). Briefly, 0.5 ml of the sample solution was introduced into a test tube. The volume was made up to 3 ml with distilled water and then 0.3 ml of $NaNO_2$ (1: 20) were added. After 6 minutes, 0.3 ml of $AlCl_3$were added(1: 10). 4.0 ml of 1M NaOH were added later 6min. Then, the whole was adjusted to 10 ml with distilled water. The solution was shaken well and incubated for 15 minutes at room temperature. The solutions were scanned by UVmini-1240 UV-Vis Spectrophotometer Shimadzu, using quartz cuves (1.0 cm) at 506 nm against a blank. The rutin was used as the standard for a calibration curve. The flavonoids content was expressed on mg/g DW.

**Total Polyphenolic Compound Determination**

300 µl of ethanolic extract were added to test tubes containing 2100 µl of distilled water and 150 µL of FC reagent. The mixtures were vortexed and allowed to equilibrate (20 °C, 10 min) after which, color was stabilized by the addition of sodium carbonate (450 µL of a 0.7 mM solution); then, the mixture was vortexed and incubated at 40 °C for 20 min. Tubes were cooled rapidly in ice. The developed color was read at 765 nm using polyphenol content was expressed as mg/g DW (mean±SD) (Ramirez-Sanchez et al 2010).

### Data Analysis

Statistical analyses were performed using Statisica 7.1. All the experiments were conducted with a minimum of three replicates and results were expressed as mean ± standard deviation (SD). Data were subjected to one way ANOVA followed by Newman-Kurls when differences were significant. Statistical significance was set at $P<0.05$. Data were tested for normality by shapirowilk test and for homogeneity by Levene's test. A principal component analysis was used to examine potential correlation between different parameters.

## RESULTS

### Relative Water Content (RWC)

The relative water content (RWC) is a key indice for drought stress study (Talbi et al 2015). At the beginning of stress, both populations displayed similar values of leaf RWC (Fig. 1). It was 96±3 % and 95±1 % for Azazga and Bouira respectively. However, the difference between the control and the stressed plants was significant for both populations (p=0,002) although leaf RWC decreased weakly, with 4% and 3% respectively during drought stress.

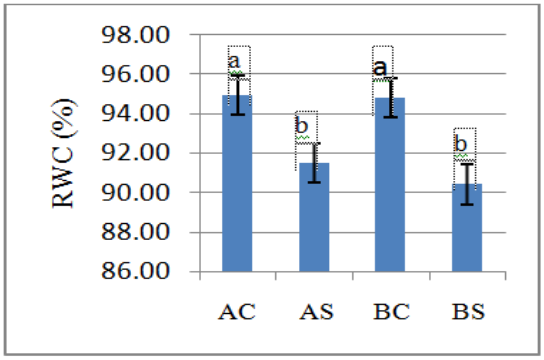



**Figure 1: Changes in RWC (%) of Two *P. Lentiscus* Populations (AC: Azazga Control, AS: Azazga Stressed, BC: Bouira Control, BS: Bouira Stressed). Values Are Mean±SE Based on Four Replicates**

### Proline Content

Under control condition, the results obtained showed that proline contents were similar in both *P. lentiscus* populations with 13,26±2,15 and 11,83±1,57 µmole/g FW in Azazga and Bouira respectively. However, in stressed plants, the increase was about 2 fold in average ($p<0,000001$) (fig.2) likely due to an increased need of proline for processes such as increased protein biosynthesis or due to a blockage of proline-consuming processes (Ramadan et al 2014).

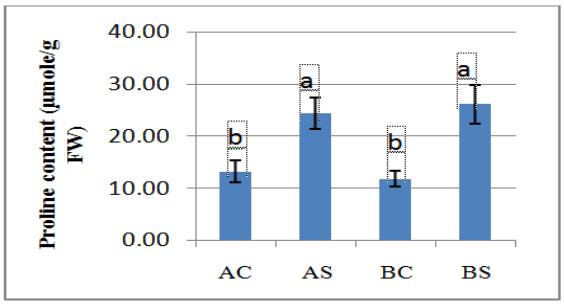



**Figure 2: Changes Inproline Contents (µg/Ml FW) of Two *P. Lentiscus* Populations (AC: Azazga Control, AS: Azazga Stressed, BC: Bouira Control, BS: Bouira Stressed). Values Are Means±SE Based on Four Replicates**

**Pigment Content**

Under control conditions, both populations exhibit significant differences in the levels of all leaves pigments (p value<0,05), seedling from Brouira showed higher value than those from Azazga whereas the Chl a/b ratio in Azazga seedling was higher than in Bouira seedling . Water stress induced a conspicuous decrease as well in all the pigments than in chl a/chl b ratio (p value <0,05). All pigments decreased in Bouira population more than in Azazga one; chl a, chlb,and car (c+x) decreased respectively by 42,29%,32,32% and 21,43% in Azazga population while they were 47,05%, 46,00% ,24,49% and in Bouira one. Moreover, the differences of $car_{(c+x)}$/total chl and chla/chlb ratios were insignificant.

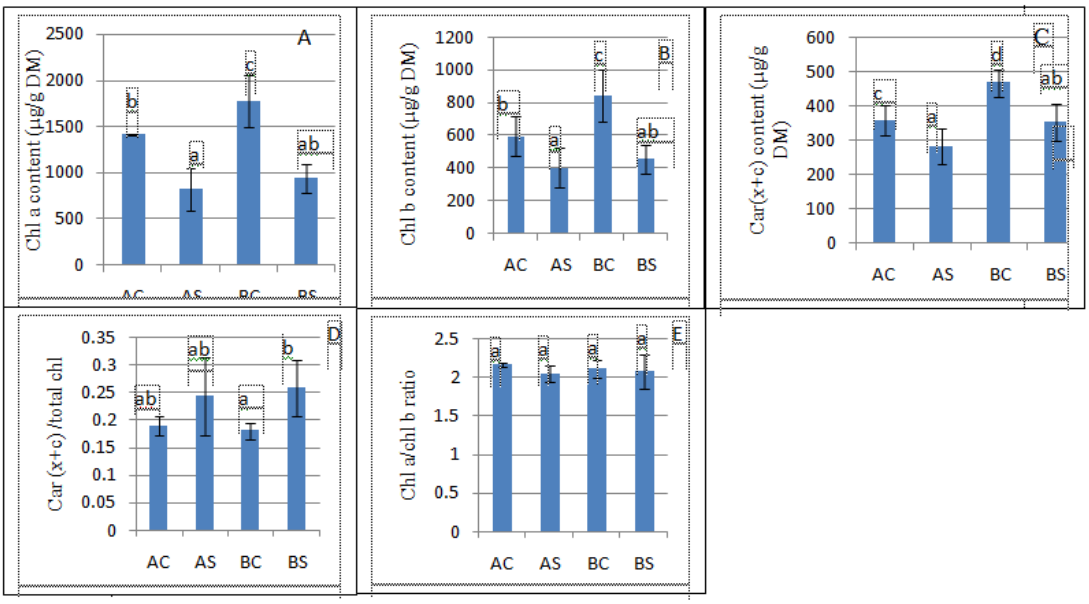



**Figure 3: Changes in Pigment Content (µg/G DM) In Leaves of Two *P. Lentiscus* Population Seedlings under Drought Stress. A: Chlorophyll A; B: Chlorophyll B; C: Total Carotenoids; D: Total Carotenoids/Total Chlorophyll Ratio E: Chla/Chb Ratio Values Are Means±SE Based on Four Replicates. Values Are Means±SE Based On Four Replicates**

**Lipid Peroxidation**

Under control conditions, the difference in concentrations of MDA in leaves of the two populations was insignificant p value= 0,28; it was 4,09±0,41 nmol/ml and 2,44±1,02 nmol/ml in Azazga and Bouira populations respectively. Compared to control, stressed seedling showed higly MDA concentrations in both populations (p value =0,0016) where they reached the same level. The increment in Bouira population was 121,31%, whereas it was only 30,80% Azazga population.

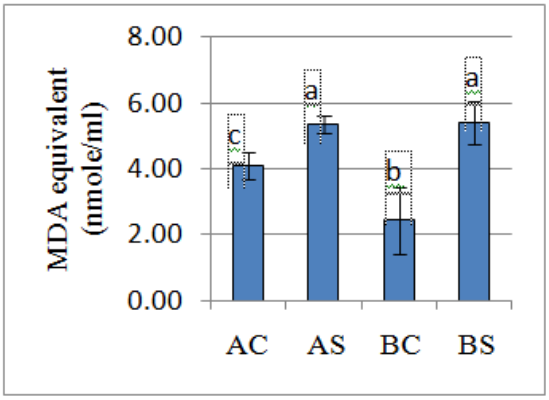



**Figure 4: Changes in MDA Content (Nmol/Ml) in Leaves of Two *P. Lentiscus* Population Seedlings Under Drought Stress Values are Means±SE Based on Three Replicates**

**Polyphenol Content**

The differences in flavonoid contents were insignificant between the populations of *P. lentiscus* under control conditions and drought treatment (p=0,196**)** FT levels in Azazga population was higher than in Bouira one (17,%) whereas perspicuous increase was observed in the last one (15,12%).TPP contents were insignificantly different both under condition control and stress treatment (p=0,59). TPP varied from 87,41±5,37 mg.g-1 DW to 105,11±1,2. The same tends was observed in situ (data not shown).

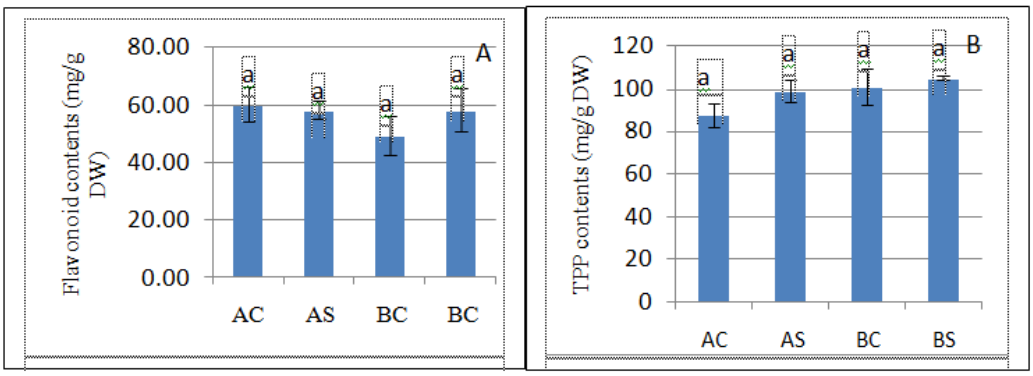



**Figure 5: Changes in Polyphenol Contents (Mg/G DW) A: Flavonoid Content; B: TPP Contentin Leaves of Two *P. Lentiscus* Population Seedlings under Drought Stress. Values are Means±SE Based on Four Replicates**

## DISCUSSIONS

Furthermore the drought stress imposed to *P. lentiscus* seedling, they were exposed to summer environmental conditions including high temperatures and high light irradiance. The results of the various measures showed signs of stress in both treated seedlings.Relative water contents,related to water uptake by the roots and to its loss by transpiration, are considered a way to evaluate plant water status (Anjum et al, 2011). The weak decrease in RWC in both populations was similar with the trend that observed by Catoni et al (2013); *P. lentiscus* was one of the sclerophyllous species maintained highest RWC. Furthermore, the reduction of RWC in *Moringa oleifera*, drought tolerant species, was insignificant (Rivas et al 2013). For these auteurs, the maintained of RWC at high level helps to maintain cellular physiological processes and growth. Prolineplays an important role in stress tolerance. Its accumulation is the first response of plants exposed to water-deficit stress in order to reduce injury to cells (Sankar et al 2007; Anjum et al., 2011).It was

negatively correlated with RWC. Similar results obtained in several drought-stressed plants such as *Cocosnucifera*

(Gomes et al, 2010) and sugarcane (Medeiros et al 2013). Proline is an effective organic substance, functioning as well as an osmolyte conferring osmotic adjust, than in the detoxification of ROS and the cellular stabilization (Gao et al 2008; Kusvuran et al 2013; Ben Rejeb et al 2014). For Gao et al (2008), a direct consequence of a higher proline concentration was the relatively higher water retaining capacity.Drought stress generally causes decrease in photosynthetic pigments (Liu Y. et al 2011; wang et al 2014;Rajasekar and Manivannan, 2015). Nikolaeva et al (2010) reported that chla and b deceased under severe drought stress while chl a/chl ratio remained unchanged. On other hand, Chl a/ b ratio significantly increased in *Broussonetia papyrifera* and*Platycaryalongipes*, but decreased in *Cinnamomum bodinieri* (Liu C. et al 2011).The decrease in chlorophyll content under drought stress might be due to the increased activity of chlorophyllase leading to chlorophyll degradation (Ajithkumar and Panneerselvam, 2013; Ajithkumar and Panneerselvam, 2014) and thus to degradationof chlorophyll-proteincomplex of the thylakoids under severedrought condition (Wang, 2014). Chlorophyll loss would contribute to the survival of severely stressed plants by reducing the amount of photons absorbed by leaves (Munné-Bosch and Alegre, 2000) reduce the proportion of PSII (Ait-saïd et al 2013).For Jain et al (2013), decrease in chlorophyll was due to decrease in chlorophyll biosynthesis rather than its degradation. Ait-saïd et al (2013), working in situ on adult individuals of *P. lentiscus*, found that carotenoids increase in summer. This difference would be due to the development stage of the plant, intensity, duration and rate of progression of the stress (Chaves et al 2009).The MDA contents were significantly higher in stressed seedling than in the controls(p=0,0016). The increase in Azazga seedling was only 1,31 folds while it was 2,28 folds in Bouira seedling. This increase reached same level in both populations (5,35 and 5,40 nmol.g-1). It may be caused by the combined effect of the heat and drought where Bouira population could be more sensitive than Azazga one. The increase has been generally observed in plant stressed. This suggested that under combined environmental stresses such as drought and high temperatures, Azazga population were more adapted than Bouira one. Under drought treatment, both flavonoids and total phenolic compounds differ in various studies; in some ones there was an increase (Trabelsi et al 2013) and in others there was a decrease in the rate of TFC (McKiernan et al, 2014) or no significant difference with favorable conditions (Daniels et al 2015). Flavonoid contents of *Quercus ilex* decreased generally in summer under drought, compared to winter but their behavior varies at individual level of these substances. So, epicatechin, and epicatechingallate showed no seasonal changes whereas seasonal variations in flavonol-hexosides decrease from winter to summer (Brossa et al 2009). Liu et al (2011) studying two desert shrubs**,** found that flavonoids in *Caryopteris mongolica* increased while they decreased in *Reaumuria Soongorica.* Moreover,anthocyanin content increased in both shrubs, indicating different regulation responses in the flavonoid pathway. Alexieva et al (2001) found that in pea and wheat plant anthocyanin content was unaffected by drought while soluble phenol content was significantly increased. For Rajabbeigi et al (2014), drought and UV-B treatments affect phenolic profile while total phenolic content remained unchanged.

## CONCLUSIONS

In conclusion, *P.lentiscus*tolerate drought stress by maintaining RWC at high level and accumulating osmoregulator substances such as proline conferring osmotic adjust to the plant. However, itexhibitedoxidative stress manifested by the increase of the MDA content and decrease of photosynthetic pigments.Identification and quantification of polyphenols and particularly flavonoids could help to understand the mechanismof tolerance of this species.

## REFERENCES


1. Ait said S., Torre F., Derridj A., Gauquelin T., Mevy J.P. (2013). Gender, Mediterranean drought, and seasonality: photosystem II photochemistry in *Pistacia lentiscus* L. PHOTOSYNTHETICA 51 (4): 552–564.
2. Ajithkumar I.P., Panneerselvam R. (2013). Osmolyte accumulation, photosynthetic pigment and growth of Setariaitalica(L.) P. Beauv. under drought stress. Asian Pacific Journal of Reproduction2(3): 220-224.
3. Ajithkumar I. P., Panneerselvam R. (2014**).** ROS Scavenging System, Osmotic Maintenance, Pigment and Growth Status of Panicumsumatrense Roth. Under Drought Stress.Cell BiochemBiophys 68:587–595.
4. Alexieva V.,Sergiev I., Mapelli S.,KaranovE. (2001).The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337–1344
5. Anjum S.A., Xie X. Y. , Wang L.C., Saleem M. F.,ManC.and Lei W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African Journal of Agricultural Research 6 (9): 2026–2032.
6. Ates E. (2011). Influence of some hard seededness-breaking treatments on germination in persian clover (*Trifolium resupinatum ssp. typicum* fiori et paol.) seeds. Romanian Agricultural Research 28: 229–236.
7. Bartels D., Phillips J. (2010). Drought stress tolerance. Genetic Modification of PlantsBiotechnology in Agriculture and Forestry Volume 64: 2010, 139-157
8. Ben Rejeb K., Abdelly C., Savouré A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. Plant Physiology and Biochemistry 80 : 278-284
9. Brossa R., Casals I., Pinto´-MarijuanM., Fleck I. (2009). Leaf flavonoid content in Quercus ilex L. resprouts and its seasonal variation. Trees 23:401–408.
10. Catoni R., Varone L., Gratani L. (2013).Variations in leaf respiration across different seasons for Mediterranean evergreen species. PHOTOSYNTHETICA 51 (2): 295–304.
11. Chaitanya K.V., Jutur P.P., Sundar D., Reddy A. R. (2003). Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. Plant Growth Regulation 40: 75–80.
12. Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany 103: 551–560.
13. CorreiaO., Diaz Barradas M. C. (2000). Ecophysiological differences between male and female plants of *Pistacia lentiscus* L. *Plant Ecology* 149:131–142.
14. Daget P. (1977). Le bioclimat mediterraneen: caractères généraux, modes de caractérisation Vegetatio, vol. 34, 1 :1-20.
15. Daniels C.W., Rautenbach F., Marnewick J.L., Valentine A.J., Babajide O.J., Mabusela W.T. (2015).Environmental stress effect on the phytochemistry and antioxidant activity of a South African bulbous geophyte, *Gethyllis Multifolia* L. Bolus. South African Journal of Botany 96: 29–36.
16. FlexasJ., Gulíasa J., Jonasson S., Medranoa H., Mus M. (2001). Seasonal patterns and control of gas exchange in

local populations of the Mediterranean evergreen shrub *Pistacia lentiscus* L. ActaOecologica 22: 33−43

17. Galmès J., Flexas J., Savé R.,Medrano H. (2007). Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. Plant Soil 290:139–155.
18. Gao X., Giorgi F. (2008). Increased aridity in the Mediterranean region under greenhouse gas forcing estimated from high resolution simulations with a regional climate model. Global and Planetary Change 62: 195–209.
19. Gao J., Xiao Q., Ding L., Chen M., Yin L., Li J., Zhou S. He G.(2008). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in Alternantheraphiloxeroides and Oryza sativa subjected to drought stress. Plant Growth Regul 56:89–95.
20. Garcia-FayosP.,Verdu M.(1998). Soil seed bank, factors controlling germination and establishment of a Mediterranean shrub: *Pistucia lentiscus L.* ActaOecologica 19 (4) 351-366.
21. Gomes F. P., Oliva M. A., Mielke M. S., Almeida A.F., Aquino L. A.(2010). Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of Cocosnucifera submitted to drought stress. ScientiaHorticulturae126: 379–384.
22. Hodges D. M., DeLongJ.M., Forney C. F., Prange R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207: 604–611.
23. Jain M., Mittal M., Gadre R. (*2013).* Effect of PEG-6000 Imposed Water Deficit on Chlorophyll Metabolism in Maize Leaves. Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 9 No. 3
24. Kleinwächter M., Selmar D. (2015). New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. Agron. Sustain. Dev. 35:121–131
25. KusvuranS.,EllialtiogluS., Polat Z. (2013). Antioxidative Enzyme Activity, Lipid Peroxidation, and Proline Accumulation in the Callus Tissues of Salt and Drought Tolerant and Sensitive PumpkinGenotypes under Chilling Stress.Hort. Environ. Biotechnol. 54(4):319-325.
26. Li S., Zhu1 R., Zhong M., Zhang Y., Huang K., Zhi X., Fu S. (2010). Effects of ultrasonic-assistant extraction parameters on total flavones yield of *Selaginella doederleinii* and its antioxidant activity. Journal of Medicinal Plants Research 4(17): 1743–1750.
27. Liu C., Liu Y., Guo K., FanD., Li G., Zheng Y., Yu L., Yang R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of outhwestern China. Environmental and Experimental Botany 71:174–183.
28. Liu Y.B., Liu M.L., Cao B. (2011). Effects of drought stress on antioxidant enzyme, photosynthetic pigment and flavonoid pathway in two desert shrubs. Sciences in Cold and Arid Regions 3(4): 0332–0338.
29. Medeiros D. B., Silva E. C., Nogueira M. C. R. J., Teixeira M. M., Buckeridge M. S. (2013) Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. Theoretical and Experimental

Plant Physiology, 25(3): 213-222.

30. Mullet J. (2009).Traits and Genes for Plant Drought Tolerance*in Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement.* Biotechnology in Agriculture and Forestry, A .L. Kriz, B.A. Larkins (eds.), Vol. 63: 55-64.
31. Munné-Bosch S., Alegre L. (2000).Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus offcinalis* plants. Planta 210: 925–931.
32. Naveh Z. (1995). Conservation, Restoration, Research PrioritiesFor Mediterranean Uplands Threatenedby Global Climate Change. *in*: MORENO J, OECHEL WE (Eds.) Global change and Mediterranean–type ecosystems ecological studies VOL. 117. SPRINGER, NEW YORK, PP. 482–508.
33. Nikolaeva M. K., Maevskaya S. N., Shugaev A. G., Bukhov N. G. (2010). Effect of Drought on Chlorophyll Content and Antioxidant Enzyme Activities in Leaves of Three Wheat Cultivars Varying in Productivity. Russian Journal of Plant Physiology Vol. 57 (1): 87–95.
34. Porra R. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research 73: 149–156.
35. Rajasekar M.,Manivannan P. (2015). Drought and drought with triazoles induced changes on pigment composition and biochemical constituents of Zea mays L. (Maize). Appl. Transl. Genomic. http://dx.doi.org/10.1016/j.atg.2015.04.001
36. Rajabbeigi E., Eichholz I., Beesk N., Ulrichs C.,KrohL. W, RohnS., Huyskens-KeilS. (2014). Interaction of drought stress and UV-B radiation – impact on biomass production and flavonoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Journal of Applied Botany and Food Quality 86, 190 – 197.
37. Ramadan A., Sabir J. S. M., Alakilli S. Y. M., Shokry A.M., Gadalla N. O., Edris S., Al-Kordy M. A., Al-Zahrani H. S., El-Domyati F. M., Bahieldin A., Baker N. R., Willmitzer L. Irgang , S. (2014). Metabolomic Response of CalotropisproceraGrowing in the Desert to Changes in Water Availability. PLOS ONE 9 (2):e87895
38. Ramirez-Sanchez I., Lisandro M., Ceballos G., Villarreal F. (2010). Fluorescent detection of (–)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin–Ciocalteu method. Journal of Food Composition and Analysis 23: 790–793.
39. Rivas R., Oliveira M. T., Santos M. G. (2013). Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. Plant Physiology and Biochemistry 63: 200–208.
40. Sankar B., Jaleel C. A., Manivannan P., Kishorekumar A., Somasundaram R., R. panneerselvamR. (2007). Drought-induced biochemical modifications and proline metabolism in *abelmoschus esculentus* (L.) Moench. Acta Bot. Croat. 66 (1), 43–56.
41. Seelig H.D.,Hoehn A., Stodieck L. S.,Klaus D. M., Adams III W. W.,Emery W. J.(2009). Plant water parameters and the remote sensing $R_{1300}/R_{1450}$ leaf water index: controlled condition dynamics during the development of water deficit stress. IrrigSci 27:357–365.DOI 10.1007/s00271-009-0152-5
42. Sepanlo N., Talebi R., Rokhzadi A., Mohammadi H. (2014). Morphological and physiological behavior in

soybean (Glycine max) genotypes to drought stress implemented at pre- and post-anthesis stages.ActaBiologicaSzegediensisVol. 58(2):109-113

43. Spano D. , Snyder R. L., and Cesaraccio C. (2003). Mediterranean climates in Phenology: an Integrative Environmental Science, 39:139-156.
44. Talbi S., Romero-Puertas M. C., Hernández A., Terrón L., Ferchichi A., Sandalio L. M. (2015). Drought tolerance in a Saharian plant Oudneyaafricana: Role of antioxidant defences. Environmental and Experimental Botany 111: 114–126.
45. Trabelsi N., Waffo-Te´guo P., Snoussi M., Ksouri R., Me´rillon J. M., Smaoui A., Abdelly C. (2013).Variability of phenolic composition and biological activities of two Tunisian halophyte species from contrasted regions. ActaPhysiol Plant 35:749–761.
46. Thiam M., Champion A., Diouf D., SY M. O. (2013).NaCl Effects on *In Vitro* Germination and Growth of Some Senegalese Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Cultivars. ISRN Biotechnology Volume doi :10.5402/2013/382417
47. Wang L. (2014). Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*(Hevea brasiliensis* Muell.. Arg.). Plant Physiology and Biochemistry 83: 243-249.