

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des sciences de La Nature et de La vie

Département de Biologie

Laboratoire de recherche : Biotechnologies, Environnement et Santé

THÈSE DE DOCTORAT 3^{ème} cycle (LMD)

En Biologie

Spécialité : Biologie et santé

**ETUDE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES ET
PHARMACOLOGIQUES DE L'AMANDE AMERE**

(Prunus amygdalus)

Par

GUICI EL KOUACHEUR Khadidja

Devant le jury composé de :

N.BOUDJEMA	MCA, USD Blida-1	Présidente
D.CHABANE	Professeur, USTHB Alger	Examinatrice
R.ARHAB	Professeur, Univ Oum El Bouaghi	Examineur
F. SAIDI	Professeur, USD Blida-1	Directrice de thèse
H.S.CHERIF	MCA, USD Blida-1	Co-directrice de thèse

Blida, 2023

RESUME

La présente étude a pour objectif d'évaluer les propriétés physicochimiques, la composition en acides gras et en tocophérols, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes, ainsi que les activités antimicrobiennes, antioxydantes, inhibitrices des enzymes α -glucosidase et α -amylase, anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* et photoprotectrice de l'huile pressée à froid des graines de *Prunus amygdalus var. amara* cultivées en Algérie.

La teneur en huile des graines d'amande amère est égale à 35,5 %. Cette huile est caractérisée par un indice de saponification élevé (215,94 mg de KOH / g d'huile), un indice de peroxyde de 7,74 meq O₂ kg d'huile, un K₂₃₂ de 2,612 et un K₂₇₀ égal à 0,39.

L'analyse par CG-MS de l'huile d'amande amère (HAA) a révélé que l'acide oléique (68,27%) et l'acide linoléique (16,14%) sont les acides gras majoritaires.

L'analyse par HPLC a montré que l' α -Tocophérol (85,77 mg/kg) est l'isomère dominant dans cette huile. Les contenus phénoliques et flavonoïdes totaux sont respectivement de 21,94±0,29 et 21,52±0,14 μ g/ml.

Les souches bactériennes, les levures et les dermatophytes testées s'avèrent plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HAA.

Une activité antioxydante appréciable a été obtenue en utilisant le test CUPRAC ($A_{0,50} = 34 \pm 0,44 \mu$ g/ml) et modérée, pour les tests DPPH, ABTS, FRAP et β -carotène.

L'HAA a présenté de meilleures activités inhibitrices des enzymes α -glucosidase et α -amylase comparée à la molécule de référence l'acarbose, et une activité inhibitrice modérée de l'acétylcholinestérase (AChE).

En outre, l'HAA a exercé un effet anti-inflammatoire remarquable testé *in vitro* et *in vivo*, comparable à celui du diclofénac sodique. Ces effets ont été confirmés à échelle cellulaire par des examens histopathologiques.

Par ailleurs, la mesure de la capacité photoprotectrice de l'HAA a révélé une valeur de FPS modérée égale à 7.34

Globalement, l'HAA possède un potentiel probant favorable pour la conception de nouvelles préparations industrielles à des fins nutritionnelles, pharmaceutiques et cosmétologiques.

Mots clés : Huile de *Prunus amygdalus var. amara*, paramètres physico-chimiques, acides gras, antioxydante, inhibitrice des enzymes, anti-inflammatoire, photoprotectrice

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the physicochemical properties, fatty acid composition, total polyphenol, flavonoid, and tocopherol contents, as well as the antimicrobial antioxidant, enzyme inhibitory, anti-inflammatory *in vitro and in vivo* and photoprotective activities of *Prunus amygdalus var. amara* cold-pressed oil cultivated in Algeria.

Bitter almond *produces* seeds that yield 35.5% of oil. It was characterized by a high saponification index of 215.94 mg KOH g⁻¹ of oil, a peroxide value of 7.74 meq O₂kg of oil, a K₂₃₂ of 2.612, and a K₂₇₀ of 0.39.

This oil represented a valuable source of healthy fatty acids. GC-MS analysis revealed oleic (68.27%) and linoleic (16.14%) as the main fatty acids. α-Tocopherol (85.77 mg/kg) was found to be the major component. The total phenolic and flavonoid contents were respectively 21.94±0.29 and 21.52± 0.14 µg/ml.

The inhibitor potential of BAO (bitter almond oil) revealed a good activity against some microorganisms of both Gram+ and gram- bacteria, as well as yeast and dermatophytes strains.

The oil showed good antioxidant activity (A_{0.50} = 34±0.44µg/ml) using the CUPRAC assay and low activity with DPPH, ABTS, FRAP, and β-carotene assays, respectively.

BAO displayed the most promising α-glucosidase and α-amylase activities compared to acarbose as a reference molecule, and moderate acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity.

Moreover, BAO demonstrated *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory efficiency in a dose-dependent manner, comparable to that of diclofenac sodium. These effects were supported with histological examinations.

Furthermore, the measurement of SPF value of the studied oil, revealed a moderate photoprotective activity with SPF value of 7.34

Overall, our results showed that BAO has a strong potential to design new industrial preparations with nutritional, pharmaceutical, and cosmeceutical applications.

Keywords *Prunus amygdalus var. amara* oil, physicochemical parameters, fatty acids. Antioxidant, enzyme inhibitory, anti-inflammatory, photoprotective.

المخلص

تهدف الدراسة الحالية إلى تقييم الخواص الفيزيائية والكيميائية، وتكوين الأحماض الدهنية ومحتويات البوليفينول الكلي والفلافونويد ، والتوكوفيرول ، وكذلك مضادات الأكسدة المضادة للميكروبات ، ومثبطات الإنزيم ، ومضادات الالتهاب الحي والأنشطة الواقية للضوء من *Prunus amygdalus var amara*. زيت العمارة المعصور على البارد المزروع في الجزائر.

ينتج اللوز المر بذور تنتج 35.5% من الزيت. وقد تميز بمؤشر تصبن مرتفع يبلغ 215.94 مجم من KOH g-1 من الزيت وقيمة بيروكسيد تبلغ $7.74 \mu\text{g}$ ، و 2.612 من K_{232} ، و 0.39 من K_{270} .

يمثل هذا الزيت مصدرا قيما للأحماض الدهنية الصحية. أظهر تحليل GC-MS أن acide oléique (68.27%) و acide linoléique (16.14%) هما الأحماض الدهنية الرئيسية. تم العثور على α -Tocopherol (85.77 mg/kg) ليكون المكون الرئيسي. كان إجمالي محتويات الفينول والفلافونويد على التوالي 21.94 ± 0.29 و 21.52 ± 0.14 ميكروغرام / مل.

أظهرت إمكانات المثبط لزيت اللوز المر نشاطاً جيداً ضد بعض الكائنات الحية الدقيقة لكل من البكتيريا ، وكذلك سلالات الخميرة والفطريات الجلدية.

أظهر الزيت نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة ($0.44 \pm 34 = A_{0.50}$ ميكروغرام / مل) باستخدام مقاييس CUPRAC ونشاط منخفض مع فحوصات DPPH و ABTS و FRAP و بيتا كاروتين، على التوالي.

عرض HAA أكثر أنشطة α -glucosidase و α -amylase الواعدة مقارنةً بالأكاربوز كجزء مرجعي، والنشاط المثبط المعتدل لأسيثيل كولينستراز (AChE).

علاوة على ذلك، أظهر HAA كفاءة مضادة للالتهابات في المختبر وفي الجسم الحي بطريقة تعتمد على الجرعة مقارنة بكفاءة ديكلوفيناك الصوديوم. تم دعم هذه التأثيرات بالفحوصات النسيجية.

أظهر قياس قيمة SPF للزيت المدروس نشاطاً معتدلاً للوقاية من الضوء بقيمة SPF تبلغ $7.34 \pm$. بشكل عام أظهرت نتائجنا أن HAA لديه إمكانات قوية لتصميم مستحضرات صناعية جديدة مع تطبيقات غذائية وصيدلانية ومستحضرات التجميل.

الكلمات المفتاحية. زيت اللوز المر، مضاد للأكسدة، مثبط للإنزيم، مضاد للالتهابات، واقى من الضوء

REMERCIEMENTS

« L'ambition est le chemin de succès. La persévérance est le véhicule dans lequel vous y arrivez » Bill Bradely

Mes vifs remerciements et ma sincère gratitude sont adressés à ma directrice de thèse, **Professeur SAIDI Fairouz** et Directrice du laboratoire de recherche de Biotechnologies, Environnement et Santé pour son soutien, sa rigueur scientifique, ses encouragements, ses conseils si précieux ainsi qu'à sa patience. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration pour toutes vos qualités humaines et scientifiques.

Mes chaleureux remerciements sont adressés à ma Co-directrice de thèse Madame **CHERIF Saida Hamida**, MCA à l'université de Blida 1, et à qui j'exprime ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude pour sa aide si précieuse, et surtout sa patience et sa disponibilité et également du temps qu'elle m'a consacré pour les corrections de ce manuscrit de thèse.

J'exprime notamment mes sincères remerciements aux honorables membres du jury :

Madame **Dr. BOUDJEMA N.**, MCA à l'université de Blida 1, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Mes chaleureux remerciements vont aussi à **Professeur CHABANE D.**, de l'USTHB d'Alger et à **Professeur ARHAB R.**, de l'université d'Oum El Bouaghi, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail.

Je tiens à remercier **Dr.BENSOUICI Chawki**, responsable de laboratoire de biochimie du Centre de Recherche de Biotechnologie de Constantine (CRBT) de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche, pour son soutien moral, sa disponibilité permanente, sa compétence et son honnêteté scientifique.

Un remerciement particulier à Madame **Marie Laure Fauconnier**, Professeur et responsable de laboratoire des substances naturelles à l'université de Liège pour son aide et sa contribution pour la réussite de ce travail. Votre gentillesse et vos valeurs humaines m'ont toujours beaucoup marqué.

Une pensée très particulière à mes chères amies et collègues **HALIMI Imane, Dr DROUCHE Imane, Dr.CHAALAL Nour el houda, KECIES Hadjer** et **Dr. Merzougui Hana** pour leur aide, encouragements et leur générosité inestimable.

Que tous ceux qui ont participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouvent dans ces lignes ma reconnaissance et mes remerciements les plus chaleureux.

DEDICACE

Merci à ma famille que je dois cette réussite professionnelle,

A mon très cher Papa qui est à l'origine de ce que je suis, tes prières et ta bénédiction m'ont toujours accompagnées et ont été un grand secours pour mener à bien mes études.

A ma très chère maman symbole de l'amour et d'affection, je te remercie maman pour tous les conseils avisés et les valeurs que tu m'as apporté.

C'est à travers vos encouragements que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée.

Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de la dignité, de l'honneur et de l'humilité. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réaliser aujourd'hui l'un de vos rêves.

A mes très chers frères et ma sœur et mes belles sœurs Zahia et Meriem pour avoir contribué à ma réussite.

*A toi mon frérot « **Ahmed** » pour m'avoir soutenu et avoir cru en moi.*

*A mes chers neveux et nièces et surtout à **Younes** que Dieu te garde pour moi.*

*A mes très chères amies **Hanae** et **Fatima** qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances. Je vous aime mes chéries.*

A tous ce ceux que j'ai omis de citer, je vous dédié ce travail en guise d'estime

« khadidja »

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

الملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION	14
CHAPITRE 1 :ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1.1. Amandier et huile d'amande amère	17
1.1.1. Historique	17
1.1.2. Classification et systématique	17
1.1.3. Description botanique de l'amandier.....	18
1.1.4. Exigences agro-écologiques de l'amandier	20
1.1.5. Aire de répartition géographique de l'amandier.....	20
1.1.6. Culture de l'amandier.....	21
1.1.7. Les variétés de l'amandier	21
1.1.8. Extraction de l'huile d'amande amère.....	21
1.1.9. Composition chimique de l'huile d'amandes amère.....	23
1.1.10. Conservation de l'huile d'amande amère.....	26
1.1.11. Usages traditionnels de l'huile d'amande amère.....	27
1.1.12. Effets thérapeutiques de l'huile d'amande amère.....	27
1.1.13. Toxicité de l'huile d'amande amère	28
1.2. Généralités sur les activités biologiques étudiées.....	29
1.2.1.introduction.....	29
1.2.2.Activités biologiques.....	29
1.2.2.1.Activité antimicrobienne.....	29
1.2.2.2.Activité antioxydante.....	30

1.2.2.3. Activité anti-diabétique in vitro.....	32
1.2.2.4. Activité anti cholinestérase.....	33
1.2.2.5. Activités anti-inflammatoires.....	35
1.2.2.6. Activité Photoprotectrice.....	37
CHAPITRE 2 :MATERIEL ET METHODES.....	40
2.1. Matériel.....	40
2.1.1. Matériel végétal.....	40
2.1.2. Matériel animal	41
2.1.3 Souches microbiennes.....	41
2.2. Méthodes.....	42
2.2.1. Extraction de l'huile d'amande amère.....	42
2.2.2. Détermination du rendement d'extraction	42
2.2.3. Caractérisation physico-chimiques de l'huile d'amande amère	42
2.2.4. Identification de la composition chimique de l'huile d'amande amère.....	47
2.2.5. Etude des activités biologiques.....	50
2.2.6. Analyse statistique.....	62
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	63
3.1. Détermination du rendement d'extraction	63
3.2. Etude des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'mande amère	64
3.2.1. Caractéristiques physiques	64
3.2.2. Caractéristiques chimiques.....	65
3.2.2.1. Composition en acides gras.....	67
3.2.2.2. Teneur en tocophérols.....	69
3.2.2.3 Teneur en polyphénols et flavonoides Totaux	71
3.3. Activités biologiques de l'huile d'amande amère.....	73
3.3.1.Activité antimicrobienne.....	73
3.3.2. Activité antioxydante.....	82
3.3.3.Activité d'inhibition enzymatique.....	92
3.3.3.1.Activité inhibitrice de l'α-glucosidase et α-amylase.....	93
3.3.3.2.Activité inhibitrice de l'AChE.....	97
3.3.4. Activités anti-inflammatoires.....	98
3.3.5. Activité photoprotectrice.....	107

CONCLUSION.....	110
APPENDICES.....	112
LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....	117
REFERENCES.....	119

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1.	Aspect général de l'arbre d'amandier.....	18
Figure 1.2.	Les différentes parties de l'amandier.....	19
Figure 1.3.	Rôle de l' α -glucosidase et α -amylase dans la digestion et le métabolisme de l'amidon.....	33
Figure 2.1.	Réaction d'oxydation des acides gras insaturés.....	45
Figure 2.2.	Réaction de réduction du réactif CUPRAC.....	53
Figure 2.3.	Activité enzymatique de l' α -glucosidase.....	55
Figure 2.4.	Récapitulatif des différentes solutions préparées.....	57
Figure 3.1.	Effet dose-dépendant de l'activité antibactérienne de l'HAA.....	74
Figure 3.2.	Diamètre de zone d'inhibition de la souche E.coli sous l'action de l'HAA et les antibiotiques.....	76
Figure 3.3.	Action antifongique (dose-dépendante) de l'HAA.....	79
Figure 3.4.	Diamètre de zone d'inhibition de quelques souches fongiques.....	80
Figure 3.5.	Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les standards (BHA ,BHT , α -tocophérol) sur le radical DPPH.....	84
Figure 3.6.	Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les standards (BHA,BHT) sur le radical ABTS.....	85
Figure 3.7.	Cinétique de l'activité antioxydante de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les standards (BHT, BHA) sur le CUPRAC.....	86
Figure 3.8.	Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les molécules standards (acide ascorbique et α -tocophérol) sur FRAP.....	87
Figure 3.9.	Cinétique de l'activité antiradicalaire de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les molécules standards (BHA,BHT) sur le β -carotène.....	88
Figure 3.10.	Cinétique d'inhibition de l'HAA de l'activité α -glucosidase.....	92
Figure 3.11.	Cinétique d'inhibition de l'HAA de l'activité α -amylase.....	94
Figure 3.12.	Activité inhibitrice de l'AChE de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i>	96

Figure 3.13	Effet des extraits de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> ,Kétoprofène et le diclofénac sodique sur la dénaturation des protéines BSA.....	99
Figure 3.14	Potentiel anti-inflammatoire in vivo de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i>	102
Figure 3.15.	Effet de l'HAA à des concentrations de 100 et 50 %,et diclofénac de sodium (0.5%) sur le modèle de l'induction de l'oreille par xylène.....	106
Figure 3.16.	Activité photoprotectrice de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> à différentes longueur d'onde λ	107
Tableau 1.1.	Classification systématique de <i>P.amygdalus var.amara</i>	18
Tableau 1.2.	Teneur en huile (%) des échantillons d'amande amère en fonction de leur origine.....	24
Tableau 1.3.	Composition en acides gras (%) de l'huile d'amande amère.....	25
Tableau 2.1.	Classement des valeurs FSP (Facteur de Protection Solaire).....	61
Tableau 3.1.	Paramètres physicochimiques de l'huile d'amande amère.....	64
Tableau 3.2.	Profil en acides gras de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i>	68
Tableau 3.3.	Teneur en tocophérols de l'huile d'amande amère.....	70
Tableau 3.4.	Teneur en polyphénols et flavonoides totaux de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i>	72
Tableau 3.5.	Diamètre de zone d'inhibition (mm) de l'HAA vis-à-vis des souches bactériennes.....	74
Tableau 3.6.	Diamètre de zone d'inhibition de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> sur des souches fongiques.....	78
Tableau 3.7.	Activité antioxydante de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> par différentes méthodes.....	83
Tableau 3.8.	Activité de l'inhibition enzymatique de l'huile des graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> contre l' α -glucosidase et AChE.....	93
Tableau 3.9.	Pourcentage de l'inhibition de dénaturation des protéines BSA à différentes concentrations de l'huile de graines de <i>P.amygdalus var.amara</i> et les molécules standards	99
Tableau 3.10.	activité anti-inflammatoire in vivo de l'HAA.....	102

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis longtemps, les populations locales de plusieurs régions du monde utilisent les plantes entières ou certaines parties de plantes aromatiques et médicinales, sous forme d'infusion, de décoction, de cataplasme et autres, afin de prévenir et de traiter les maladies [1,2,3,4,5,6,7].

La stratégie de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2014-2023, vise à renforcer le rôle de la médecine traditionnelle, en soulignant l'importance de développer et d'inclure l'utilisation des plantes médicinales dans les systèmes de santé des pays membres [8]. De ce fait, les chercheurs se sont inspirés des usages traditionnels des plantes médicinales en développant et valorisant les produits pharmaceutiques en médecine moderne prenant en considération leurs nombreux effets thérapeutiques et de leurs effets secondaires limités [9-19].

Les produits naturels, comme les graines oléagineuses et les huiles végétales peuvent être considérés comme une alternative prometteuse offrant de multiples avantages pour la santé, avec moins d'effets secondaires par rapport à leurs homologues synthétiques [20].

Actuellement, grâce aux avancées technologiques et scientifiques, il est possible d'extraire, de caractériser et d'évaluer les composés bioactifs des plantes médicinales [20].

Un intérêt croissant a été accordé aux huiles pressées à froid obtenues à partir de l'extraction des graines oléagineuses, car le système de pressage n'implique aucun traitement thermique et chimique, et aucun processus de raffinage, ce qui pourrait permettre de maintenir plus efficacement les propriétés nutritionnelles, organoleptiques et thérapeutiques de ces graines [21].

P. amygdalus appartient à la famille des Rosaceae. Sur la base de leur goût, deux variétés principales ont été identifiées : l'amande amère (*P. amygdalus var. amara*) et l'amande douce (*P. amygdalus var. dulcis*) [22]. L'amande amère est le fruit de *P. amygdalus var. amara*, qui contient des quantités importantes d'amygdaline dans les graines [23-24]. Les amandes amères et l'huile pressée à froid qui en dérive a une odeur distincte due à la présence de l'amygdaline.

Malgré son effet toxique, de nombreuses activités pharmacologiques ont été attribuées à cette molécule [25].

Des études réalisées sur *P.amygdalus var.amara* ont révélé plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques telles que : antioxydante, cardioprotectrice, hypoglycémiante , anti-inflammatoire, anticancéreuse, et autres [26,27].

L'Algérie grâce à sa grande superficie, sa biodiversité et son climat méditerranéen constitue un milieu favorable à la culture des arbres fruitiers comme l'amandier [28].

Afin de bien situer le contexte dans lequel ce travail de recherche est réalisé, nous nous sommes assignés comme objectifs d'analyser en premier lieu les paramètres physicochimiques de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* pressée à froid , puis d'identifier la composition chimique de ses différentes molécules bioactives notamment les acides gras, les tocophérols ,les composés phénoliques et les flavonoïdes et en second lieu, d'évaluer ses activités biologiques et pharmacologiques par différentes approches méthodologiques *in vitro* et *in vivo*.

Le manuscrit est scindé en trois parties essentielles :

- Dans la première partie, nous présentons un rappel bibliographique sur les connaissances botaniques, phytochimiques et les effets thérapeutiques de l'amandier et l'huile des graines d'amande amère (*P.amygdalus var.amara*)
Un aperçu général sur les activités biologiques et pharmacologiques testées pour cette plante sera également donné.
- La deuxième partie est consacrée à la méthodologie appliquée dans cette étude, elle débutera par une extraction de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* par pression à froid, le contrôle de sa qualité nutritionnelle et organoleptique par analyse des paramètres physicochimiques, puis l'identification de sa composition chimique par CG-MS et HPLC.

Une présentation détaillée de différents protocoles pour l'évaluation des activités biologiques et pharmacologiques de l'amande amère, à savoir (activités antimicrobienne, antioxydante, inhibitrices des enzymes α -glucosidase, α -amylase et AChE , anti-inflammatoires et photoprotectrice).

- L'interprétation et discussion des résultats obtenus seront détaillées dans la troisième partie.

En fin le présent manuscrit sera clôturé par une conclusion générale et quelques perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Amandier et huile d'amande amère

1.1.1 Historique

L'amandier est originaire des plateaux et des montagnes de l'Asie centrale et occidentale (Afghanistan et Iran) [29]. Il est cultivé depuis 5000 ou 6000 ans en Iran. Il passa ensuite en Asie Mineure, puis en Grèce (vers le VI-Ve siècle av. J.-C.). Il a été introduit en Égypte par les Hébreux et ramené en Europe par les Grecs. Les Romains rapportèrent l'amande et lui donnèrent le nom de « noix grecque » [30]. Les Arabes la propagèrent sur le pourtour méditerranéen depuis le VIIe siècle [29]. Au milieu du XIXe siècle, l'amandier est implanté aux États-Unis, qui est devenu le premier producteur mondial d'amandes [31].

1.1.2. Classification et systématique

Le genre *Prunus* appartient à la famille des *Rosaceae*, sous-famille des *Amygdaloideae* [32]. Il comprend environ 430 espèces d'arbres et d'arbustes à feuilles caduques ou à feuilles persistantes [33].

Le genre *Prunus* est divisé en six sous-genres [33] :

- Amygdalus* (amandes et pêches)
- Prunus* (prunes et abricots)
- *Cerasus* (cerises)
- *Lithocerasus* (cerise des sables)
- Padus* (*Prunus padus* , cerise d'oiseau)
- *Laurocerasus* (*Prunus laurocerasus*, cerise laurier)

La classification de *P.amygdalus var. amara*, selon **APGI IV [34]**, est présentée dans le **tableau1.1** :

Tableau 1.1. Taxonomie de l'amandier amer (*Prunus amygdalus var.amara*) [34]

Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Rosaceae</i>
Sous famille	<i>Amygdaloideae</i>
Genre	<i>Prunus</i>
Espèce	<i>amygdalus var. amara</i>

1.1.3. Description botanique de l'amandier

L'amandier est un arbre oléagineux de taille petite à moyenne pouvant atteindre 10 mètres de hauteur selon les conditions écologiques (**Figure 1.1**) [29].

Son écorce est noirâtre, fissurée, et elle devient écailleuse chez les arbres âgées.

Ses feuilles sont caduques, alternes, étroites, lancéolées de 12 cm de longueur, soutenues par un court pétiole, au bord finement dentelé. Leurs couleur est verte intense à la face supérieure et grisâtre à la face inférieure. (**Figure 1.2.a**) [35]

C'est l'un des premiers arbres à fleurir avant l'apparition des feuilles dès le mois de février.

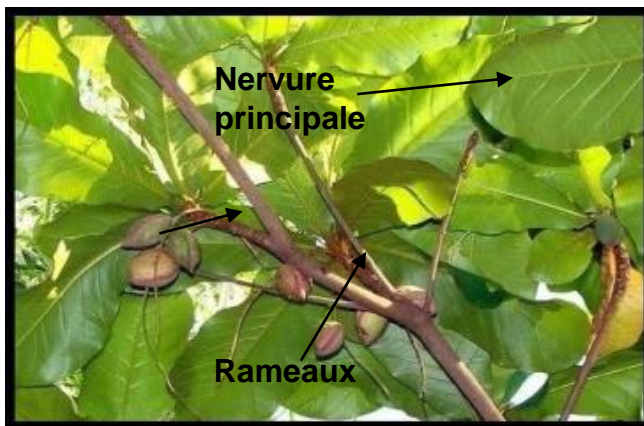


Figure 1.1. Aspect général de l'arbre d'amandier [36]

Les arbres sont d'une beauté saisissante lorsqu'ils sont en fleurs ; ils produisent des fleurs parfumées, à cinq pétales, rose clair à blanches de la fin janvier au début d'avril (**Figure 1.2b**) [29]. Les fleurs sont auto-incompatibles et nécessitent donc des insectes pollinisateurs, pour faciliter la pollinisation croisée avec d'autres cultivars. Les fleurs sont formées en été et s'épanouissent très tôt au printemps suivant, ce qui rend l'amandier très sensible aux gelées printanières. L'amandier porte un nombre de fleurs considérable, mais seulement 30% d'entre elles donneront des fruits [29].

Le fruit est une drupe ovale, verte et veloutée dont la partie charnue n'est pas comestible. Elle entoure une coque ligneuse et criblée de trous, contenant une, parfois deux graines, enveloppées d'un fin tégument couleur cannelle (**Figure 1.2c**) [35].

L'amandier est très résistant à la chaleur et à l'aridité, il peut supporter des températures allant jusqu'à 50°C grâce à son système racinaire puissant, pivotant, et peu ramifié ancré dans le sol pour sa suffisance hydrique [36].



a. Feuilles et rameaux



b. Fleur de couleur blanche rosée



c. Coque ligneuse criblée de trous



d. Les graines de *P.amygdalus var.amara*

Figure.1.2. Les différentes parties de l'amandier amer a. Feuilles et rameaux, b. Fleur de couleur blanche rosée, c. Coque ligneuse criblée de trous, d. les graines de *P.amygdalus var.amara* [37].

1.1.4. Exigences agro-écologiques de l'amandier

L'amandier est un arbre relativement rustique qui peut se développer sous des climats assez variés. Cette espèce est très résistante au froid, elle nécessite de basses températures hivernales pour la levée de la dormance (200 à 400 heures en dessous de 7,2 °C). L'amandier est exigeant en lumière et en chaleur pendant la phase de croissance du fruit. [36].

Il donne les meilleurs rendements dans des sols profonds, fertiles, bien drainés, et exempt de sels nocifs. Cependant, avec l'utilisation des systèmes d'irrigation de bas volume un verger d'amandier peut bien produire dans les sols peu profonds [38]. Il pousse jusqu'à 2450 m d'altitude mais avec un optimum de croissance à 750 m. Les besoins en eau de l'amandier sont de 800 à 850 mm/an. Les apports hydriques sont recommandés durant la période de Mai, Juin, Juillet, pendant laquelle les besoins en eau sont maximum [39].

L'amandier est tolérant au calcaire actif. C'est une espèce résistante à la chlorose grâce à sa grande capacité d'extraire le fer [40].

1.1.5. Aire de répartition géographique de l'amandier

La culture de l'espèce *P. amygdalus var.amara* est plus courante dans les régions tempérées du monde entier (englobant une grande partie de l'Europe, de l'Afrique du nord, Proche et Extrême-Orient, Australie-Méridionale, Nouvelle-Zélande, et les zones tempérées du continent Américain) [41].

En Algérie, l'amandier occupe une superficie totale de 50.000 hectares, soient 20,5% de la superficie totale des Rosacées à noyau [42]. Il est surtout cultivé pour son fruit, qui est utilisé pour l'extraction d'une huile utilisée en cosmétologie et dans la confiserie. Les principales zones de culture de l'amandier en Algérie sont Médéa, Ain Défla, Sétif, Sidi-Bel Abbès et Tlemcen. [42]

1.1.6. Culture de l'amandier

Généralement, l'amandier se cultive en haute tige, sa plantation peut s'effectuer durant la période de repos végétatif entre les mois de novembre et décembre où le sol devrait être drainé, mais ressuyé au moment de la plantation [40].

La récolte des amandes fraîches se fait manuellement entre les mois de mai et juin, alors que celle des amandes sèches a lieu en septembre et octobre, lorsque l'écaille est bien ouverte et sèche [37].

1.1.7. Les variétés de l'amandier

Il existe deux variétés de l'amandier :

- L'amandier doux (*Prunus amygdalus var. dulcis*) correspond en fait à la variété cultivée : ses fruits sont parfaitement comestibles.
- A l'inverse, l'amandier amer (*Prunus amygdalus var. amara*) dériverait de certaines populations de la variété cultivée revenues à l'état sauvage [43,44].

Les amandes amères se différencient de celles dites douces par leur teneur en amygdaline, responsable de leur amertume ; la concentration de cette substance dans les graines est significative et peut atteindre en moyenne 9 % [45].

L'amygdaline est un diglucoside qui, par hydrolyse enzymatique, se transforme en benzaldéhyde (responsable du goût et de l'odeur caractéristiques des graines et de l'huile d'amande), en glucose et en acide cyanhydrique [45].

La graine d'amande amère est légèrement plus large et plus courte comparée à celle de l'amande douce. Elle contient environ 50% de l'huile végétale. Les amandes amères donnent 4 à 9 mg de cyanure d'hydrogène par amande [46].

1.1.8. Extraction de l'huile d'amande amère

Le processus d'extraction de l'HAA est très similaire aux procédés d'extraction d'autres huiles à graines. Avant l'extraction de l'huile d'amande amère, les graines doivent être enlevées du péricarpe [47]. Ensuite, une étape de séchage est réalisée par exposition

au soleil, ou à l'air chaud, ou par micro-ondes. Le prétraitement des amandes est une opération importante pour assurer une bonne qualité de l'huile [48,49].

Cette étape est nécessaire aussi pour réduire l'humidité contenue, et pour minimiser l'activité microbologique et la détérioration des composés chimiques [50, 51].

Pour l'extraction de l'HAA, différentes techniques ont été utilisées telles que le pressage mécanique à froid, l'extraction par des fluides supercritiques (CO₂), et l'extraction par solvant [52-54].

Ces méthodes d'extraction ont des effets variables sur les propriétés physico-chimiques et bioactives de l'HAA.

1.1.8.1. Extraction par pression

L'HAA est extraite par deux types de presses, la presse hydraulique et la presse à vis, qui sont considérées comme des méthodes d'extraction à froid permettant d'obtenir les meilleures caractéristiques sensorielles des amandes [55].

Les systèmes de pressage impliquent de très faibles coûts d'exploitation et sont relativement exempts de substances polluantes ou dangereuses par rapport à la méthode d'extraction par solvant [55].

Bien que le pressage hydraulique soit utilisé à petite échelle avec un meilleur maintien des propriétés physico-chimiques et sensorielles de l'HAA, la presse à vis est une méthode durable de production à l'échelle industrielle avec certains avantages par rapport à la presse hydraulique notamment un rendement en huile plus élevé, le temps de production réduit, le coût et la possibilité de processus continu ou semi-continu [56].

1.1.8.2. Extraction par solvant

L'extraction par solvant est la méthode la plus ancienne, couramment utilisée à échelle industrielle pour des raisons économiques et pratiques. Elle est basée sur la capacité du solvant à dissoudre l'huile et à l'extraire de la graine complète. Les solvants les plus utilisés pour l'extraction de l'HAA sont l'hexane, l'éther de pétrole, l'éther diéthylique, le chloroforme et le méthanol, étant le solvant préféré néanmoins un processus de raffinage est obligatoire [57].

Il convient de noter que les odeurs et les goûts désagréables de l'huile obtenue et la toxicité chimique liée aux solvants organiques peuvent affecter les composés nutritionnels

de l'HAA et entraîner d'importants problèmes de santé, la rendant impropre à la consommation humaine, à moins qu'elle ne soit soumise à un processus de raffinage [58].

1.1.8.3. Extraction par fluide CO₂ supercritique

En raison des restrictions proposées pour réduire l'utilisation des solvants organiques dans les procédés industriels, d'autres techniques ont été proposées telles que l'extraction par fluide supercritique à base du dioxyde de carbone (CO₂). Ces techniques ont été développées comme une alternative prometteuse aux méthodes conventionnelles pour la récupération des huiles végétales [59,60]. L'extraction de l'HAA par carbone supercritique (le dioxyde de carbone) a permis d'obtenir une augmentation dans le contenu en tocophérols et dans le rendement en huile [53]. Cependant, aucune différence n'a été observée dans la composition en acides gras.

L'extraction par CO₂ supercritique est considérée comme une méthode sûre, liée à l'amélioration de la cinétique, de la qualité de l'extrait et la durabilité environnementale. Cependant, le coût élevé associé à l'investissement dans les infrastructures et à l'extraction limite son utilisation industrielle [61-63].

1.1.9. Composition chimique de l'huile d'amande amère

Les lipides sont les principaux composants nutritionnels de l'HAA, il s'agit principalement des acides gras de C₁₄ à C₂₀, qui regroupent les AGS, AGMI, et AGPI et composés solubles dans l'huile tels que : les phytostérols et les tocophérols [64].

Dans l'amande amère, ces lipides sont assemblés en corps d'huile délimité par une monocouche de phospholipides dans laquelle les oléosines, protéines intégrales, sont incorporées [65].

La variabilité de la teneur en huile, acides gras, triacylglycérols, tocophérols, et en stérols dépendent principalement du génotype de l'amande. Mais peuvent être également affectés par les conditions environnementales prévalant pendant la saison de croissance, l'emplacement, le climat, le moment de la récolte, et le degré de la maturité des amandes [66-68].

La variabilité de la teneur en huile d'amande extraite de plusieurs génotypes provenant de régions différentes est consignée dans le **tableau 1.2**. Le tableau comparatif montre en effet une grande variabilité de la teneur en huile d'amande en fonction de la région et du cultivar. Cette variabilité peut être expliquée par la variation du génotype, de la géographie et de l'environnement [69, 66,70].

Tableau 1.2. Teneur en huile des échantillons d'amandes amères (%) en fonction de leur origine

Teneur en huile (%)	Génotype	Origine	Références
49.70 - 58.30	7	Australie	[71]
47.80 to 66.10	20	Afghanistan	[72]
53.70-59.30	8	Egypte	Nassar et al., 1977
48.19 - 56.28	10	Espagne	Rabadan et al., 2017
39.6 - 62.9	18	Iran	[69]
51.40-66.31	23	Maroc	[73]
53.61 - 57.42	6	Tunisie	[74]
43.10 - 79.00	31	Turquie	[75]
49.10 - 66.38	8	Etats unis	[76]
48-57.5	09	Argentin	[77]

1.1.9.1. Composition en acides gras

Bien que les huiles contiennent généralement le même profil de 10 à 20 acides gras, la composition varie considérablement entre les différentes espèces végétales [78]. Le profil des acides gras et la présence des acides gras non spécifiques communs pourraient être utilisés comme marqueur de différenciation d'une famille végétale particulière [79]. L'HAA est une huile insaturée contenant de l'acide oléique (C18 : ω 1n-9) comme acide gras

majoritaire, suivi par l'acide linoléique (C18 : 2), acide palmitique (C16 : 0), acide palmitoléique (C16 : 1) et acide stéarique (C18 : 0) [79] (Tableau 1.3).

Ces acides gras apparaissent par ordre décroissant et constituent 95% du total, cette fraction est complétée à 100% par huit autres acides gras de moindre importance [80, 81,82]. Les acides gras insaturés représentent environ 90% de la teneur totale en acides gras. Les acides gras mono insaturés représentent la proportion la plus élevée par rapport aux polyinsaturés [80, 82].

La variation de la composition en acides gras est due à la période de récolte et aussi au poids du noyau [83].

Tableau 1.3 : Composition en acides gras (%) de l'huile d'amande amère [83].

Acide palmitique C16 : 0	5.2 - 6.7
Acide palmitoléique C16 :1	0.3 - 0.6
Acide stéarique C18 : 0	0.2 - 1.7
Acide oléique C18 : 1	57.5 - 78.7
Acide linoléique C18 : 2	12- 33.9

1.1.9.2. Les triglycérides

Les triglycérides sont constitués d'un squelette de glycérol estérifié avec des acides gras saturés ou insaturés, ou un mélange des deux. Pour l'HAA, peu de données sont disponibles sur la composition en triglycérides. Dans les amandes amères mûres, les acides gras sont majoritairement sous la forme estérifiée dans les triglycérides, environ 98% [84], ce qui donne un faible indice d'acidité [80]. Des différences dans la composition et la concentration des triglycérides ont été trouvées entre les huiles d'amande de différents cultivars et régions [85, 86,87].

Il y a une nette prédominance du trioléine (OOO) comme composant majeur des triglycérides des huiles d'amande amère, allant de 23,97 % à 55 % ,du fait que l'acide oléique est l'acide gras le plus abondant, les triglycérides contenant cet acide gras sont également les plus fréquents [88,86]. OLO est le deuxième composant majeur des triglycérides avec un pourcentage allant de 16,40% à 28,13, suivi par l'OLL avec une fourchette de 6,33 % à 19,65 % [89,86]. Il a été constaté que la POO variait de 5,00 % à

12,96 % et la LOP se situait entre 2,8 % et 10,95 % [88,89]. Les autres triglycérides ont été trouvés en petites quantités.

1.1.9.3. Les tocophérols et tocotriénols

Les huiles végétales sont les principales sources de la vitamine E, qui comprend huit isoformes liposolubles quatre tocophérols (α -, β -, γ -, et δ -tocophérol), et quatre tocotriénols (α -, β -, γ -, et δ -tocotriénols) qui agissent comme des piègeurs des radicaux libres dans les membranes et les lipoprotéines [90]. Les tocophérols jouent un rôle important en tant que paramètre de qualité dans l'amande en protégeant l'huile contre l'oxydation. La période clé dans l'accumulation de tocophérols d'amande a été signalée entre 74 et 95 jours après l'anthèse [64].

Plusieurs études ont porté sur la teneur en tocophérol dans certains génotypes d'amandes et elle s'est avéré être fortement influencé par le génotype [91,92]. La sécheresse et la chaleur se sont avérées être les facteurs de stress les plus importants affectant le contenu en tocophérols [66].

1.1.9.4. Les phytostérols

Les phytostérols (appelés aussi stérols végétaux ou esters de stanol) sont un groupe de composés bioactifs présents dans les membranes cellulaires des plantes, structurellement et fonctionnellement analogues au cholestérol. Ils réduisent le taux plasmatique de cholestérol, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et diminuent aussi le risque de maladies cardiovasculaires [93]. Comparé à beaucoup d'autres graines, l'HAA est plus riche en phytostérols [94, 95, 96,84]. Le β - sitostérol est identifié comme le principal phytostérol suivi par Δ 5-aviculteurrol ; cependant, campestérol, Δ 5, 24-stigmastadiénol, Δ 7-aviculteurrol, stigmastérol, A7- stigmastérol, Δ 7-campestérol, clérostérol et le cholestérol ont été détectés en quantités mineures [97,73 ,75].

1.1.10. Conservation de l'huile d'amande

Maintenir la qualité de l'HAA pendant une longue période de stockage est très difficile. La forte concentration en acides gras insaturés dans les lipides d'amande rend les amandes plus sensibles aux changements détérioratifs, tels que l'oxydation des lipides et la production d'arômes indésirables associés au rancissement [98,99]. La qualité des amandes stockées dépend principalement du noyau, de l'humidité, la teneur en matières grasses, la température de stockage, l'humidité relative(HR), le niveau d'oxygène, le type

d'emballage, la forme de stockage (en coque ou décortiquée, pelée, rôtie, etc.), l'indice de peroxyde, les conditions d'éclairage et la variété d'amande [100-102].

1.11. Usages traditionnels de l'huile d'amande amère

Les usages traditionnels de l'HAA sont multiples, en particulier :

- pour traiter les brûlures et les plaies et pour protéger l'estomac [103].
- La pommade aux amandes amères ainsi que son huile essentielle sont utilisées pour traiter l'acné, les douleurs articulaires, la chute de cheveux, faciliter l'accouchement, et pour renforcer et conditionner les cheveux [104].
- Utilisée comme un ingrédient cosmétique, elle adoucit et tonifie la peau en cas d'inflammation cutanée [27].
- Elle est aussi utilisée comme un laxatif par les éleveurs et comme purgatif pour le bétail [27].
- Utilisée comme un remède pour traiter les hémorroïdes [104].
- L'arôme d'amande amère est très utilisé en pâtisserie, dans de nombreuses préparations [22].

1.1.12. Effets thérapeutiques de l'huile d'amande amère

Les effets thérapeutiques de l'HAA ont été cités dans certaines études précliniques, menées sur des lignées cellulaires et des modèles animaux, ainsi que des essais cliniques :

- Prévention des maladies cardiovasculaires [105,106].
- Contrôle de la glycémie [107].
- Effet neuropharmacologique [108,109].
- Capacité antioxydante [110, 105].
- Effets dermatologiques sur la peau et les cheveux [111-113].
- Prévention contre plusieurs types de cancer [114-116].

- Effets antibactérien, antifongique, sédatif, anesthésique, diurétique, et antispasmodique [27].

1.1.13. Toxicité de l'huile d'amande amère

Les composés de glycosides cyanogènes se trouvent dans les noyaux de nombreuses plantes et peut produire du HCN hautement toxique lorsqu'il est dégradé par des enzymes végétales [117]. La variété d'amande amère produit des fruits avec des noyaux contenant de grandes quantités d'amygdaline [45]. Les niveaux de HCN dans les amandes amères sont environ 40 fois plus élevés que les niveaux trouvés dans les amandes douces [23].

Le HCN est libéré par l'amygdaline pendant la distillation de l'huile essentielle d'amande amère [118]. Il est extrêmement volatile, causant l'odeur caractéristique des amandes amères [119]. L'empoisonnement au cyanure est rapidement mortel s'il n'est pas traité rapidement [27]. Quelques cas d'empoisonnement par ingestion ou inhalation d'huile essentielle d'amande amère ont été rapportés [120,22 ,27]:

Différents traitements ont été proposés pour réduire la teneur en cyanure de l'HAA telle que la cuisson, les micro-ondes, l'eau bouillante, la solution de bicarbonate de sodium et le traitement par ultrasons [24,46].

Malgré son effet toxique, l'amygdaline peut avoir un impact bénéfique sur la santé humaine, elle possède plusieurs propriétés, telles que : anti-tumoral, anti-fibrotique, anti-inflammatoire, analgésique, immunomodulateur, anti-athérosclérose, hypoglycémiant, améliorant les systèmes reproducteurs, réduisant la neurodégénérescence et l'hypertrophie du myocarde [25].

Par ailleurs, **PAVLOVIC *et al.* [121]** ont trouvé une très faible concentration d'amygdaline dans l'huile de noyau d'abricot pressée à froid (0,4 mg/g d'huile), tandis que la teneur totale en amygdaline dans les noyaux d'abricot était de 5,0 mg/g.

Cependant, d'autres études n'ont trouvé aucune trace d'amygdaline dans les huiles pressées à froid de noyaux de pêche, de prune et d'abricot. Par ailleurs, leurs noyaux avaient une teneur en amygdaline comprise entre 3 et 24 mg/kg, ce qui suggère leurs applications en industrie alimentaire car elles sont exemptes d'amygdaline [41].

1.2. Généralités sur les activités biologiques étudiées

1.2.1. Introduction

Les acides gras, les tocophérols, les tocotriénols, les composés phénoliques ainsi que les stérols, sont des composés bioactifs importants des graines oléagineuses, responsables de leurs effets thérapeutiques source précieuse de médicaments à base de plantes [122]. Ainsi, les huiles végétales sont utiles aussi bien en médecine traditionnelle qu'en médecine moderne [27].

1.2.2. Activités biologiques et pharmacologiques de l'amande amère

Plusieurs méthodes existent pour étudier les activités biologiques des plantes médicinales, entre autre l'amande amère [7, 23,123].

1.2.2.1. Activité antimicrobienne

Au cours des 20 dernières années, la croissance alarmante du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques et les difficultés de traitement des infections ont initié la recherche de nouveaux composés antibactériens et le développement de nouvelles stratégies alternatives de lutte contre les infections bactériennes. Les plantes médicinales, avec leur longue histoire d'utilisation en médecine populaire pour le traitement des maladies infectieuses, sont devenues une nouvelle source prometteuse d'agents antibactériens [124].

Les composés naturels antimicrobiens comprennent des métabolites secondaires isolés de plantes, de bactéries, de champignons, d'organismes marins et d'algues. Ces composés sont classés en fonction de leur type chimique comme terpènes (sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes), stéroïdes (stérols), alcaloïdes (indole, quinoléine, pyridoacridone et alcaloïdes aminés), aromatiques (flavonoïdes, coumarines, lignanes, xanthones, anthracènes, anthraquinones, naphthalène), polykétides (acides gras acétyléniques, esters polycycliques et quinones) et peptides [125].

Les chercheurs s'intéressent aux huiles végétales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les tocophérols, les acides gras, les polyphénols, les caroténoïdes, les phytostérols ...etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes [125].

1.2.2.1.1. Mécanismes d'action des composés antibactériens d'origine végétale

L'efficacité antibactérienne des composés végétaux dépend de plusieurs facteurs : les caractéristiques du microorganisme cible (le type, le genre, l'espèce, la souche), les caractéristiques du matériel végétal (origine botanique, composés bioactifs ainsi que le temps de récolte, stade de développement ou le mode d'extraction) et propriétés chimiques (l'hydrophilie, la lipophilie, la concentration, la valeur du pH).

Il est largement admis que les extraits de plantes, en raison de leur nature complexe, possèdent de multiples mécanismes d'action. Ces extraits de plantes et leurs principaux composants peuvent présenter une activité soit en inhibant la croissance ou la viabilité bactérienne, soit en ciblant les facteurs de virulence bactérienne ou bien en potentialisant l'efficacité des antibiotiques en tant qu'agents modifiant la résistance [126-128].

1.2.2.2 .Activité antioxydante

1.2.2.2.1. Le stress oxydatif : est un processus complexe qui se caractérise par un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité de l'organisme à éliminer les espèces réactives grâce à l'utilisation d'antioxydants endogènes et exogènes [129].

Au cours des processus métaboliques, une grande variété de réactions ont lieu, où les promoteurs sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) [130].

Un système biologique en présence d'un excès de ROS peut présenter différentes pathologies, Parmi lesquelles figurent le cancer, l'artériosclérose, l'infarctus du myocarde, le diabète, les maladies inflammatoires, les troubles du système nerveux central, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement cellulaire [131].

1.2.2.2.2. Antioxydants

Un antioxydant est une substance qui, à faible concentration, agit en retardant, empêchant, prévenant ou réduisant considérablement les dommages de l'oxydation des substrats facilement oxydables. Elle permet aussi de maintenir des concentrations non

cytotoxiques d'ERO dans la cellule [132]. Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine [132].

1.2.2.2.3. Mécanisme d'action des antioxydants

Les systèmes biologiques ont des mécanismes antioxydants pour contrôler les dommages de nature enzymatique et non enzymatique qui permettent d'inactiver les ROS. Les antioxydants endogènes sont des enzymes, telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase, ou des composés non enzymatiques, tels que la bilirubine et l'albumine [132].

Lorsqu'un organisme est exposé à une concentration élevée de ROS, le système antioxydant endogène est compromis et, par conséquent, il ne garantit pas une protection complète de l'organisme. Pour compenser ce déficit en antioxydants, l'organisme peut utiliser des antioxydants exogènes apportés par l'alimentation, comme les vitamines E (α -tocophérol) et vitamines C (acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...et autres) [133].

1.2.2.2.4. Méthode d'évaluation de l'activité anti-oxydante

L'évaluation de la capacité anti-oxydante des molécules peut être effectuée soit par des méthodes *in vivo*, soit *in vitro*. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas une seule méthode qui permettrait de déterminer le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut la combinaison de plusieurs tests complémentaires [134].

Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes selon le mécanisme d'action par un transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'un simple électron [135].

Les techniques basées sur un transfert d'atome d'hydrogène sont utilisées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation [136].

Les méthodes basées sur le transfert d'un électron sont celles qui interviennent dans la mesure de la capacité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle ($-\text{OH}$), des anions superoxyde (O_2°), du peroxyde (ROO°) et de l'oxyde nitrique (NO°) [135].

Ces techniques varient les unes des autres par les réactifs utilisés, les conditions d'application, leurs protocoles, le mécanisme d'action des molécules biologiques et la forme d'expression des résultats [136].

1.2.2.3. Activité antidiabétique *in vitro*

1.2.2.3.1. Définition du diabète : le diabète sucré est une maladie chronique qui affecte le métabolisme normal des glucides, des lipides et des protéines, provoquant de nombreux changements dans le système biochimique de l'organisme qui contribuent à l'hyperglycémie, principale caractéristique de la maladie [138]. On estime que le nombre total de personnes diabétiques passera à plus de 366 millions de cas en 2030 [139].

Le diabète comprend un groupe de maladies métaboliques caractérisé par l'hyperglycémie, dans lesquelles la glycémie est élevée soit parce que le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que les cellules ne répondent pas à l'insuline produite [140].

Le diabète s'accompagne de plusieurs complications telles que des douleurs thoraciques, des crises cardiaques, des accidents vasculaires cérébraux, des problèmes cardiovasculaires (maladie coronarienne), l'athérosclérose et la neuropathie [141].

1.2.2.3.2. Rôle de l' α -glucosidase et l' α -amylase

C'est une approche thérapeutique de traitement du diabète qui consiste à diminuer l'hyperglycémie postprandiale entraînant l'inhibition des enzymes hydrolysant les glucides comme l' α -amylase et l' α -glucosidase [142]. L' α -amylase est impliquée dans la dégradation des glucides à longue chaîne alors que l' α -glucosidase décompose l'amidon et les disaccharides en glucose (**Figure 1.3**).

Elles sont considérées comme les principales enzymes digestives aidant à l'absorption intestinale. Les inhibiteurs de ces deux enzymes sont des cibles potentielles dans le développement de composés pour le traitement du diabète [142]. Les inhibiteurs d'enzymes synthétiques actuellement utilisés provoquent des effets secondaires gastro-intestinaux tels que diarrhée, flatulences, ballonnements abdominaux, et autres [143].

Par conséquent, les inhibiteurs naturels de l' α -amylase et de l' α -glucosidase provenant des plantes alimentaires peuvent être utilisés comme thérapie efficace pour

traiter l'hyperglycémie post-prandiale avec des effets secondaires minimales. Les plantes, les animaux et les micro-organismes produisent différents inhibiteurs protéiques des α -amylases et des α -glucosidases afin de réguler l'activité de ces enzymes [144].

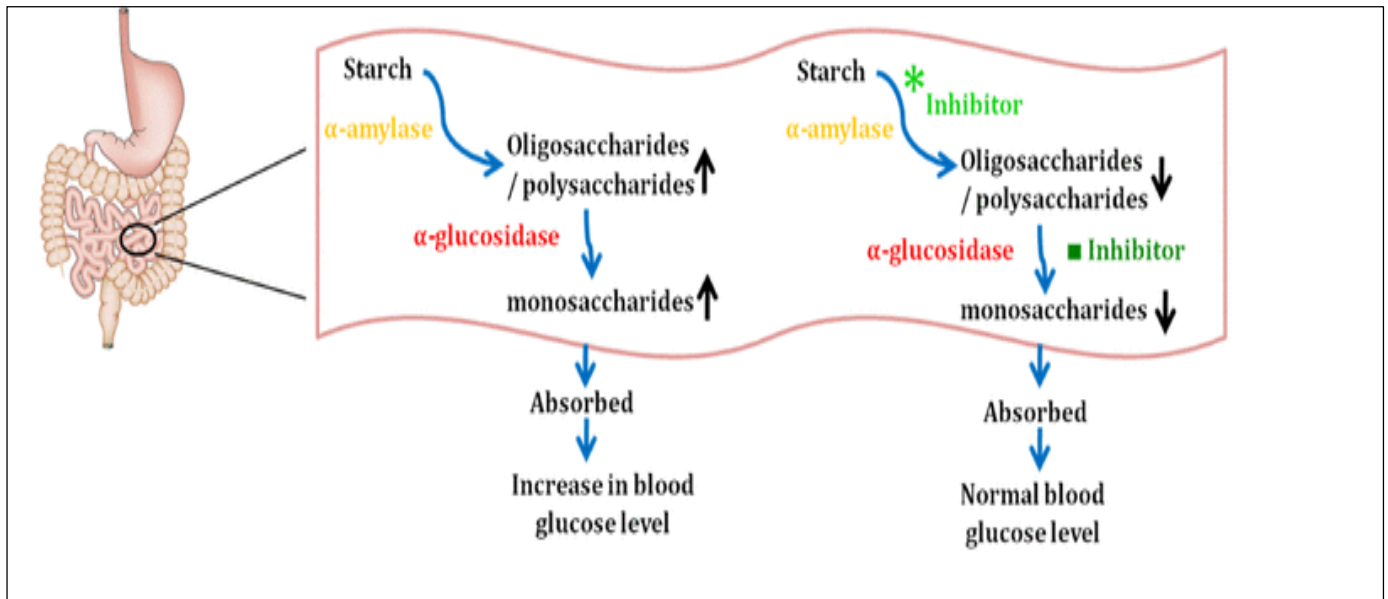


Figure 1.3. Rôle de l' α -amylase et l' α -glucosidase dans la digestion et le métabolisme de l'amidon [145].

1.2.2.3.3. Mesure de l'activité anti- α glucosidase et α -amylase

Il existe plusieurs méthodes *in vitro* et *in vivo* pour mesurer l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase et α -amylase, basées sur techniques colorimétriques [146]. Lorsque l'enzyme α -glucosidase est active, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (son substrat) est hydrolysé en libérant des unités de glucose. D'autre part, l'activation de l'enzyme α -amylase est effectuée en présence de son substrat (l'amidon), qui est hydrolysé en libérant des unités de maltose et de glucose [147].

Ces méthodes, quantifient l'inhibition sous forme de CI_{50} (concentration inhibant l'activité enzymatique de moitié) et permettent également d'étudier les paramètres cinétiques et par conséquent le type d'inhibition.

1.2.2.4 Activité anti-cholinestérasique (anti-Alzheimer)

1.2.2.4.1. Définition de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) ou la démence sénile du type Alzheimer (DSTA) est un trouble cérébral décrit en 1906 par Alzheimer, un médecin allemand [148]. Il s'agit d'une maladie multifactorielle progressive, neurodégénérative et irréversible, provoquée par la perte de neurones et de synapses dans le cortex cérébral et certaines régions sous-corticales, qui survient principalement chez les personnes dont l'âge est supérieur à 65 ans [148, 149, 150].

Sur le plan histopathologique, il se caractérise par une accumulation de peptide bêta-amyloïde (β A), qui peut initier une cascade d'événements oxydatifs et une inflammation chronique conduisant à la mort neuronale [151]. Diverses voies sont impliquées dans la progression et le développement de la maladie, telles que la formation de plaque, la cascade inflammatoire, le déficit cholinergique, le stress oxydatif et bien d'autres. La véritable origine de cette maladie n'est pas encore bien connue, mais les problèmes sont liés à des protéines cérébrales qui fonctionnent anormalement et provoquent des dysfonctionnements. En conséquence, les neurones endommagés ne parviennent pas à se connecter à d'autres neurones et meurent [152].

1.2.2.4.2. Role de l'AChE dans la maladie d'Alzheimer

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme présente dans le tissu neuronal, elle permet la régulation de l'influx nerveux en dégradant l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission. AChE est libérée dans la fente de la pop synaptique en vue d'une éventuelle nouvelle transmission, permettant ainsi le passage des informations [153].

L'importance de l'acétylcholine (ACh) dans le processus d'apprentissage et la mémoire est connue depuis les années 70. Des études ont montré une réduction de la choline acétyltransférase (enzyme qui synthétise l'ACh) dans le cortex et l'hippocampe ainsi, moins de neurones cholinergiques seront présents sur le noyau basal de Meynert chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer [154,155]. Il a été démontré que les substances qui inhibent l'acétylcholinestérase (l'enzyme qui dégrade l'ACh) affectent positivement les performances d'apprentissage en raison de l'activation indirecte du système cholinergique [154].

1.2.2.4.3 Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les cholinestérases (ChEs) sont une famille des enzymes qui partagent une homologie étendue de séquence (65%). Les ChEs chez les vertébrés ont été classées selon deux types, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Elles ont été classées sur la base des spécificités de substrat et de l'inhibiteur qui sont de sensibilités différentes [156].

L'AChE est un élément clé des synapses cholinergiques du cerveau et des jonctions neuromusculaires. L'une des solutions pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste à diminuer sa dégradation, conduisant à l'inhibition de l'action de l'acétylcholinestérase [157].

Suite à cette hypothèse sont apparus sur le marché les inhibiteurs de l'AChE [158]. De nombreux composés tels que le donépézil, la galantamine, la rivastigmine, la tacrine, et la mémantine ont été développés comme inhibiteurs de la AChE utilisés dans le traitement de la MA [158]. Cependant, l'efficacité de ces composés reste limitée en raison de leurs divers effets secondaires [159].

De nombreuses molécules d'origine végétale comme les acides gras, les polyphénols et les tocophérols se sont révélées efficaces dans l'inhibition de l'activité de l'AChE lors de tests *in vitro*, cependant peu d'entre elles ont fait l'objet d'études expérimentales [159].

1.2.2.4.4. Mesure de l'activité anticholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est un inhibiteur enzymatique associé à la MA, est largement détectée par le test d'Ellman. Cette méthode standard est utilisée pour détecter et quantifier une inhibition de l'AChE utilise un analogue de substrat naturel de l'AChE, l'acétylthiocholine (ATC), hydrolysée en acétate et thiocholine [160].

Cette réaction produit de la thiocholine qui réagit alors avec le 5,5'dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde maximale de 414 nm. L'activité de l'enzyme peut être déterminée à partir de la variation de cette absorbance [160].

1.2.2.5. Activités anti-inflammatoires

1.2.2.5.1. Définition de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense immunologique contre les blessures, les brûlures, les allergies ou les infections microbiennes. Elle joue un rôle important dans la physiopathologie de diverses maladies, notamment le diabète, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et le cancer [161].

L'inflammation est un phénomène complexe qui implique l'interaction de plusieurs réactions, principalement l'activation des enzymes et la libération de divers médiateurs chimiques, la migration cellulaire, la libération de fluides, ainsi que les lésions et la réparation des tissus [161].

Les symptômes classiques de l'inflammation comprennent la rougeur, l'enflure, la douleur et la fièvre. Ces symptômes sont le résultat de divers médiateurs inflammatoires et agents chimiques tels que les prostaglandines (PG), l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les leucotriènes et l'oxyde nitrique, qui sont produits localement ou s'infiltrent dans la zone enflammée [162].

1.2.2.5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : Ce sont les médicaments les plus largement prescrits pour traiter les troubles inflammatoires. Cette classe comprend des médicaments tels que : le diclofénac, l'indométhacine et l'ibuprofène [162].

Les AINS exercent leur activité pharmacologique *via* la suppression de la biosynthèse des prostaglandines en inhibant l'enzyme cyclooxygénase (COX). Il est bien connu que les effets indésirables gastro-intestinaux, associés à l'utilisation à long terme des AINS sont dus à l'inhibition de la COX-1 tandis que les effets indésirables sur le système cardiovasculaire sont dus à l'inhibition des enzymes COX-2 [163].

Les agents anti-inflammatoires d'origine végétale ont été largement étudiés, ils ont montré des résultats prometteurs contre les troubles inflammatoires en raison de leurs effets indésirables légers [163]. De ce fait, un grand intérêt a été mis sur la recherche de nouvelles molécules issues de plantes médicinales, douées d'activités anti-inflammatoires [21].

1.2.2.5.3. Méthodes d'études de l'activité anti-inflammatoire

Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'effet anti-inflammatoire qu'exercent les plantes médicinales étudiées en *in vivo* ou *in vitro*, telles que : la méthode de l'induction de l'œdème par xylène sur un modèle animal et la méthode de dénaturation protéique par BSA [21].

1.2.2.5.3.1. Dénaturation protéique

La dénaturation des protéines est un processus qui entraîne la perte de la structure tertiaire et de la structure secondaire des protéines en raison de l'intervention du stress ou de composés externes, tels qu'un acide ou une base forte, des sels inorganiques concentrés, des solvants organiques ou la chaleur. Plusieurs protéines biologiques perdent leurs fonctions biologiques, lorsqu'elles sont dénaturées.

La dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien documentées de l'inflammation [21]. Par conséquent, la détermination de la dénaturation des protéines peut être utile comme un test de dépistage pour la détection de composés anti-inflammatoires, sans l'utilisation d'un modèle animal [21].

1.2.2.5.3.2. Œdème topique induit par xylène

La méthode d'œdème de l'oreille de souris induit par le xylène est un test d'actualité simple et largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire des produits naturels. Il montre une réponse inflammatoire contre divers stimuli comme le xylène, le formol, la carraghénine et les LPS [164].

Le xylène peut provoquer une remarquable dilatation des vaisseaux sanguins menant à des changements œdémateux dans la peau. Ceci est adapté pour l'évaluation des médicaments anti-inflammatoires de type stéroïdien et non stéroïdien. L'application de xylène sur la peau entraîne une augmentation des espèces oxydatives et de la fragmentation de l'ADN [164]. Il induit la libération des iNOS et TNF- α dans la peau. Le xylène provoque également une modification histopathologique de la peau notamment, un gonflement, une infiltration de cellules immunitaires et une destruction de la couche cornée de l'oreille [165].

Ce test présente un inconvénient majeur lié à la supposition que les deux oreilles du modèle animal soient de taille égale avant d'induction de l'inflammation [165].

1.2.2.6. Activité photoprotectrice (détermination *in vitro* du facteur de protection solaire « FPS »)

L'utilisation des extraits de plantes et de molécules naturelles dans le domaine de la protection solaire représente une nouvelle tendance dans l'industrie cosmétique. En effet, au cours des dernières années, une augmentation significative de l'utilisation des plantes a été enregistrée compte tenu de l'intérêt croissant du consommateur pour les ingrédients «verts» et «naturels» dans le produit fini.

Un grand nombre d'études parues dans la littérature scientifique démontrent le potentiel photoprotecteur des produits naturels attribué à l'activité de filtrage des UV, la capacité antioxydante et aux effets protecteurs de l'ADN [166]

1.2.2.6.1. Rayonnement ultraviolet

La lumière du soleil est composée d'environ 40 % de lumière visible (VIS), 50 % de lumière infrarouge (IR) et 10 % de lumière ultraviolette (UV). Le rayonnement ultraviolet est la partie la plus importante du spectre électronique. Il peut être divisé en UVC (200–280 nm), UVB (280–315 nm) et UVA (315–400 nm) [166].

Le rayonnement UV (soleil) est essentiel à la santé humaine ; il est nécessaire à la production de la vitamine D₃ dans la peau. Cette dernière est nécessaire à l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Une carence en vitamine D₃ peut entraîner une ostéoporose chez les adultes. Chez les enfants elle peut conduire à un retard de croissance et des malformations du squelette [166].

Cependant, l'exposition excessive aux rayonnements UV peut causer certains effets nocifs pour la santé humaine. L'interaction du rayonnement UV plus particulièrement, UVB est responsable de l'érythème, qui est l'effet négatif le plus connu des rayons. Ces rayonnements ont également un effet cancérigène potentiel, car il peut causer des dommages directs à l'ADN et à l'ARN. Une surexposition à des rayonnements profondément pénétrants, comme les UVA, est responsable d'un vieillissement cutané prématuré, d'une dégradation excessive et d'une inhibition de la synthèse des fibres de collagène [167].

1.2.2.6.2. Facteur de protection solaire (FPS)

Les écrans solaires ont un facteur de protection solaire individuel (FPS). la FDA définit cette valeur, comme étant le rapport de la dose érythémale minimale de la peau protégée par un écran solaire (MEDp) à la dose érythémale minimale de la peau non protégée (MEDu), selon l'équation 1 [167].

FPS = Minimal erythemal dose in sunscreen protected skin (MEDp)/Minimal erythemal dose in unprotected skin (MEDu).

Plus la valeur du FPS est élevée, plus le produit est efficace pour prévenir les coups de soleil. Néanmoins, il est nécessaire de standardiser les méthodes pour déterminer le FPS des produits [168].

1.2.2.6.3. Les méthodes de mesure de l'activité photoprotectrice

La photo-protection assurée par les écrans solaires topiques contre l'exposition au rayonnement ultraviolet solaire, peut être évaluée *in vivo* ou *in vitro*. Elle est idéalement déterminée par un photo-test sur des volontaires humains. Ce type de test est utilisé depuis de nombreuses années, il s'agit d'un processus long, complexe et coûteux, notamment lorsque des informations concernant la protection contre les longues longueurs d'onde (UVA) sont requises [168].

En conséquence, beaucoup d'efforts ont été consacrés au développement de techniques *in vitro* pour évaluer les composés de protection solaire. La méthode de **MANSUR et al.** [169] est un test *in vitro* standard, largement utilisé pour mesurer le facteur de protection solaire (FPS) des écrans solaires et des produits naturels en utilisant des mesures spectrophotométriques en variant les longueurs d'onde. La valeur de (FSP) est calculée par application de l'équation mathématique de **MANSUR et al.** [169]

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Lieux des expérimentations

La partie expérimentale de cette étude s'est étalée sur une période de 4 ans (septembre 2018-octobre 2021). Les différentes analyses ont été réalisées dans les structures suivantes :

- Extraction de l'huile végétale de l'amande amère dans le laboratoire de recherche en Biotechnologies, Environnement et Santé de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Saad Dahleb Blida 1.
- Analyse de la composition chimique par CG-MS dans le Centre Technique des Industries Agroalimentaires (CTIAA), Boumerdes.
- Evaluation de l'activité antibactérienne dans le laboratoire de microbiologie relevant au laboratoire d'hygiène Tipaza.
- Evaluation de l'activité antifongique dans le laboratoire de mycologie de l'institut Pasteur, Dely Brahim, Alger.
- Evaluation des activités antioxydantes et enzymatiques de l'HAA dans le laboratoire de biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT).
- Etude anatomopathologique des pièces circulaires des oreilles des souris dans le laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Etablissement Public Hospitalier (EPH) Kolea. Tipaza.

2.2. Matériel biologique

2.2.1. Matériel végétal

Les graines ont été récoltées en mois d'aout 2018, dans la région de Tablat, wilaya de Médéa (NE : 36° 15' 51" N ; 2° 45' 14" E) Nord –Est de l'Algérie. Les graines ont été identifiées par Professeur Feradji.A à l'école nationale de sciences agronomiques (ENSA) El Harrach, Alger.

Les graines collectées (une quantité d'environ 5 Kg) ont été lavées et séchées à l'abri de la lumière à température ambiante puis conservées à 4°C dans des boîtes hermétiquement fermées, jusqu'au moment de l'extraction.

2.2.2. Matériel animal

Les animaux utilisés lors des tests *in vivo* ont été fournis par l'annexe de l'institut Pasteur Kouba, Alger. Les caractéristiques du modèle animal sont les suivantes :

- Souris albinos de race **NMRI** (Naval Médical Research Institute).
- Nombre : 20 souris.
- Sexe : mâle et femelle.
- Poids : 25-28 g.
- Température : 20-24 °C.
- Humidité : 50-60 %
- Eclairage : 10 heures par jour.
- Alimentation : Granulés « O.N.A.B »
- Boisson : Eau de robinet

2.2.3. Souches microbiennes

Un screening antimicrobien a été effectué, *in vitro* pour mettre en évidence le caractère antimicrobien de l'huile végétale de l'amande amère.

Au total 12 souches microbiennes ont été testées dont quatre (04) souches bactériennes de référence ATCC, deux Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC 25 922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) et deux Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 et *Bacillus subtilus* ATCC 6633).

Toutes les bactéries ont été cultivées sur Muller Hinton Agar (MHA) à 37°C pendant 24h avant tout test antibactérien.

Pour les isolats fongiques 8 souches ont été testées : 4 levures (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*), 2 moisissures (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*) et 2 dermatophytes (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*).

Les souches fongiques testées ont été isolées à partir des prélèvements de malades ayant contracté différentes infections, au niveau laboratoire de mycologie de l'institut Pasteur Dely Brahim, Alger.

Les souches fongiques mentionnées ci-dessus, ont été cultivées sur Sabouraud chloramphénicol à 25°C jusqu'à l'obtention d'une bonne croissance. Tous ces milieux de culture proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA, Alger).

2.3. Méthodes

2.3.1. Extraction de l'huile d'amande amère

L'extraction de l'HAA a été effectuée par pression à froid dans un appareil de type presse à vis d'une capacité de 4 à 6kg /heure à 40°C. L'huile extraite à partir des graines a été mise en sédimentation pendant une semaine, puis filtrée pour éliminer toutes les impuretés.

L'huile purifiée a été stockée dans des bouteilles opaques à la lumière à 4°C à jusqu'à son utilisation.

Le rendement en huile végétale a été calculé par rapport au poids sec des graines, soit :

Rendement de l'HV(%) = [masse d'HV obtenue (g) /masse de la graine sèche (g)]*100

2.3.2. Caractérisation physicochimique de l'huile d'amande amère

2.3.2.1. Caractérisation physique

2.3.2.1.1. Détermination de la densité relative : la densité d'une HV est définie comme étant le rapport de sa masse volumique et la masse volumique d'un composé de référence (eau).

Le principe est basé sur la mesure de la masse, à la température demandée, d'un volume de corps gras contenu dans un pycnomètre préalablement étalonné à la même température par rapport à l'eau. La densité relative a été déterminée en triplicata selon la méthode décrite dans la norme **ISO 6882 [170]**, et calculée par la formule suivante :

$$D_{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

Avec :

m_0 : Masse en gramme du pycnomètre vide.

m_1 : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile

2.3.2.1.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est le rapport de la vitesse d'un rayon lumineux (la raie D du sodium (589 nm) dans le vide à sa vitesse dans le milieu. Autrement dit, c'est la mesure de la réfringence d'un corps donné par rapport à la raie D du sodium et permet de classer les huiles en huile siccative, demi siccative ou non siccative.

La mesure de l'indice de réfraction se fait par le biais d'un réfractomètre relié à un bain thermostaté à une température où l'huile est liquide. Le réfractomètre est préalablement étalonné avec de l'eau distillée. La méthode utilisée est celle décrite dans la norme **ISO 6320 [171]**.

2.3.2.1.3. Extinction spécifique dans l'UV

Principe : l'absorbance dans l'ultraviolet repose sur la détermination des coefficients d'extinction, aux longueurs d'onde 232 nm et 270 nm, selon la méthode décrite dans la norme **ISO 3656 [172]**. Le principe de cette méthode est basé sur le calcul de la quantité d'énergie lumineuse absorbée par un composé non transparent aux longueurs d'ondes données.

Méthodologie : les extinctions spécifiques K_{232} et K_{270} sont calculées comme suit : on a pris 0,1g de l'HAA à laquelle on a ajouté 10 ml de cyclohexane. Après homogénéisation, on mesure les extinctions aux longueurs d'onde 232 et 270nm. Le calcul des extinctions spécifiques aux différentes longueurs d'onde se fait par la formule suivante :

$$E_{\lambda} = A_{\lambda} / C \cdot l$$

E_{λ} : Extinction spécifique à la longueur d'onde λ

A_{λ} : Extinction mesurée à la longueur d'onde λ

c : Concentration en gramme par 100 ml

l : Epaisseur de la cuve (1 cm)

2.3.2.2. Propriétés chimiques

2.3.2.1. Indice d'acide et acidité

La teneur en acides gras libres d'une matière grasse est exprimée de deux manières soit par son acidité soit par son indice d'acide. Ces deux paramètres sont déterminés par la même méthode, seuls leurs modes d'expressions est différent. Le principe de l'analyse (de l'acidité ou de l'indice d'acide) consiste à la mise en solution, d'une prise d'essai de 5 g d'huile, dans un mélange d'éthanol et d'oxyde diéthylique (V/V) selon la méthode recommandée par l'**ISO 660[173]**.

On procède par la suite à un titrage des acides gras libres présents dans le mélange (huile – solvant) à l'aide d'une solution éthanolique de potassium (0,1N) en présence de phénophtaléine.

L'indice d'acide (IA) évalue la quantité d'acides gras libres qui sont responsables du rancissement. Cet indice représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans un gramme de corps gras. Il s'exprime par la relation suivante :

$$IA = 56,11.T.V/m$$

V: Nombre de ml de la solution de KOH.

T: normalité de la solution de KOH.

m: masse en gramme de la prise d'essai.

Quant à l'acidité, elle exprime le pourcentage d'acides gras libres contenus dans un corps gras. Selon la nature du corps gras, l'acidité peut être exprimée en pourcentage d'acide oléique, palmitique, érucique ou laurique, selon la relation suivante :

$$A\% = IA/2$$

2.3.2.2.2. Indice de peroxyde

Principe : l'indice de peroxyde permet d'évaluer la quantité de peroxydes présents dans un corps gras, et d'indiquer par conséquent le taux d'acides gras rances. Cet indice correspond à la teneur en oxygène actif du peroxyde présent dans le corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. La méthode utilisée est celle décrite par **la norme ISO 3960 [174]**.

Au contact de l'oxygène, les acides gras insaturés s'oxydent par fixation d'oxygène et forment les peroxydes, comme l'indique la réaction suivante (**Figure 2.1.**) :

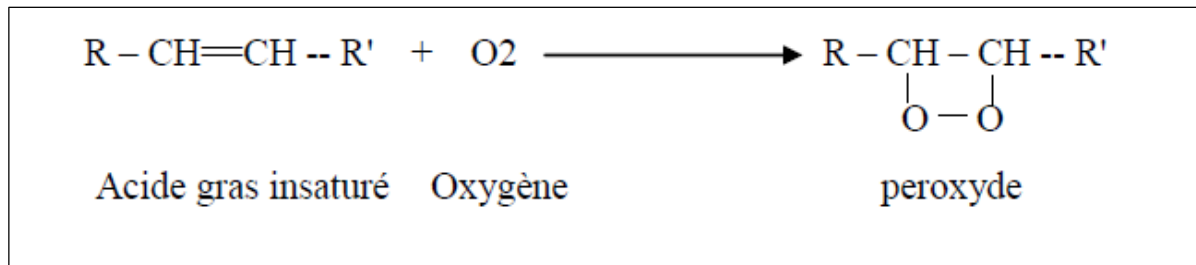


Figure 2.1. Réaction d'oxydation des acides gras insaturés [174].

Cet indice est souvent exprimé en millimoles ou milliéquivalents d'oxygène actif par Kg de corps gras.

Méthodologie : le principe de la méthode repose sur la mise d'une prise d'essai en solution dans un mélange d'acide acétique et de chloroforme avec addition d'une solution de KI. Après 5 minutes à l'obscurité, l'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de sodium (0,002N) en présence d'empois d'amidon comme indicateur. Parallèlement à cela, on effectue un essai à blanc.

$$IP = \frac{T \times (V_0 - V_1)}{m} \times 100 \left(\frac{\text{meqd}^{O_2}}{\text{Kg}} \cdot \text{de corps gras} \right)$$

V_0 : Volume en ml de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai à Blanc.

V_1 : Volume en ml de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'échantillon.

T : Normalité exacte de la solution de thiosulfate de sodium utilisée (0,002N).

m : Masse en gramme de la prise d'essai (2g).

2.3.2.2.3. Indice de saponification

Principe : l'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un gramme de produit. La méthode d'analyse utilisée est celle recommandée par la norme **ISO 3657** [175].

Méthodologie : l'échantillon d'huile est soumis à ébullition à reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,5 N. L'excès d'hydroxyde de potassium est titré par une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 N en présence de phénophtaléine.

L'indice de saponification est donné par la relation suivante :

$$IS = \frac{56,11 \times T(V_0 - V_1)}{m}$$

V : Volume en ml de la solution d'HCl utilisée pour l'essai à Blanc.

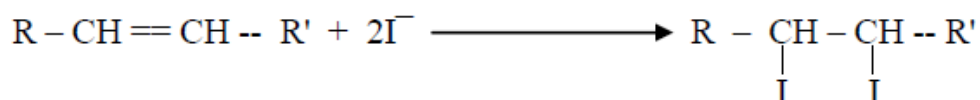
V_1 : Volume en ml de la solution d'HCl utilisée pour l'échantillon.

T : Normalité exacte de la solution d'HCl utilisée (0,5N).

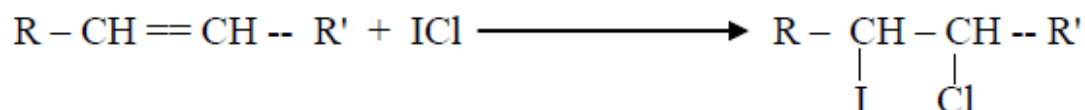
m : Masse en gramme de la prise d'essai (2g).

2.3.2.2.4. Indice d'iode

L'indice d'iode renseigne sur le degré d'insaturation d'un acide gras. Cette insaturation facilite le rancissement du corps gras. L'indice d'iode d'une huile végétale est le nombre de g d'halogène fixé par 100g de corps gras exprimé en iode, selon la réaction suivante :



Le principe de la manipulation consiste à l'addition, à une prise d'essai (se trouvant en solution dans le tétrachlorure de carbone) d'un excès de réactif de Wijs (réactif composé de monochlorure d'iode en solution dans un mélange d'acide acétique et de tétrachlorure de carbone). La méthode utilisée est celle décrite par la norme **ISO 3961 [176]**.



Après le temps de réaction, l'excès d'iode est réduit par une solution aqueuse d'iodure de potassium selon la réaction suivante :



L'iode libéré est alors titré par une solution de thiosulfate de sodium à 0,1N.



L'indice d'iode est donné par la formule ci-dessous :

$$II = \frac{12,69 \times T(V_0 - V_1)}{m}$$

V_0 : Volume, en ml, de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour essai à blanc

V_1 : Volume, en ml, de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'échantillon.

T: Normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée 0,1N.

m : Masse, en grammes, de la prise d'essai 0,15g.

2.3.2.2.5. Analyse chimique par CG-MS

Le principe de ces techniques repose sur la transformation des acides gras en dérivés esters d'acides gras ou esters méthyliques (EMAG).

La préparation des esters méthyliques d'acides gras a été effectuée selon la norme **ISO12966-2 [177]** en transformant 50mg de la matière grasse brute (huile) dans des conditions alcalines (Trans-méthylation). Les EMAG sont extraits par centrifugation dans 1 ml d'isooctane. Une dilution de la solution d'extraction a été réalisée par l'isooctane.

Les courbes d'étalonnage ont été construites en utilisant une solution étalon constituée d'un mélange de 37 EMAG (solution restek Cat #35077).

L'étalonnage externe a été réalisé en diluant la solution étalon dans l'isooctane pour créer une série de 15 à 300 ppm.

L'injection des standards et des échantillons a été effectuée par ordre dans une colonne Rt-2560 (diamètre 100 diamètre 0.25mm) placée dans un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse Perkin Elmer (Clarus SQ8S GC/MS) en utilisant les conditions opératoires suivantes :

- Phase stationnaire : Colonne Rt-2560 (diamètre 100 diamètre 0.25mm)
- Phase mobile : Hélium débit constant 2.25ml/min
- Programme de température : 100°C (4min) à 240°C par pas de 4°C. 240°C (20 min)
- Température d'injection : 225°C

- Température de la ligne de transfert de la source 200°C

Les courbes de calibration ont été calculées en fonction de la surface des pics.

L'identification, l'intégration ainsi que la quantification ont été réalisées par ordre, et par comparaison des temps de rétention de la mixture d'EMAG.

La composition en acides gras a été exprimée en EMAG (% massique)

2.3.2.2.6. Détermination des tocophérols

La technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la plus adaptée et la plus recommandée pour l'identification de la fraction tocophérolique [178].

La méthode utilisée pour la détermination des teneurs en α -, β -, γ - et δ -tocophérols des corps gras est celle prescrite par la norme **ISO 9936** [179].

Cette méthode est applicable à la fois aux corps gras d'origines animale et végétale. Les fractions massiques des différents tocophérols sont exprimées en mg/Kg.

Le principe de la manipulation consiste à dissoudre une prise d'essai de 2 g d'huile dans l'hexane. La séparation des tocophérols se fait, à partir de cette solution, par HPLC, cependant l'identification est réalisée par un spectrophotomètre UV (l'absorbance s'effectue à 292 nm).

Les différentes étapes caractérisant cette analyse sont résumées comme suit :

- Les solutions d'essais sont préparées en dissolvant 2 g d'huile dans 25 ml d'hexane.
- Une fois réalisée, un volume de 20 μ l sera prélevé de la solution puis injecté dans la colonne HPLC.

L'analyse s'effectue d'après les conditions opératoires mentionnées ci-dessous :

- La colonne en acier d'une longueur de 25 cm
- Phase stationnaire C₁₈
- solvant d'élution : Solution à 0.5% (V/V) d'isopropanol dans l'hexane.
- Débit : 1, 50 ml/min.
- Longueur d'onde : 292 nm.
- Quantité injectée : 20 μ l.
- Boucle d'injection : 20 μ l.
- Détecteur UV Visible.

- Intégration se fait par Logiciel BREEZE.

2.3.2.2.7. Dosage des polyphénols totaux

Principe : Le contenu phénolique total de l'HAA a été déterminé en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu

[180] par la méthode de dosage sur microplaque de 96 puits décrite par **MULLER et al. [181]**.

Le principe de cette méthode repose sur le transfert d'électrons des composés phénoliques au FCR en milieu alcalin.

Méthodologie : Un volume de 20 µl d'extrait de l'HAA (1 mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100 µl de FCR dilué (1:10), auquel un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) est additionné. Le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante.

L'absorbance a été déterminée à 765nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). L'acide gallique (10%) est utilisé comme contrôle positif, à partir duquel une courbe d'étalonnage a été établie.

L'équation de régression déduite de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique permet de déterminer la teneur en phénols totaux exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG /mg d'extrait).

2.3.2.2.8. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe : la détermination du taux des flavonoïdes présents dans l'HAA a été faite en suivant le protocole décrit par **TOPÇU et al. [182]** avec quelques modifications. Le principe de cette méthode repose sur le dosage direct par le chlorure de l'aluminium. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait.

La méthode décrite par **TOPÇU et al. [182]** est utilisée et adaptée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits.

Méthodologie : Un volume de 50 µl de l'HAA est mélangé avec 130 µl de méthanol, 10 µl d'acétate de potassium (1M) et 10 µl de nitrate d'aluminium (10%). Ce mélange est ensuite maintenu à température ambiante pendant 40 min, puis une lecture d'absorbance est réalisée à 415 nm.

La courbe d'étalonnage des flavonoïdes a été effectuée en utilisant la quercétine à une concentration allant de 25 à 200 µg /ml ($R > 0,99$). Le TFT est déterminée suite à l'équation de régression linéaire déduite à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgramme équivalent de quercétine par milligramme d'extrait sec (µg de QE / mg d'extrait).

2.4. Evaluation des activités biologiques de l'huile d'amande amère

2.4.1. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile d'amande amère

Principe : la recherche de l'activité antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis à l'HAA. Pour cela, la technique de diffusion sur milieu solide a été utilisée dans le but d'étudier le pouvoir antimicrobien des extraits testés, et ce d'après la méthode décrite par **PEREZ. [183]**.

C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche microbienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits.

Méthodologie : dans cette technique, nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) imprégnés d'une certaine quantité d'HAA. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne.

Dans la présente étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HAA en imprégnant les disques par 3 doses croissantes 20µl, 40µl ou 60µl d'HV par disque, séparément. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action "dose-dépendante" de l'HAA sur la croissance des souches microbiennes.

De même, la suspension microbienne a été standardisée (0.5 McFarland pour les bactéries et 1.5 McFarland pour les champignons) et bien homogénéisée (vortex)

avant son ensemencement sur le milieu gélosé adéquat (MH pour les bactéries et SAB pour les champignons).

Chaque boîte de Pétri est incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries, 25°C pendant 3 et 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement, et de 15 à 20 jours pour les dermatophytes à 25°C). Après incubation, le diamètre de zone d'inhibition (DZI) de chaque disque a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse et exprimé en millimètres (mm).

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque. Plus le DZI est grand, plus la souche est sensible à l'HAA. Ainsi, la souche microbienne sera classée comme étant sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis de l'HAA.

Deux contrôles ont été effectués pour chaque souche : un témoin positif par un antimicrobien de référence ciprofloxacine (5µg), tétracycline (30µg), oxacilline (1µg), gentamycine (10µg), ofloxacine (5µg et ampicilline 10µg), pour les souches bactériennes et fluconazole (10µg/disque) pour les souches fongiques]. Un témoin négatif a été réalisé sans l'HV testée.

2.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'huile d'amande amère a été évalué en utilisant plusieurs méthodes, notamment, des tests anti-radicalaires (DPPH, ABTS), le pouvoir réducteur (réduction des ions de fer (FRAP) et de cuivre (CUPRAC)) et par test de blanchiment de la β carotène. Toutes les mesures ont été répétées trois fois et déterminées à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits « PerkinElmer Multimode Plate Reader Enspire »

2.4.2.1. Activité de piégeage du radical DPPH

La capacité de piégeage du radical DPPH a été mesurée par la décoloration de la couleur violette d'une solution méthanolique de DPPH, selon la méthode standard décrite par **BLOIS [184]**, avec quelques modifications.

Pour cela, un volume de 40µl de la solution méthanolique de l'HAA à différentes concentrations a été mise dans une microplaque à 96 puits, auxquelles, 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0.1mM) ont été ajoutés. Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité .l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT, BHA et l' α -tocophérol ont été utilisés comme des molécules standards.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé selon la relation :

$$\% d'inhibition = \frac{[(Abs0 - Abs1)]}{(Abs0)} \times 100$$

Ou : Abs0 est l'absorbance du contrôle à 517 nm ;

Abs1 est l'absorbance de HV à différentes concentrations à 517 nm.

La concentration qui permet d'inhiber 50 % du radical DPPH (CI₅₀) a été calculée par régression linéaire.

2.4.2.2. Activité de piégeage du radical ABTS

Principe : le potentiel antioxydant de l'HAA a été également évalué par piégeage du radical ABTS selon le protocole standard de **RE et al. [185]**. Dans ce fait, 7,0 mM d'ABTS ont été ajoutés à une solution de persulfate de potassium (2,45mM), et la solution obtenue a été maintenue à l'obscurité à température ambiante pendant 16 h pour générer un cation radicalaire (ABTS^{•+}), d'une couleur bleu verte.

La solution ABTS^{•+} a été diluée par la suite, jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,7±0.02 à 734 nm. L'ajout d'antioxydant au cation radical préformé le réduit en ABTS qui se traduit par la décoloration de la solution bleue.

Méthodologie : un volume de 40 µl de l'échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 160 µl de la solution des radicaux ABTS^{•+} et les absorbances ont été mesurées à 734 nm après 10 minutes d'incubation.

De même pour le BHT, BHA et l'α-tocophérol qui sont utilisés comme des contrôles positifs.

La CI₅₀ a été déterminée par régression linéaire.

2.4.2.3. Pouvoir réducteur du cuivre (CUPRAC)

Principe : la capacité réductrice du cuivre a été évaluée en suivant le protocole standard d'**APAK et al. [186]** avec une légère modification. Le pouvoir antioxydant réducteur de cuivre (CUPRAC) est basé sur le principe de réduction du complexe de la néocuproïne [Cu(II)-Nc] en forme cuivreuse [Cu(I)-Nc] par l'huile végétale (**Figure 2.2**).

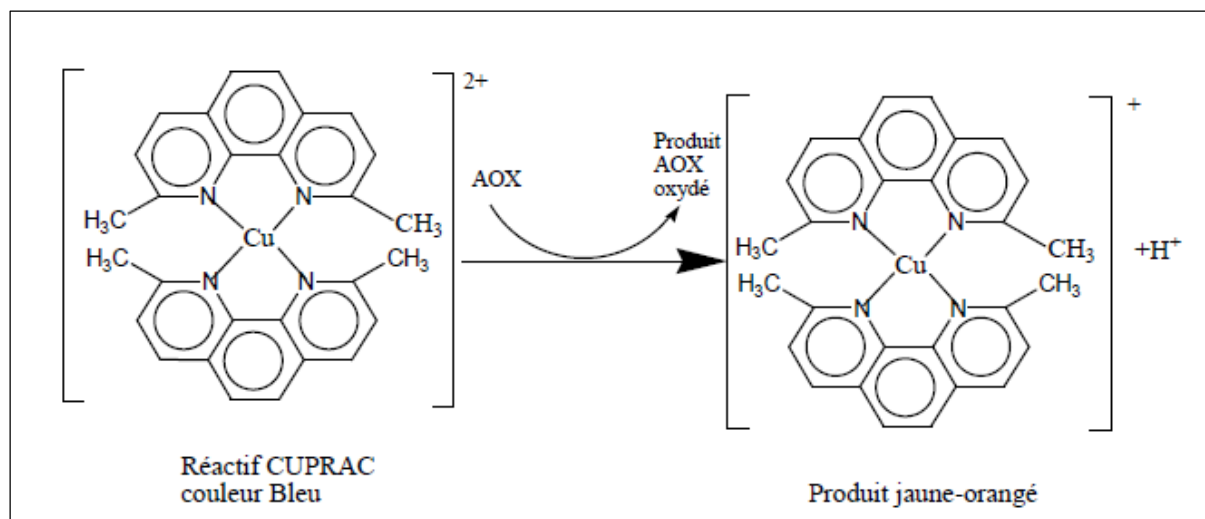


Figure 2.2. Réaction de réduction du réactif CUPRAC [186].

Le mélange réactionnel contenant 50 μl de (Cu (II), 10mM), 50 μl de néocupronine (7,5mM), 60 μl du tampon acétate d'ammonium (NH_4Ac) (1M, pH 7,0) et 40 μl de la solution méthanolique de l'HAA à différentes concentrations. L'absorbance du mélange a été mesurée à 450 nm après 1h d'incubation à 25°C.

Les résultats ont été exprimés en tant que $A_{0,5}$ et comparés à ceux du BHT et BHA.

2.4.2.4. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Principe : le pouvoir réducteur de fer a été mesuré selon la méthode décrite par OYAZU [187]. Cette méthode est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) par le complexe de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] en fer ferreux (Fe^{2+}) et apparition d'une couleur bleue de Prusse et l'absorbance a été mesurée à 700 nm.

Méthodologie : un volume de 10 μl de la solution méthanolique de l'HAA à différentes concentrations ont été rajoutés à 40 μl de tampon phosphate 0,2 M (pH=6,6) et 50 μl de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%, le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 minutes. ensuite, 50 μl d'acide trichloracétique (10%), 40 μl d'eau distillée et 10 μl de chlorure de fer (FeCl_3), 0,1% ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Le BHT, BHA ont été utilisés comme des molécules standards.

Les résultats ont été exprimés en tant que $A_{0,5}$ ce qui correspond à la concentration dans laquelle l'absorbance est égale à 0,5.

2.4.2.5. Test de blanchissement du β -carotène

Principe : le pouvoir antioxydant de l'HAA a été également déterminé en utilisant le test β -carotène/acide linoléique [188]. Le principe de la méthode est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique qui va libérer des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes conjugués, qui vont par la suite oxydés le β -carotène, ce qui va entraîner la perte de sa couleur rouge (décoloration ou blanchissement).

Méthodologie : une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée en solubilisant 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml du chloroforme a été ajoutée à 25 μ l d'acide linoléique, et 200 μ l de tween 40. Le chloroforme a été complètement éliminé dans le Rotavapor à 40°C, par la suite 50 μ l d'eau oxygénée ont été rajoutés. 160 μ l de cette émulsion ont été déposées dans une microplaque à 96 puits contenant 40 μ l de la solution méthanolique de l'HV à différentes concentrations.

L'absorbance a été mesurée à 470 nm à T_0 et à T_{120} après 2 heures d'incubation à 50°C. Les résultats sont comparés à des contrôles positifs BHA et BHT utilisés dans les mêmes conditions opératoires. Un blanc dépourvu de la β -carotène a été également utilisé dans les mêmes conditions.

L'activité antioxydante a été calculée d'après la formule suivante :

$$AA(\%) = \frac{[1 - (A_{H0} - A_{Ht})]}{(A_{CO} - A_{Ct})} \times 100$$

Avec

AA (%) : activité antioxydante ;

A_{H0} Valeur de l'absorbance du β -carotène en présence de l'HV à $t=0$;

A_{CO} Valeur de l'absorbance du β -carotène en présence Du contrôle négatif à $t=0$;

A_{Ht} Valeur de l'absorbance du β -carotène en présence de l'HV à $t=120$ min ;

A_{H0} Valeur de l'absorbance du β -carotène en présence du contrôle négatif à $t=120$ min.

La CI_{50} a été également calculée, elle correspond à la concentration de l'HV pour laquelle une réduction de l'oxydation du β -carotène de 50% a été observée.

2.4.3. Evaluation des activités enzymatiques

2.4.3.1. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase

Principe : l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été effectuée par la méthode décrite par **BEHVAR ASGHARI *et al.*** [146] avec quelques modifications. Dans le milieu réactionnel, lorsque l'enzyme α -glucosidase est active, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (le substrat de l'enzyme) est hydrolysé en libérant des unités de glucose. Le test d'inhibition de α -glucosidase est basé sur la colorimétrie à base d'une solution de carbonate de sodium (**Figure 2.3**)

Une procédure standard avec peu de modifications a été adoptée pour l'examen des potentiels inhibiteurs de l' α -glucosidase [146].

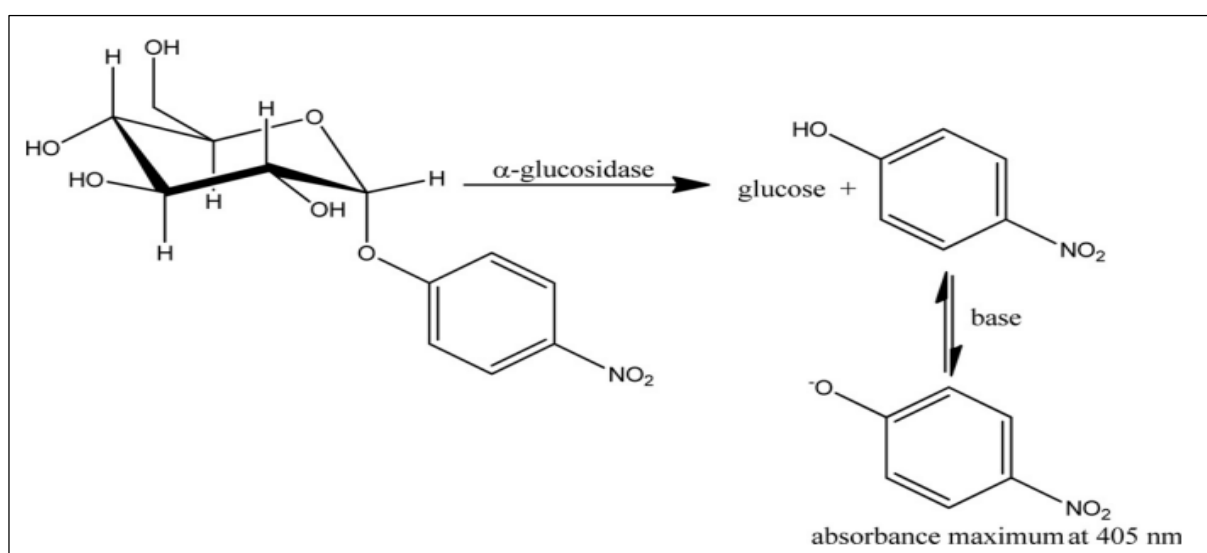


Figure 2.3. Activité enzymatique de l' α -glucosidase [146].

Méthodologie : un extrait de 20 μ l de différentes doses (62,5, 125, 250, 500 et 1 000 μ g/ml) a été incubé à 37°C avec 50 μ l de tampon phosphate 100 mM (pH 6) et 10 μ l de α -glucosidase (1 U/ml) dans une microplaque à 96 puits pendant 15 min. 20 μ l de p-nitrophénol-glucopyranoside 5 mM ont été ajoutés comme substrat suivi d'une incubation supplémentaire pendant 20 minutes à 37°C.

La réaction a été achevée après l'ajout de 50 μ l de carbonate de sodium (0,1 M). L'absorbance a été calculée pour le p-nitrophénol libéré par Multiplate Reader à 405 nm. L'acarbose a servi de molécule de référence et les résultats calculés comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs de l'extrait} - \text{Abs de Blanc}) / \text{Abs de control} \times 100$$

Avec :

Control : Enzyme + Substrat + Solvant de l'extrait.

Blanc : Substrat + Extrait + Tampon de l'enzyme.

2.4.3.2. Activité inhibitrice de l' α -amylase

Principe :

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été déterminée par la méthode de **ZENGIN et al. [147]** avec quelques modifications. Dans le milieu réactionnel, lorsque l'enzyme α -amylase est active, l'amidon (le substrat de l'enzyme) est hydrolysé en libérant des unités de maltose et de glucose. Le test d'inhibition de α -amylase est basé sur la colorimétrie à base de solution d'iode pour déterminer la quantité d'amidon hydrolysé.

Méthodologie :

Des mélanges de α -amylase (50 μ l) (1U) avec des solutions d'extrait de différentes concentrations (25 μ l) ont été préparés dans une microplaque à 96 puits, puis incubés pendant 10 min à 37°C. La réaction a été ensuite initiée en ajoutant une solution d'amidon (50 μ L, 0.1%). Les mélanges réactionnels ont de nouveau été incubés pendant 10 minutes à 37°C. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant 25 μ l d'acide chlorhydrique (HCl, 1 M), et 100 μ l d'iodure de potassium (KI).

En parallèle, des blancs à base de solutions d'extrait de différentes concentrations ont été également préparés (un blanc est constitué d'une solution d'extrait d'une concentration donnée, d'amidon, d'acide chlorhydrique, et d'iodure de potassium).

La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 630 nm.

L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon (**Figure2.4**)

L'accharose a été utilisé comme témoin positif.

Le pourcentage d'inhibition de α -amylase a été calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \left[\frac{(A_c - A_e) - (A_s - A_b)}{(A_c - A_e)} \right]$$

Ac=Absorbance [Amidon + KI + HCl + solvant d'extrait + tampon Enzyme]

Ae=Absorbance [Enzyme + Amidon + KI + HCl + solvant d'extrait]

As=Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + KI + HCl]

Ab=Absorbance [Extrait + KI + tampon].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
B	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
C	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
D	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
E	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
F	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
G	As ₁	As ₁	As ₁	Ab ₁	As ₂	As ₂	As ₂	Ab ₂	As	As	As	Ab
H	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

Figure 2.4.Récapitulatif des différentes solutions préparées [147].

2.4.3.3. Activité anti-cholinestérase

Principe : l'inhibition de l'AChE a été mesurée par un dosage colorimétrique selon la méthode décrite par **ELLMAN *et al.*** [160]. En effet, l'AChE catalyse efficacement l'hydrolyse de l'acétylthiocholine ; cette réaction libère l'ion acétate et la thiocholine.

La thiocholine réagit à son tour, via ses groupements thiols-SH-, avec 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) et génère une couleur jaune, absorbant à 412 nm ce qui permet son dosage.

Méthodologie : dans une microplaque à 96 puits, 10µl de chaque concentration de la solution méthanolique de l'HAA ont été mélangés et homogénéisés dans 150µl du tampon phosphate de sodium (100mM, pH 8) et 20µl d'enzymes [AChE (0,45U/ml)]. Après 15 minutes d'incubation à 25°C, 10µl de DTNB (0,5mM) et 10 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71mM) ont été ajoutés de façon à obtenir le volume final égale à 200µl.

La formation du 2 nitrobenzoïque-5-mercaptopthiocholine de couleur jaune a été mesurée à 412 nm. La galanthamine a été utilisé comme inhibiteur de référence des cholinestérases.

Le pourcentage d'inhibition d'AChE a été calculé par rapport au blanc (méthanol et le tampon phosphate de sodium) comme indiqué ci-dessous

$$I\% = [(E-S)/E]*100$$

Avec **E** l'activité de l'enzyme sans HV ;

S activité de l'enzyme en présence de l'HV.

La CI_{50} de l'activité AChE a été calculée à partir des courbes de régression linéaire, la mesure a été répétée trois fois pour chaque échantillon.

2.4.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

Principe : le modèle de la dénaturation de l'albumine a été choisi pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires *in-vitro* de l'HV étudiée. Le principe de cette technique est basé sur la capacité de cette huile à empêcher la dénaturation thermique de l'albumine bovine sérique (BSA) [189]. La dénaturation de l'albumine sous l'effet de la chaleur aboutit à un mime de l'expression d'antigènes associés à une hypersensibilité de Type III, réaction impliquée dans des maladies telles que les maladies sériques, la glomérulonéphrite... et autres [189].

L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* de l'HAA est déterminée par la méthode de **KANDIKATTU *et al.* [190]** avec de légères modifications.

Méthodologie :

1) Le mélange réactionnel (1ml) est constitué de 0,5 ml de chaque extrait à différentes concentrations (62.5, 125, 250, 500 et 1000 µg/ml) et 0,5 ml de la solution aqueuse du sérum bovine d'albumine (BSA : Bovine serum albumin) 0,2%, préparé dans Tris HCl pH : 6,6). Chaque concentration est répétée 3 fois.

2) Préparation des blancs

Pour chaque concentration d'extrait de plante un blanc extrait est préparé dans lequel 0,5 ml d'extrait est ajouté à 0,5 ml de Tris-HCl (Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus).

Un blanc BSA contenant 0,5 ml de la solution de BSA ajouté à 0,5 ml du solvant utilisé pour les extraits (le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA

en absence de substance inhibitrice).

Les tubes préparés au paravent sont incubés à 37°C pendant 15 min. puis chauffés à 72°C pendant 5 min. Après refroidissement, la turbidité des échantillons a été mesurée par spectrophotomètre à 660 nm.

Le diclofénac de sodium (250 µg/mL) est utilisé comme standard (contrôle positif). L'expérience a été réalisée en triple. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_c - A_e}{A_c} \times 100$$

Ac absorbance de control

Ae absorbance des extraits

2.4.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire topique *in vivo*

Principe : l'activité anti-inflammatoire topique de l'HAA a été évaluée *in vivo* sur des souris saines. L'œdème a été induit, au niveau de l'oreille droite de chaque souris, par application d'une solution irritante de xylène. L'oreille gauche servait de témoin.

La méthodologie suivie est celle décrite par **WANG et al. [191]**.

Méthodologie :

4 lots de 5 souris chacun ont été constitués et répartis comme suit :

- **Au temps T₀ :**
- Lot 1 : recevra une goutte de d'HAA pure par application cutanée sur l'oreille gauche (OG).
- Lot 2 : recevra une goutte d'HAA diluée à 50 % dans l'huile de vaseline par application cutanée sur l'OG
- Lot 3 : (Témoin -) une goutte de l'huile de vaseline par application cutanée sur l'OG.
- Lot 4 : (Témoin +) recevra une quantité d'un gel anti-inflammatoire (Voltarène Emulgel® 1%, Diclofénac de sodium) par application cutanée sur l'OG.

- **Au T₀ +30 min :**

Après application des traitements, l'induction de l'inflammation a été effectuée par voie cutanée d'une solution irritante de xylène sur l'oreille gauche de toutes les souris préalablement traitées.

- **.Après 5 heures :**

Les souris ont été sacrifiées par une surdose de l'éther diéthylique et des

pièces circulaires, de 8 mm de diamètre, ont été coupées et retirées des oreilles traitées (gauches) et non traitées (droites).

Ces pièces ont été pesées et conservées immédiatement dans du formol à 10% pour une éventuelle étude histopathologique.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au contrôle négatif, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{(T-) - E}{(T-)} \times 100$$

T- : Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (gauche - droite) pour le lot Témoin – (huile de vasline).

E: Différence entre les moyennes du poids de l'oreille (gauche - droite) pour le lot essai (HAA ou Témoin +)

2.4.5.1. Etude histologique

Afin de confirmer l'activité anti-inflammatoire topique de l'HAA au niveau cellulaire, des coupes histopathologiques ont été réalisées sur des pièces circulaires des oreilles gauches et droites. La coloration effectuée était celle de **Hématoxyline-Eosine** selon la procédure de **MARTOJA et MARTOJA-PIERSON [192]**.

Le protocole opératoire est détaillé en **Appendice A**

Les coupes sont réalisées avec un microtome (Leica RM 212SRTS) permettant d'obtenir des sections de 3 à 5µm d'épaisseur. L'observation a été accomplie par microscopie photonique (Olympus Cx41) aux grossissements x10 et x40. Des photos ont été prises pour quantifier l'intensité de l'inflammation (œdème) et l'infiltration cellulaire.

2.4.6. Evaluation de l'activité photoprotectrice (détermination *in-vitro* du facteur de protection solaire FPS ou Sun Protection Factor 'SPF')

L'activité photoprotectrice de l'HAA est évaluée par la méthode de **MANSUR et al., [169]**.

Les extraits testés ont été dilués dans le méthanol pour obtenir une concentration de 2 mg/ml. 200 µl des différents échantillons (HAA et les molécules de références) ont été mis dans une microplaque à 96 puits, puis mesurés entre 290 à 320 nm, à des intervalles de 5 nm, en prenant le méthanol comme blanc.

Toutes les lectures ont été prises en triplicata à chaque point. La valeur du FPS a été calculée par l'application de l'équation mathématique développée par **MANSUR et al. [169]**:

$$SPF_{Spectrophotometric} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times ABS(\lambda)$$

Où :

EE (λ) : est le spectre d'effet érythémal (erythemal effect spectrum) ;

I (λ) : est le spectre d'intensité solaire (solar intensity spectrum) ;

Abs (λ) : est l'absorbance des échantillons (absorbance of sunscreen product) ;

CF : est le facteur de correction (correction factor : 10).

Le **tableau 2.1**. permet de classer les résultats du SPF de notre échantillon comme : faible, moyenne, haute et très haute protection, d'après les recommandations de la Commission Européenne 2006 **[193]**.

Tableau 2.1. Classement des valeurs SPF [193].

Catégorie indiquée	Facteur de protection indiqué	Facteur de protection solaire mesuré	Facteur de protection UVA minimal recommandé	Longueur d'onde critique minimale recommandée
« faible protection »	6	6- 9.9	1/3 du facteur de protection solaire indiqué sur l'étiquette	370 nm
	10	10- 14.9		
« protection moyenne »	15	15-19.5		
	20	20-24.9		
	25	25-29.9		
« Haute protection »	30	30-49.9		
	50	50-59.9		
« très haute protection »	50+	60 ≤		

2.5. Analyse statistique

Pour toutes les méthodes, trois répétitions ont été réalisées, et les résultats ont été exprimés comme moyenne \pm SD (standard déviation). Une analyse statistique a été effectuée par One-way ANOVA suivie du post-hoc test de Tukey, pour les comparaisons multiples et pour la détermination des différences significatives entre les groupes. ($p < 0,05.$) en utilisant le logiciel Graph Pad Prism Version 5.00 (2016).

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Rendement de l'extraction de l'huile d'amande amère

La teneur en huile des graines d'amande amère obtenue par pression à froid a été calculée par rapport au poids sec des graines.

Les résultats, nous permettent de remarquer une teneur relativement élevée en huile extraite à partir des graines de *P.amygdalus var amara*, égale à 35.5%±0.33.

Cette teneur en huile est comparable à celle trouvée chez différentes espèces d'amandier **HANINE et al. [194]** ont trouvé que le rendement d'extraction de l'HAA cultivé au Maroc, ne dépasse pas 35%, de même, **COLIC et al. [195]** ont trouvé que la teneur en huile des graines *P.amygdalus* cultivés en Serbie varie entre 36 et 62%,obtenue par la même méthode d'extraction.

Cependant, les teneurs en huile la plus faible (25,19%) et la plus élevée (79 %) ont été relevées chez des cultivars de Turquie **[196,75]**.

Cette variabilité de la teneur en huile peut être attribuée à certains facteurs abiotiques dont la température, les techniques d'extraction, la durée de l'extraction, la taille des particules, et l'environnement **[82, 69, 66,70]**, ainsi qu'à certaines conditions biotiques telles que le génotype, et la variation du métabolisme cellulaire, qui peuvent influencer les processus biochimiques et physiologiques impliqués dans la biosynthèse de l'huile au niveau de l'endosperme des graines **[57]**.

D'une manière générale, le taux d'extraction est fortement affecté par la méthode d'extraction. Selon **ÖZCAN et al. [75]**, la méthode d'extraction par pression à froid a fourni des niveaux de HAA relativement inférieurs, mais de meilleure qualité, tout en conservant ses qualités organoleptiques.

3.2. Etude des caractéristiques physicochimiques de l'huile d'amande amère

Malgré l'importance du rendement de l'extraction, la valeur commerciale d'une HV est estimée dans la plupart des cas à travers ses qualités organoleptiques et certaines propriétés physicochimiques. Chaque huile végétale a ses propriétés qui

dérivent directement à partir de sa structure chimique et de ses groupements fonctionnels [197]. La qualité de la composition de l'huile influence majoritairement les méthodes nécessaires à leur analyse [198]. Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile des graines de *P.amygdalus.var .amara* sont résumées dans le **tableau 3.1**

Tableau 3.1. : Paramètres physicochimiques de l'huile d'amande amère

Propriétés	Valeur
Couleur	Jaune doré
Etat physique à 4°C	Liquide
Indice de réfraction à 20°C	1.466±0.00
Densité à 20°C (g/cm ³)	0.912±0.00
Indice de saponification	215.88±0.04
Indice d'acide (mg KOH/g)	0.49±0.03
Indice d'iode (g de I ₂ /100 g d'huile)	88.93±0.60
Indice de peroxide (meqO ₂ /kg)	7.74±0.02
K ₂₃₂	2.612±0.02
K ₂₇₀	0.390±0.03

Les valeurs sont exprimées comme des moyennes ± SD (n=3). K₂₃₂ and K₂₇₀: coefficient d'extinction spécifique à 232 et 270 nm, respectivement

3.2.1. Caractéristiques physiques

Les propriétés physiques ont montré que l'huile obtenue était jaune dorée et liquide à température ambiante. L'HAA a une densité de 0,912 g/cm³, ce qui est dans les limites des études précédemment rapportées sur cette huile [57]. L'indice de réfraction des huiles dépend de leur poids moléculaire, de la longueur de la chaîne des acides gras, du degré d'insaturation et du degré de conjugaison. L'indice de réfraction de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* est de 1,466±0,00 à 20°C, ce qui est similaire à la valeur de certaines huiles d'amandes provenant des génotypes de Turquie, obtenues par la même méthode d'extraction, comme *P. amygdalus var.dulcis* (Ferragnes, 1.466), (Cristomorto 1.463) et (Tuono 1.470) [199].

Un indice de réfraction élevé est attribué à la concentration élevée en acides gras insaturés, à titre d'exemple, l'huile de grenade a un degré élevé d'insaturation (74,32 %) et un indice de réfraction de 1,5197 [200]. L'indice de réfraction est corrélé positivement

avec l'indice d'iode, qui est une mesure de l'insaturation des huiles et donne une idée de leur stabilité oxydative [201].

3.2.2. Caractéristiques chimiques

L'indice de saponification indique la teneur en unités saponifiables (groupes alcalino-réactifs) par unité d'huile. Ce paramètre est utilisé pour prédire le type de triglycérides dans une huile. En effet, les triacylglycérols contenant des acides gras de bas poids moléculaire ont une valeur de saponification plus élevée que ceux contenant des acides gras à longue chaîne [197]. Par conséquent, l'indice de saponification élevé de l'HAA (215,94 mg KOH/g d'huile) peut indiquer sa richesse en triacylglycérols contenant des acides gras de faible poids moléculaire. (C16 et C18).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour des huiles appartenant à d'autres espèces, notamment, l'huile de *Dracocephalum kotschyi* Boiss (192,6 mg KOH/g d'huile) [202], l'huile de graines de *Jatropha curcas* L. (194,7 mg KOH/g d'huile) [203], et l'huile d'olive (191,93 mg KOH/g d'huile) [204].

Cependant, des différences significatives ont été constatées dans les graines de *P.amygdalus* de Turquie, où la valeur de l'indice de saponification n'a pas dépassé 103,6 mg KOH/g d'huile, pour tous les génotypes testés [75]. Cela indique que la nature des espèces, le type de cultivar, et l'environnement affectent majoritairement les valeurs de l'indice de saponification, comme cela a été confirmé par **Li et al.** [205].

Sur la base des résultats trouvés dans cette étude, la saponification importante de l'huile des graines de *P.amygdalus* var. *amara* suggère son utilisation comme un ingrédient dans la fabrication des savons et de shampoing [206].

L'indice d'acide donne une estimation sur la quantité des acides gras libres et leur degré de dégradation par les enzymes lipases [197]. L'indice d'acide de l'HAA était faible (0,44) et dans les limites acceptables pour les huiles vierges et pressées à froid selon la norme Codex pour les nommées huiles végétales [207]. La faible valeur de cet indice résulte d'une dégradation lente des triglycérides, signifiant que cette huile peut avoir une longue durée de conservation.

En outre, l'indice d'iode, qui fait référence aux acides gras insaturés présents dans une huile, est utilisé comme indicateur pour prédire la durée de conservation d'une

huile [208]. Cette valeur a été trouvée relativement faible (88,93 g d'I₂ pour 100 g d'huile) dans l'HAA. Ce constat implique une stabilité oxydative élevée.

La valeur de cet indice est similaire aux résultats déjà rapportés pour l'huile d'amande [75]. Ainsi, elle se situe dans la gamme de ceux des huiles d'olive, de coton et de tournesol pour lesquelles la valeur de l'indice d'iode varie de 86 à 145 g /100 g d'huile [209]. Contrairement à ceux de l'huile d'argan, de pamplemousse et d'arachide, notre huile testée est fortement insaturée [210]. Une huile présentant une faible valeur d'indice d'iode est propre à la consommation, elle peut être utilisée comme huile non siccative.

Généralement, les huiles végétales à teneur élevée en iode (plus de 190) sont relativement moins stables et plus sensibles à la dégradation oxydative, elles sont souvent utilisées pour les industries de la peinture et du vernis [197].

Par ailleurs, on a remarqué que l'indice de peroxyde de l'HAA est de 7,78 eq O₂/kg d'huile, qui est inférieur à 10 méq. d'O₂/kg d'huile, la valeur autorisée pour les huiles brutes par le Comité du Codex Alimentarius [207], révélant que l'huile testée est fraîche et de bonne qualité en tenant compte de sa stabilité oxydative.

Une huile avec un indice de peroxyde supérieur à 9 meq O₂/kg a des effets néfastes sur la santé humaine, en augmentant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que les produits secondaires de la peroxydation des lipides qui entraîneront des pathologies cardiovasculaires et inflammatoires [211].

Étant donné que ce paramètre est utilisé pour évaluer la stabilité oxydative d'une huile et détecter son rancissement, on peut déduire que l'HAA a une durée de conservation plus longue.

La présence de quantités élevées d'hydroxyde provoque la formation de diènes conjugués et triènes avec une longueur d'onde d'absorption comprise entre 230–234 nm et 265–270 nm [212]. Des mesures spectrophotométriques ont été effectuées afin de déterminer l'absorbance de l'HAA dissoute dans le cyclohexane à 232 et 270 nm.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 3.2 la valeur initiale de K₂₃₂ est relativement faible (2,612). Cette mesure reflète l'absence de formation de produits primaires d'oxydation dans l'HAA, tandis que la valeur de K₂₇₀, est égale à 0,39. Cette

dernière indique que l'HAA contient un faible pourcentage de composés carbonylés aldéhydiques.

L'augmentation de l'absorption à 270 nm peut être liée à la présence de produits d'oxydation secondaires [212].

L'analyse des paramètres physicochimiques de l'HAA nous a permis de la classer comme une huile vierge, stable, non siccative et de bonne qualité nutritionnelle.

Les différences trouvées dans les caractéristiques physicochimiques de l'huile testée et celles citées dans la littérature peuvent être expliquées par la variation de divers facteurs génétiques, agronomiques, climatiques et certaines conditions de stockage [212, 213,197].

3.2.2.1. Composition en acides gras de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara*

La composition des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) est un facteur important, du fait que les propriétés physiques, chimiques et nutritionnelles des huiles végétales sont fortement influencées par les types et les proportions relatives des acides gras et de leur position sur la fraction glycérol [213].

L'analyse de l'HAA par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier différents types d'acides gras avec des proportions variables. Le profil en acides gras de l'huile étudiée est présenté dans le **tableau 3.2.**

Tableau 3.2. Profil en acides gras de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara*

Acidesgras	(%)
C13:0	2.07
C14:0	0.95
C15:0	0.88
C16:0	7.01
C16:1	0.93
C18:0	3.25
C18:1	68.27
C18:2	16.14
Σ AGS	14.16
Σ AGMI	69.10
Σ AGPI	16.14
Σ AGU	85.84

C13: acide tridecanoïque; C14 :acide myristique ;C15:acide pentadécyclique ;C16:0 acide hexadécanoïque ou acide palmitique ; C16:1 Cis-9-hexadécenoïque or acide palmitoléique; C18:0 octadécanoïque ou acide stéarique; C18:1n – 9 Cis-9-octadécenoïque ou acide oléique; C18:2 Cis-9,Cis-12octadécadiénoïque ou acide linoléique

Sur la base des résultats enregistrés dans le tableau 3.3, on observe que cette huile contient majoritairement des acides gras mono-insaturés (69.10 %), des acides gras polyinsaturés (16.14 %) et une faible quantité d'acides gras saturés (14.16 %).

Huit acides gras différents ont été mis en évidence dans l'HAA, avec une prédominance de deux acides : l'acide oléique (C18:1, 68,27%), et linoléique (C18:2,16,14 %),suivi par l'acide palmitique (C16, 7,01 %),tous ensembles représentent plus de 91,42 % des acides gras totaux. Les acides tridécanoïque, myristique, stéarique, pentadécyclique et palmitoléique constituent 8,08 % des acides gras totaux.

Le rapport des acides gras polyinsaturés/saturés (P/S) de l'HAA est de 5,30, ce qui est un facteur important pour l'évaluation de la qualité des huiles et des graisses. Lorsqu'il est supérieur à 1, c'est la valeur nutritionnelle des huiles alimentaires de haute qualité pour la santé humaine [214].

La teneur en acides gras caractérisant notre huile est proche de celles de certaines huiles du genre *Prunus* précédemment étudiées **CHAMLI et al.** [215]; **RAPOSELLI et al.** [216]; **OZCAN, MATTHAUS et al.** [75], dans lesquelles il a été constaté que les acides oléique et linoléique sont majoritaires.

Actuellement, les nutritionnistes suggèrent fortement de compléter les régimes alimentaires avec des huiles végétales en raison de leur teneur élevée en AGMI et AGPI [217]. Les huiles végétales peuvent fournir des acides gras alimentaires importants comme les acides gras ω -3, ω -6 et ω -9. Ces derniers sont essentiels, et jouent un rôle crucial dans la croissance cellulaire. En effet, les acides gras ω -3 et ω -6 sont connus pour leur capacité à réduire les facteurs de risque de certaines maladies, notamment le cancer, l'arthrite, et le diabète [218].

L'acide oléique (ω -9) considéré comme un composé majoritaire dans l'HAA, joue un rôle important dans la réduction du risque d'infarctus cardiaque, en raison de sa capacité à faire baisser le taux de cholestérol, et de son efficacité de prévention contre le cancer [219].

L'acide linoléique (C18 :2 ; ω 6) est un acide qui ne peut être synthétisé par les cellules animales, pour lesquelles il doit être importé de manière exogène [220]. A cet égard, l'huile testée pourrait être une bonne source de cet acide. De plus, des avantages potentiels de l'acide linoléique sur la santé ont été rapportés, tels que : des effets cardio-protecteurs, une modulation de la réponse inflammatoire et un effet positif sur la fonction et le comportement du système nerveux central [220].

Compte tenu de la valeur nutritionnelle des acides gras essentiels trouvés dans l'HAA, cette huile peut être proposée comme un ingrédient alimentaire en fournissant ces composés au corps humain.

3.2.2.2. Teneur en tocophérols

Les tocophérols se sont des antioxydants lipophiles naturels classés en quatre isomères α , β , γ et δ . Les huiles végétales sont naturellement riches en ces composés. Ils les protègent contre l'oxydation [221]. Le tableau 3.3 révèle la teneur en tocophérol de l'HAA obtenue par pression à froid. Le profil chromatographique de l'HAA et les standards sont affichés dans l'**appendice B**.

Tableau 3.3.Teneur en tocophérols de l'HAA

Composé	(mg/kg d'huile)	(%)
α-Tocopherol	81.869 ±0.15	95.73
β-Tocopherol	Nd	Nd
γ -Tocopherol	3.645±0.01	4.26
Total Tocopherols	85.515±0.02	100

Les valeurs ont été exprimées en moyennes ± SD (n=3), nd :non détecté

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.4, une valeur significative (85,515 mg/kg) de la teneur totale en tocophérols a été détectée dans l'HAA. Deux types d'homologues ont été identifiés dans cette huile. L'α-tocophérol est le principal tocophérol avec une valeur de (81,869 mg/kg), ce qui représente plus de 95 % de la teneur totale en tocophérols.

D'autre part, le γ -Tocophérol qui est l'isomère minoritaire avec une valeur de 3,645 mg/kg, représente seulement 4% de la teneur totale en tocophérols. Cependant, l'isomère β-tocophérol est non détectée dans cette huile.

Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **FERNANDES et al. [97]** qui ont rapporté que la teneur en α-tocophérol est de 97,3 mg/kg et 2,8 mg/kg pour γ Tocophérol issu de graines d'amandes amères cultivées au Brésil.

D'autres études rapportées par **ÇELIK et al. [59]** ont montré que les valeurs de la teneur en tocophérols totaux variaient de 0,00 à 119,18 % des huiles provenant de 71 variétés d'amandes cultivés en Turquie. De même, **OZCAN, MATTHAUS, et al. [75]** ont rapporté une teneur totale en tocophérols variant de 47,42 à 80,15 mg/kg à partir de 31 génotypes d'huile d'amande de Turquie.

De nombreuses recherches ont examiné la teneur en tocophérols de différents génotypes d'amandes et ont montré qu'elle dépendait principalement de la variété **[222-224]**

OZCAN et al. [57] ont noté que le contenu tocophérolique des huiles d'amandes est fortement influencé par les techniques d'extraction, les facteurs et les conditions analytiques **[225,226]**.

Par ailleurs , une étude récente menée par **EL BERNOUSSI et al. [227]** portant sur l'effet des conditions de stockage sur la qualité des huiles d'amandes amères et

douces, a révélé que les tocophérols présents dans l'HAA étaient plus susceptibles de se dégrader que ceux de l'huile d'amande douce, leur concentration diminuait avec le temps. Du point de vue des caractéristiques biologiques, la réduction de la concentration en tocophérols affecte principalement la qualité de l'huile.

En ce qui concerne la teneur en tocophérols, nos résultats confirment que l'HAA est une source naturelle prometteuse d' α -tocophérol en comparaison avec les autres cultivars de différentes d'espèces.

3.2.2.3. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux

Les polyphénols sont des composés naturels et métabolites secondaires des plantes, majoritairement produits en réponse à un état de stress important. Ils protègent les plantes contre les facteurs de stress biotiques et abiotiques [228].

Outre leur rôle bénéfique sur les plantes, les composés phénoliques présentent une série de propriétés biologiques favorisant la santé humaine, notamment des effets anticancer, anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-oxydant, antimicrobien et photo-protecteur [228]. Pour cette raison la détermination des polyphénols totaux a été effectuée dans la présente étude.

La mesure de la teneur en polyphénols totaux présents dans l'huile de graines de *P.amygdalus var.amara* a été déterminée par la méthode du Folin-ciocalteu en utilisant une courbe d'étalonnage de l'acide gallique à différentes concentration **(Appendice C)**

Les résultats sont consignés dans le tableau 3.4, ils sont exprimés en μg d'équivalent d'acide gallique /ml d'extrait.

Tableau 3.4. Teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux de l'huile des graines de *P.amygdalusvar amara*

Extrait	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mL}$)
HAA	21.94 \pm 0.29	21.52 \pm 0.14

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD (n=3).

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en μg équivalent d'acide gallique /ml d'extrait. ($\mu\text{g EAG/mL}$)

La teneur en flavonoïdes est exprimée en μg équivalent quercitrine /ml d'extrait ($\mu\text{g EQ/mL}$)

D'après les résultats obtenus (**Tableau 3.5**), on remarque d'une part, que la teneur en composés phénoliques de l'huile extraite est moyennement faible et égale à 21,94 μg équivalent acide gallique/ml, d'autre part, la teneur en flavonoïdes totaux exprimés en μg d'équivalent de quercitrine /ml est égale à 21.52 \pm 0.14 $\mu\text{g EQ /ml}$ d'extrait.

Nos résultats montrent que l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* contient une faible quantité en composés phénoliques, qui sont principalement des flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par **ZAHEDI et al. [229]**, dont la teneur en polyphénols totaux varie entre 5 et 20 μg d'EAG/ml pour 10 génotypes d'amande sauvage Iranien.

En outre, nos résultats ne diffèrent pas de ceux publiés par **KESER et al. [209]**, qui ont trouvé que la teneur en flavonoïdes totaux est égale à 22,98 μg de catéchine/mg d'un extrait méthanolique des graines d'amande amère de Turquie.

De plus, nos résultats sont similaires à plusieurs huiles du genre *prunus* obtenues par la méthode de pression à froid notamment huile de *P.serotina* (21.54 \pm 3.34 μg d'EAG/ml) et huile de graines de *P.padus* (27.39 \pm 3.81 $\mu\text{g EQG/ml}$) [**230**].

Cependant, nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par **OZCAN et al. [57]**, qui ont constaté que la teneur en polyphénols totaux de l'HAA obtenue par la méthode d'extraction assistée par ultrasons varie de 15,80 \pm 0,01 à 17,60 \pm 0,01 $\mu\text{g d'EAG/ml}$ dans 31 génotypes cultivés en Turquie. Cette variation peut être attribuée aux nombreux facteurs influençant leur concentration dans l'huile, tels que : le type de cultivar, le système d'extraction et les conditions de transformation et de stockage qui sont généralement les facteurs critiques affectant le contenu final des composés phénoliques des huiles [**231**].

ZEB. [232] a signalé que la teneur en composés phénoliques des huiles dépend majoritairement des techniques d'extraction utilisées.

En effet, il a constaté que la teneur en polyphénols totaux étaient plus élevées dans les huiles de graines de colza, de soja et de tournesol pressées à froid que dans leurs huiles lorsqu'elles sont extraites par Soxhlet.

D'autres facteurs aussi peuvent affecter le contenu phénolique comme la culture, le moment de la récolte, le type de sol et la taille des oléagineux. Ce dernier facteur a été traité par **LEE et al. [233]** qui ont montré que les grosses graines de soja contiennent moins de composés phénoliques que les graines de tailles moyenne et petite.

En outre, **MAESTRI et al. [77]** ont noté que les noyaux d'amandes et les téguments sont plus riches en composés phénoliques comparés aux huiles. Ils ont prouvé que la teneur faible en polyphénols des huiles, est due à leur faible solubilité dans ces derniers, c'est la raison pour laquelle une quantité minime en ces composés a été détectée dans notre échantillon.

3.3. Activités biologiques de l'huile d'amande amère

3.3.1. Activité antimicrobienne

L'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, sur des souches microbiennes. Au total 2 bactéries Gram positives, et 2 Gram négatives, 4 levures, 2 moisissures, et 2 dermatophytes ont été testés dans cette étude.

Les tableaux 3.5 et 3.6 et les figures 3.1 et 3.2 montrent l'effet antimicrobien avec les diamètres des zones d'inhibition de l'huile étudiée.

3.3.1.1. Activité antibactérienne de l'huile d'amande amère

Tableau 3.5. Diamètre de zone d'inhibition (mm) de l'HAA vis-à-vis des souches bactériennes

Concentration	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			Antibiogramme					
	20µl	40µl	60µl	CN	FOX	TE	Ox	Cip	AMP
Souches bactériennes									
Bactéries à gram+									
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25 923	11	13	14	23	25	26	15	20	13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11	12	15	30	25	30	15	29	14
Bactéries à gram-									
<i>E.coli</i> ATCC 25 922	12	14	23	23	21	20	-	30	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	9	9	9	15	-	-	-	-	-

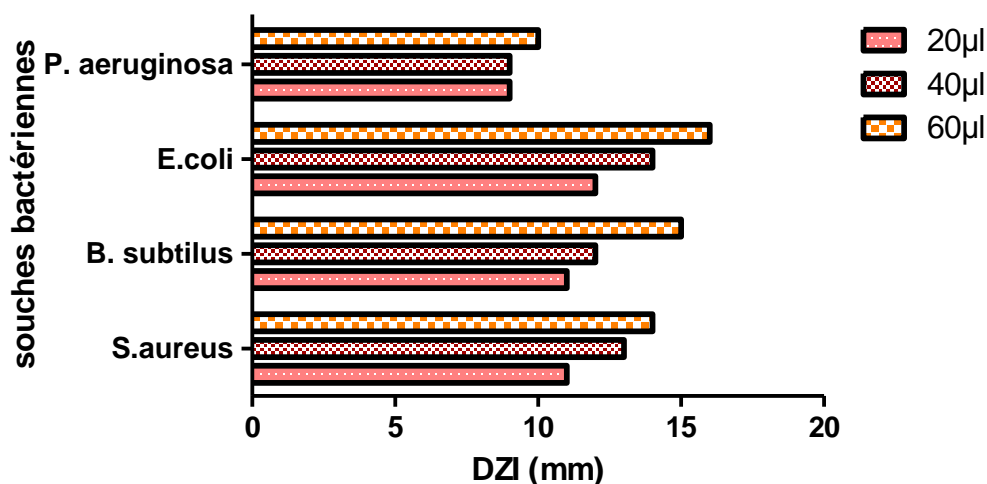


Figure 3.1. Effet dose –dépendant de l'activité antibactérienne de l'HAA.

Les résultats présentés dans le tableau 3.6 et la figure 3.1 montrent que l'extrait de l'huile des graines d'amande amère a un effet variable sur les différentes souches bactériennes testées. L'activité inhibitrice de l'HAA a été évaluée à différentes concentrations allant de 20 µl jusqu'à 60 µl. Parmi les quatre souches testées, *E. coli* est la plus sensible, où le diamètre de zone d'inhibition varie entre 12 et 23 mm (**Figure 3.2**), suivie par la souche *Bacillus subtilis*, pour laquelle le diamètre de zone d'inhibition est égal à 15 mm à 60µl de l'HAA.

Cependant, la souche *Pseudomonas aereginosa* n'a montré aucune sensibilité envers l'huile testée, dans laquelle aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les 3 doses utilisées. Quant à la souche *S. aureus*, elle a montré une sensibilité relativement moyenne par rapport aux autres souches, où le diamètre de zone d'inhibition n'excède pas 14 mm à une concentration élevée de HAA (60µl).

Par ailleurs, toutes les souches testées ont présenté une action antibactérienne à effet dose-dépendant. En effet, aucune action inhibitrice spécifique n'a été observée contre les bactéries Gram-négatives ou Gram+ positives mises en expérimentation.

Concernant, les résultats de l'antibiogramme, la majorité des souches testées se sont avérées sensibles et très actives vis-à-vis des antibiotiques, où le diamètre de la zone d'inhibition atteint 30 mm. Néanmoins, certaines souches comme

P.aeruginosa a montré une résistance totale vis-à-vis les ATB de large spectre comme la tétracycline.

De plus, nous avons remarqué que certaines souches notamment *E. coli* qui est la plus sensible vis-à-vis l'action de l'HAA, a manifesté une résistance totale vis-à-vis de certains antibiotiques tels que oxacilline et ampicilline (**Figure 3.2**).

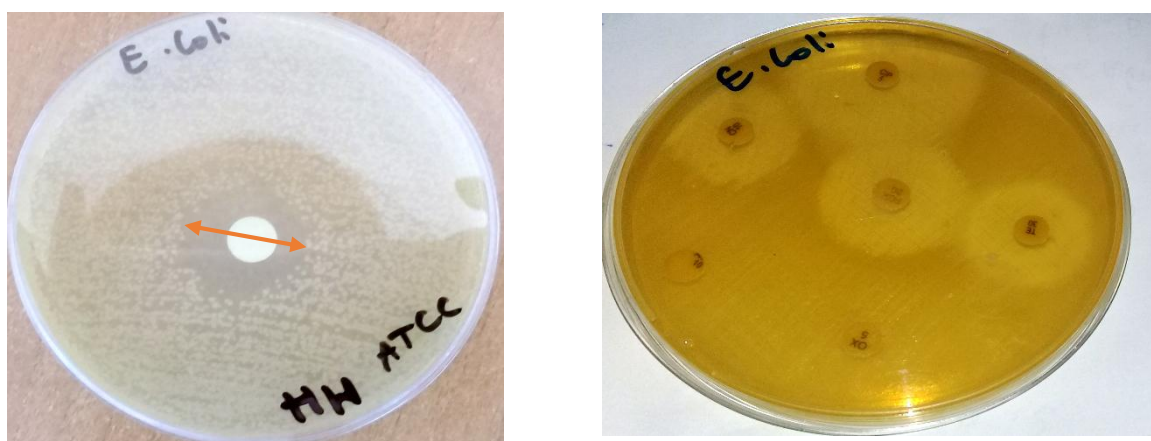


Figure 3.2. Diamètre de zone d'inhibition de la souche *E.coli* sous l'action de l'huile d'amande amère et les ATB.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures qui ont révélé la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits de *P.amygdalus*, citons l'étude de **MORADI et al. [27]** dans laquelle ils ont mis en exergue la sensibilité des extraits méthanolique, aqueux et éthanolique de l'amande amère vis-à-vis 3 souches *S.aureus*, *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhi* et ont trouvé que la CMI varie entre 0.625 mg/ml et 10mg/ml.

KUMARI. [234] a mené une étude où il a testé l'activité antibactérienne de l'huile de graines de *P.amygdalus var.amara* originaire de l'Inde, il a trouvé que les souches *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *S.aureus* étaient sensibles vis-à-vis de cette huile, le diamètre de zone d'inhibition varie de 14 à 20 mm. Ces résultats corroborent parfaitement avec les nôtres.

Par ailleurs, **BADALAMENTI et al. [235]**, indiquent que l'extrait n-hexane de graines de *P.amygdalus* montre un effet antibactérien remarquable envers les souches gram+ et

gram -, ce qui est en accord avec nos résultats, qui ne montrent aucune différence dans l'inhibition de la croissance bactérienne entre les gram+ et les gram-.

Toutefois, **FRATIANNI et al. [21]** ont signalé que les souches *P.aeruginosa* ATCC et *S. aureus* ATCC 25923 étaient les plus sensibles envers 5 huiles pressées à froid à partir des graines du genre *prunus* d'Italie et montrent des CMI qui varient entre 30 et 22.5µg/ml, et entre 27 et 22µg/ml respectivement. L'huile testée dans cette étude s'est avérée moins efficace voire nulle contre ces souches.

Ces variations peuvent s'expliquer par des différences de génotype, de l'environnement et le temps de récolte des plantes **[236]**.

L'huile des graines de *P. amygdalus var. amara* a démontré une efficacité remarquable sur les 4 souches testées. Cependant, il n'existe aucune donnée d'études scientifiques sur l'activité antimicrobienne de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* cultivée en Algérie, il s'agit donc d'un premier résultat rapporté sur cette l'huile.

Les mécanismes d'action de l'activité antibactérienne des huiles végétales peuvent être multiples et dépendent probablement de chaque micro-organisme. Plusieurs études ont attribué l'effet inhibiteur des huiles contre les germes bactériens à leur composition en acide gras **[237]**.

L'activité antibactérienne des acides gras peut être attribuée aux propriétés détergentes de ces molécules, contre l'effet amphipathique de de la structure de la membrane cellulaire bactérienne **[238]**.

Les acides gras à capacité détergente vont solubiliser les composants de la membrane (lipides et protéines) en provoquant des coupures, ils vont ainsi affecter le métabolisme et les processus essentiels pour obtenir l'énergie nécessaire à la cellule bactérienne, notamment dans la chaîne de transport d'électron et la phosphorylation oxydative **[239]**.

Ces dommages membranaires peuvent également entraîner des difficultés d'absorption des nutriments, inhibition de l'activité enzymatique et la génération de substances toxiques par peroxydation **[240]**. Par conséquent, on suppose que cet effet oxydant pourrait jouer éventuellement un rôle important dans la fonction antimicrobienne des acides gras qui sont les composés majoritaires de la plupart des huiles végétales **[240]**.

D'autre part, des études antérieures ont attribués les effets bactéricides des huiles végétales sur les bactéries aux polyphénols et flavonoïdes, qui sont connus pour se produire à travers de nombreux mécanismes d'action, soit en inhibant la biosynthèse des acides nucléiques bactériens, soit par l'intermédiaire de différents processus moléculaires [241,242]. Les composés phénoliques présentent généralement des effets antimicrobiens au niveau membranaire.

A titre d'exemple, le phénol modifie les fonctions membranaires de la cellule en influençant la teneur en graisses protéiques et favorisant la sortie des ions potassium. Il affecte également la couche lipidique, en provoquant la désintégration de la membrane entraînant ainsi la mort cellulaire [243]. En général il existe une forte corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antibactérienne.

Les bactéries à gram- telles que *P.aeruginosa* sont généralement les germes les plus résistants aux huiles de graines. Il a été suggéré que la résistance de cette souche est due à la structure épaisse de sa paroi cellulaire qui la rend imperméable à l'acide oléique entraînant la diminution des effets antibactériens de cet acide au niveau de la membrane cellulaire, ce qui explique par la suite l'inefficacité de l'HAA vis-à-vis de cette souche [244].

Les résultats obtenus dans cette étude montrent l'importance du pouvoir antibactérien de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* contre différents germes de gram positif et négatif, ce qui permettrait de l'incorporer comme matière première dans des préparations pharmaceutiques ou cosmétiques.

3.3.1.2. Activité antifongique de l'huile d'amande amère

Tableau 3.6. Diamètre de zone d'inhibition de l'huile des graines *P.amygdalus var. amara* sur les différentes souches fongiques.

Concentration	Diamètre de zone d'inhibition (mm)			Fluconazole(25µg)
	20µl	40µl	60µl	
Souches fongiques				
Levures				
<i>C.albicans</i>	10.66±0.5 7	12.5±0.5	13.23±0.2 5	10
<i>C.glabrata</i>	10.76±0.6 8	12.36±0.4 0	13.30±0.3 0	14
<i>C.tropicalis</i>	11.16±0.2 8	12.16±0.2 0	14.03±0.1 5	15
<i>Sacharomycescerevicea</i>	9±0.0	9±0.0	9±0.0	14
Moisissures				
<i>Aspergillus niger</i>	9±0.0	9±0.0	9±0.0	13
<i>Aspergillus terreus</i>	9.03±0.05	9.1±0.01	9.1±0.15	11
Dermatophytes				
<i>Trychophytonmentagrophytes</i>	12.1±0.26	13.86±0.1 5	14.96±0.1 5	9
<i>Microsporumcanis</i>	12.3±0.36	13.96±0.2 0	15.06±0.2 0	9

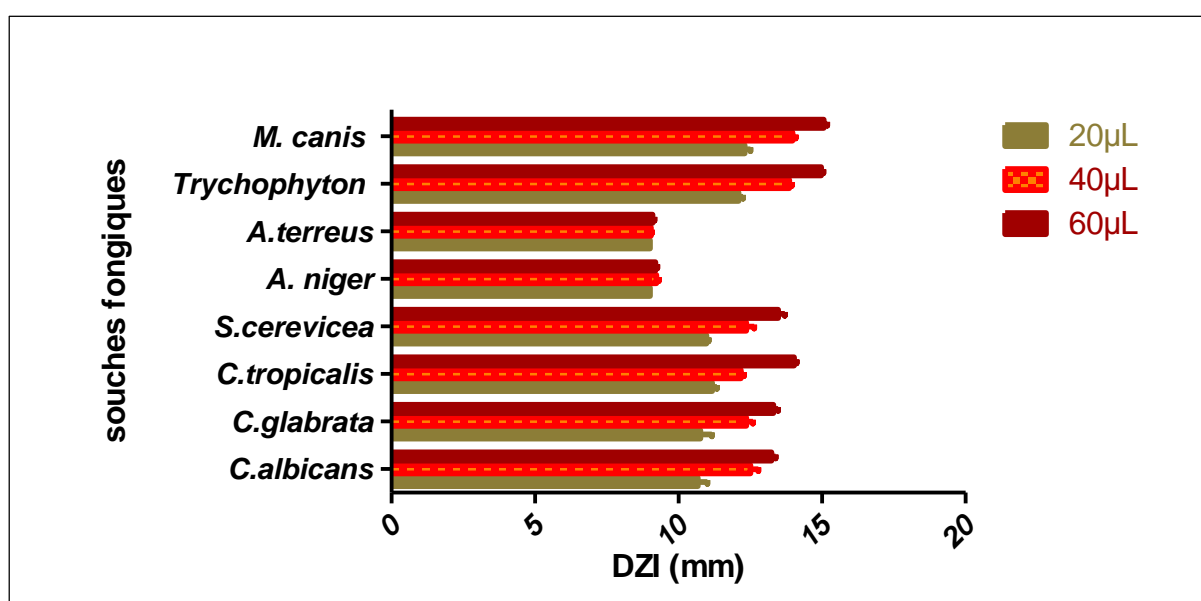


Figure 3.3. Action anti fongique (dose –dépendante) de l'HAA

Les résultats présentés dans le tableau 3.7 et la figure 3.3 montrent que l'extrait de l'huile de graines d'amande amère a un effet variable sur les différentes souches fongiques testées. L'activité inhibitrice de l'HAA a été évaluée dans différentes concentrations allant de 20 μ l jusqu'à 60 μ l. Parmi les 4 levures testées, *C.tropicalis* est la plus sensible, avec un diamètre de zone d'inhibition variant entre 11 et 14 mm, suivie par la souche *C.glabrata* dont le DZI est égal à 13.30 mm à 60 μ l de HAA (**Figure 3.4**). Cependant, la souche *C.albicans* a montré une sensibilité moyenne par rapport aux autres levures testées, avec un diamètre de la zone d'inhibition dans la limite de 13.23 mm à forte concentration d'HAA (60 μ l).

La souche *Saccharomyces cerevisiae* a manifesté une certaine résistance vis-à-vis de l'huile testée, pour laquelle aucune zone d'inhibition n'a été observée (DZI= 9 mm).

De même, les moisissures testées (*A.niger* et *A.terreus*) ont développé une résistance totale vis-à-vis l'huile, en montrant des DZI qui ne dépassent pas 9.1mm.

Cependant, l'extrait de l'HAA a montré une meilleure activité vis-à-vis des 2 dermatophytes testées, pour lesquelles le diamètre de la zone d'inhibition atteint 15.06 mm avec *Microsporom canis* (**Figure 3.4**)

Par ailleurs, les résultats illustrés dans la figure 10 montrent que l'HAA a un effet antifongique dose-dépendant.

Afin de mener une étude comparative avec notre huile, nous avons utilisé un antifongique de synthèse qui est le fluconazole à 25 μ g comme témoin positif. Les résultats sont illustrés dans le **tableau.3.6**

D'après les résultats obtenus, on constate une variation dans la sensibilité des souches envers le fluconazole. Ainsi, les levures montrent une sensibilité avec un diamètre de zone d'inhibition allant de 10 à 15 mm, suivies par les moisissures modérément sensibles montrant un DZI de 13 et 11mm.

Cependant, les souches dermatophytes sensibles à l'action de l'HAA, ont été les plus résistantes face au fluconazole, avec un diamètre de la zone d'inhibition de 9 mm.

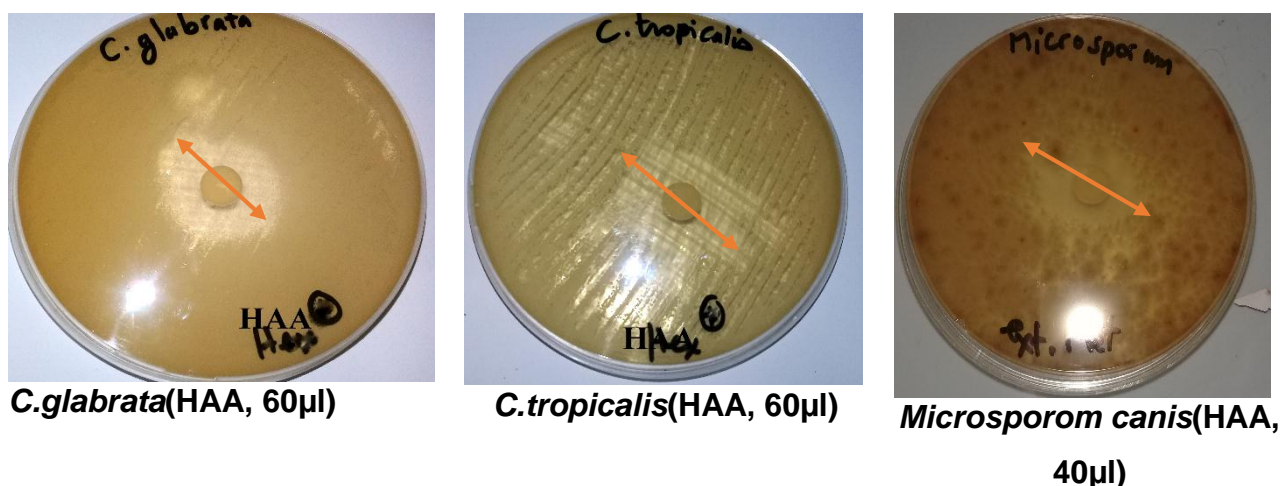


Figure 3.4. Diamètre de zone d'inhibition de quelques souches fongiques.

Selon les résultats observés dans cette étude, on remarque que l'HAA a un potentiel antifongique appréciable, particulièrement sur les levures et les dermatophytes. Néanmoins les moisissures se sont avérées plus résistantes ainsi, l'huile ne montre pas d'action fongicide.

RAMADAN et al. [245] ont évalué l'effet de l'huile de nigelle sur deux levures et deux moisissures. Ils ont observé que cette huile est plus efficace sur les levures, avec un DZI allant de 21 à 23mm pour les souches *C.albicans* et *Saccharomyces cereviciae* respectivement, tandis que les souches *A.niger* et *A.flavus* n'ont montré aucune sensibilité envers l'huile de nigelle pressée à froid, ce qui est en accord avec nos résultats.

D'autre part, dans une étude menée par **YASSIN IBRAHIM et al.[246]** sur 26 huiles végétales testées contre quatre dermatophytes kératinophiles (*Microsporom canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes*), les résultats obtenus ont montré que parmi ces huiles, l'huile de *P.amygdalus var amara* et l'huile de *P.armenica* à des concentrations de 100µg/ml ont révélé une efficacité remarquable contre ces pathogènes avec un indice antifongique égal à 90% et 100% respectivement. Ce qui corrobore avec nos résultats.

Les dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes* et *Microsporom canis* testés dans cette étude sont couramment associés à des infections fongiques superficielles, qui affectent la peau [247]. Ils provoquent des maladies difficilement contrôlables. L'arsenal pharmaceutique actuellement disponible pour lutter contre ces maladies est

limité. Les huiles végétales sont considérées comme des composés non toxiques et ont des propriétés antimicrobiennes et anti-dermatophytes [248]. Par ailleurs, elles peuvent être utilisées comme une thérapie naturelle pour inhiber les agents pathogènes fongiques responsables des mycoses superficielles [249]. Cependant, il existe peu d'informations dans la littérature sur l'activité antifongique des huiles végétales envers les pathogènes fongiques humains [246].

Traditionnellement, l'HAA est largement utilisée pour maintenir l'élasticité de la peau, traiter les problèmes de peau sèche tels que le psoriasis et l'eczéma, et pour soigner les cheveux [250]. Elle est également utilisée comme émoullissant et émulsifiant dans les produits cosmétiques pour les applications topiques sur les humains [250].

Il a été suggéré que les acides phénoliques sont généralement les composés antimicrobiens actifs des huiles végétales, ils attaquent les agents pathogènes à travers la paroi cellulaire [251].

Les résultats de notre étude mettent en valeur le grand potentiel antifongique de l'HAA qui peut être ainsi utilisé comme un ingrédient efficace dans les formulations dermo-cosmétiques et pharmaceutiques afin de protéger la peau et les cheveux contre les infections fongiques provoquées par les levures et les dermatophytes.

3.3.2. Activité anti-oxydante de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara*

Il existe actuellement un grand intérêt pour le développement de nouvelles molécules anti-oxydantes à des fins pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. Les extraits de plantes ayant une action anti-oxydante peuvent agir par différents mécanismes, notamment le piégeage des radicaux libres, la réduction des ions et l'inhibition de la peroxydation lipidique [58].

Par conséquent, l'utilisation de différentes méthodes basées sur de multiples réactions chimiques est nécessaire pour mesurer cette activité anti-oxydante [59].

Dans la présente étude les tests DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC et blanchiment du β -carotène ont été utilisés pour évaluer l'activité anti-oxydante de l'HAA. Les résultats sont illustrés dans le tableau 3.8, et sont exprimés comme des CI_{50} (les concentrations qui piègent 50% des radicaux libres ou concentrations inhibitrices) et $A_{0,5}$ de l'huile testée .

Afin de réaliser une étude comparative plusieurs molécules standards ont été utilisées : BHT, BHA, α -tocophérol et l'acide ascorbique.

Tableau 3.7.Activité anti-oxydante de l'huile des graines *P.amygdalus var. amara* par différentes méthodes

	DPPH Cl₅₀(μg/ml)	ABTS Cl₅₀ (μg/ml)	FRAP A_{0.5} (μg/ml)	CUPRAC A_{0.5} (μg/ml)	β-Carotène Cl₅₀ (μg/ml)
HAA	595.35 \pm 5.72	637.39 \pm 3.29	>800	34.77 \pm 0.44	165.73 \pm 34.96
BHA	6.14 \pm 0.41	1.29 \pm 0.30	7.99 \pm 0.87	5.35 \pm 0.71	0.91 \pm 0.01
BHT	12.99 \pm 0.41	1.81 \pm 0.10	61.67 \pm 0.40	8.97 \pm 3.94	1.05 \pm 0.03
α-Tocopherol	13.02 \pm 5.17	7.59 \pm 0.53	34.93 \pm 2.38	19.92 \pm 1.46	1.79 \pm 0.03

3.3.2.1. Test de l'activité anti-radicalaire DPPH• (2.2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

La capacité anti-radicalaire de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* et les molécules de références a été évaluée par le piégeage du radical DPPH. Les résultats de la cinétique de l'inhibition du radical DPPH par l'HAA sont illustrés par la figure 3.5

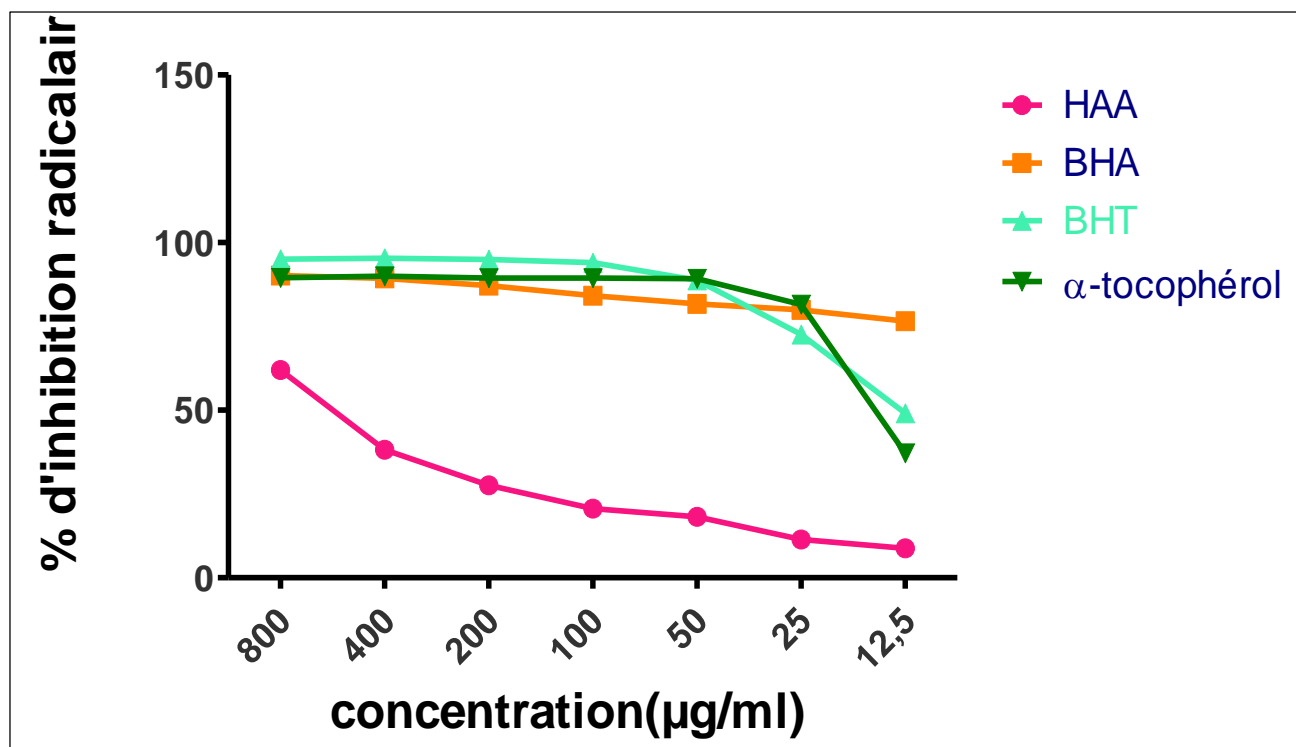


Figure 3.5. Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'huile des graines de *P. amygdalus var. amara* et les molécules standards (BHA, BHT et α -tocophérol) sur le radical DPPH

D'après les résultats de la figure 3.5, on remarque que l'effet antioxydant de l'huile testée augmente avec l'augmentation de sa concentration, ce qui montre que l'HAA exerce un effet antioxydant dose-dépendant. On observe aussi que l'huile des graines de *P. amygdalus var. amara* possède une activité antioxydante modérée contre le radical DPPH.

D'après le tableau 3.7, la valeur de la CI_{50} de l'HAA est de $594 \pm 5.72 \mu\text{g/ml}$. En comparant avec les standards utilisés (BHA, BHT et α -tocophérol), nos résultats sont significativement moins actifs, et dont les valeurs des CI_{50} sont respectivement de $6,14 \pm 0,41$, $12,99 \pm 0,41$, et $13,02 \pm 5,17$ pour le BHA, le BHT et l' α -tocophérol.

3.3.2.2. Test de décoloration du radical cation ABTS•+

La figure 3.6 montre les courbes des pourcentages d'inhibition de l'HAA et les standards en fonction de leurs concentrations

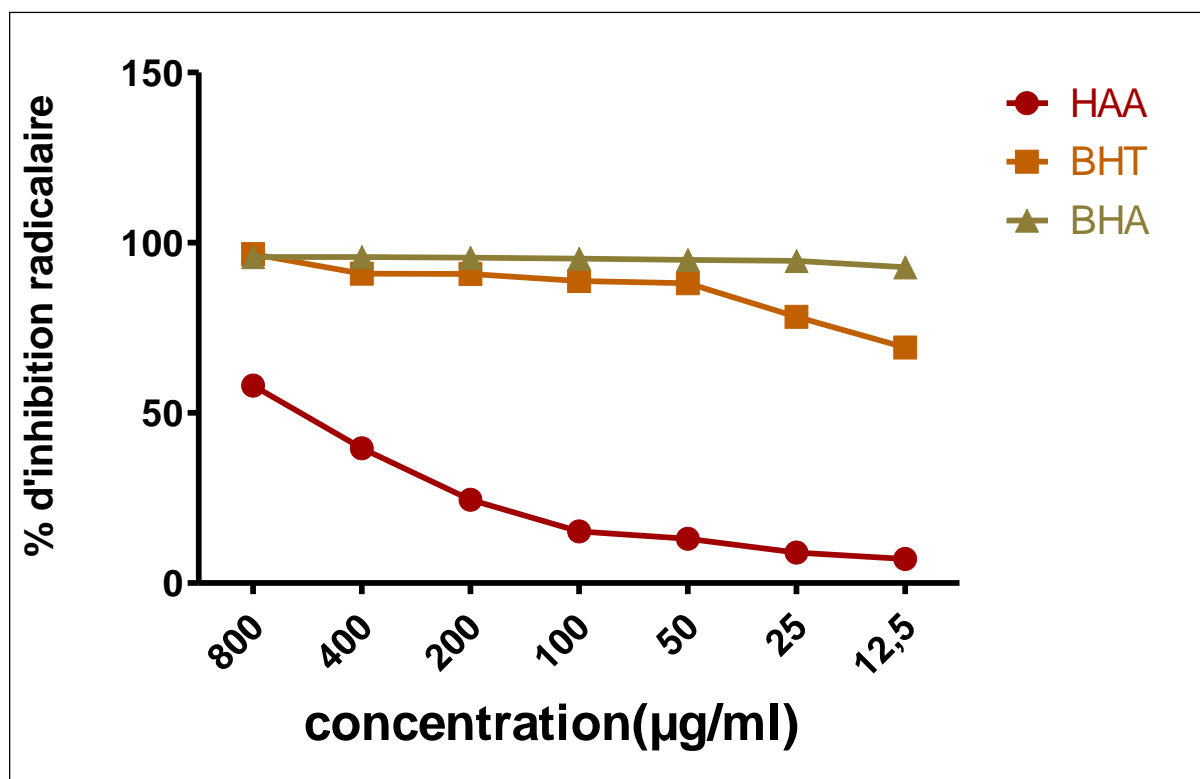


Figure 3.6. Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'huile des graines de *P. amygdalus var. amara* et les molécules standards (BHA et BHT) sur le radical ABTS

L'activité radicalaire a été également mesurée en utilisant le radical ABTS+. La figure 3.6 montre la cinétique de l'HAA et les standards utilisés pour piéger ce radical. D'après la figure 3.6, on constate que l'HAA a un effet antioxydant dose-dépendant par le test ABTS-+. Une diminution du pouvoir antioxydant est constatée avec la diminution des concentrations des standards et de l'huile testée. La capacité de piégeage des radicaux libres du BHT et du BHA à réduire le radical ABTS+, est apparue significativement plus puissante que celle de l'huile testée, dans laquelle la CI_{50} égale à $637,39 \pm 3,29$ µg/ml (**Tableau 3.8**).

3.3.2.3. Test de l'activité d'inhibition de la réduction cuprique (CUPRAC)

La capacité anti-oxydante réductrice cuivrique (CUPRAC) de l'HAA a été évaluée selon la méthode décrite par **APAK et al. [186]**. La figure 3.7 montre la cinétique de

l'inhibition de la réduction cuprique de l'HAA et les standards BHA et BHT à différentes concentrations.

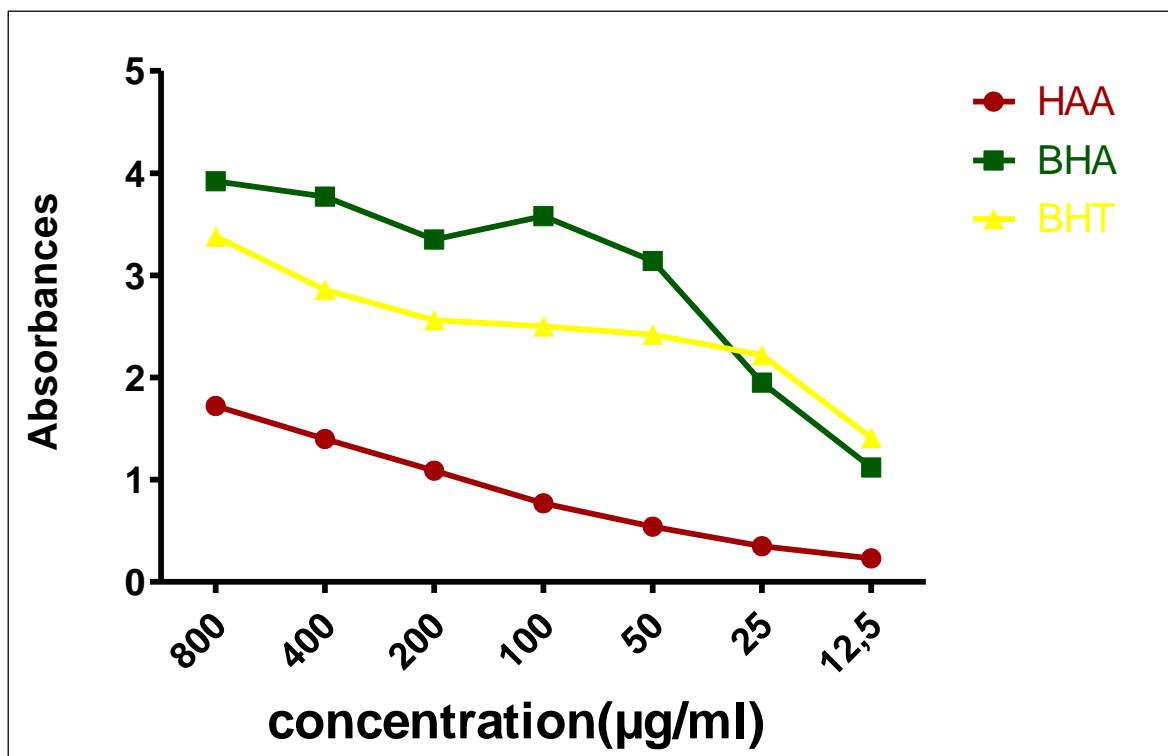


Figure 3.7. Cinétique de l'activité anti-oxydante de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* et les molécules standards (BHA et BHT) sur le CUPRAC

D'après les résultats présentés dans la figure 3.7, on remarque que l'HAA à forte concentration a enregistré une bonne activité réductrice cuivrique proche de celle obtenue par les standards BHA et BHT. On note aussi que le pouvoir réducteur de cette huile diminue avec la diminution de sa concentration.

Selon les résultats présentés dans le tableau 3.7, la valeur obtenue $A_{0.50}$ de l'HAA ($A_{0.50} = 34.77 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$) est relativement faible, très proche de celle du standard α -tocophérol ($A_{0.50} = 19.92 \pm 1.46 \mu\text{g/ml}$) mais dans les limites de celles des standards BHA et BHT ($A_{0.50} = 5.35 \pm 0.71$ et 8.97 ± 3.94 respectivement).

3.3.2.4. Test de l'activité réductrice ferrique de l'HAA

Le dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) est une méthode basée sur la mesure de la réaction de réduction du complexe ion ferrique (Fe^{3+}) au complexe ferreux (Fe^{2+}) par des antioxydants en milieu acide [252].

La figure 3.8 montre les résultats du pouvoir réducteur ferrique de l'HAA comparé à Deux standards.

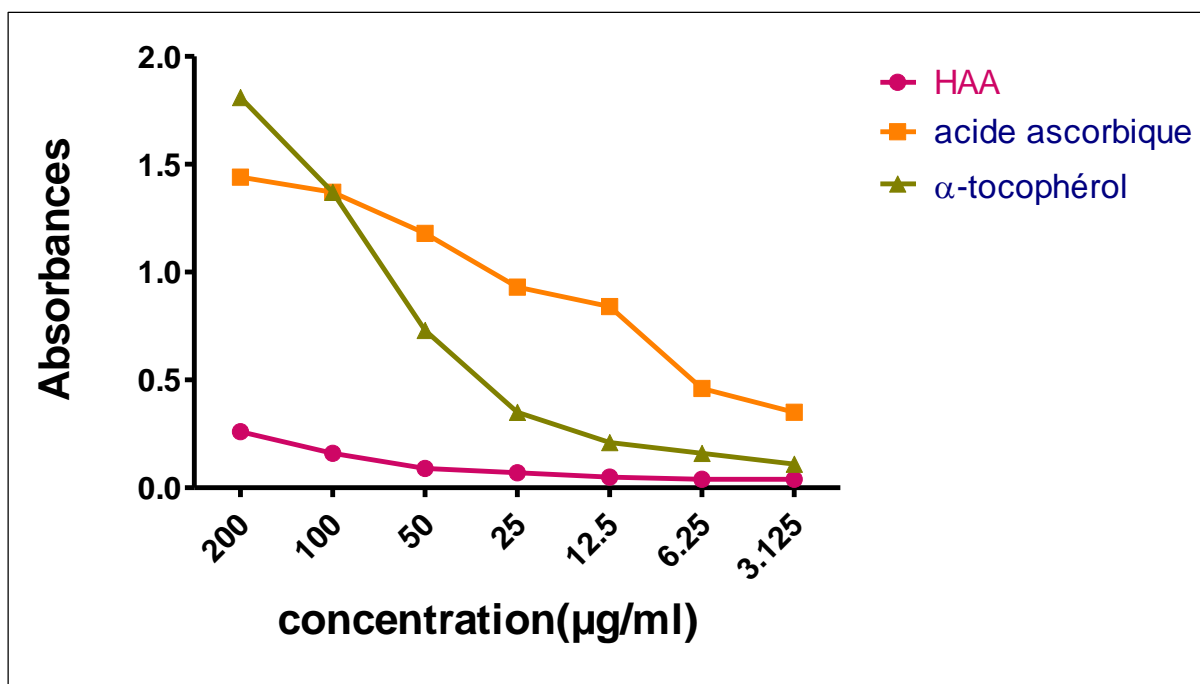


Figure.3.8. Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* et les molécules standards (acide ascorbique et α -tocophérol) sur FRAP

D'après la figure 3.8 et le tableau 3.8, on constate que l'HAA a un pouvoir réducteur du fer relativement très faible voire nul. On peut dire que cette huile n'a aucune activité à la concentration 200 µg/ml. Cependant, les standards utilisés montrent une meilleure activité réductrice du fer avec $A_{0.50}$ égale à 7.99 ± 0.87 , 67 ± 0.02 et $34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/ml}$ respectivement pour BHA, BHT, et α -tocophérol.

3.3.2.5. Test de blanchiment du β -carotène

Le test de blanchiment du β -carotène est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus couramment utilisées pour estimer l'activité anti-oxydante des émulsions huile/eau.

La figure 3.9 montre la cinétique de l'activité de l'HAA et les standards testés vis-à-vis le test de blanchiment du β -carotène.

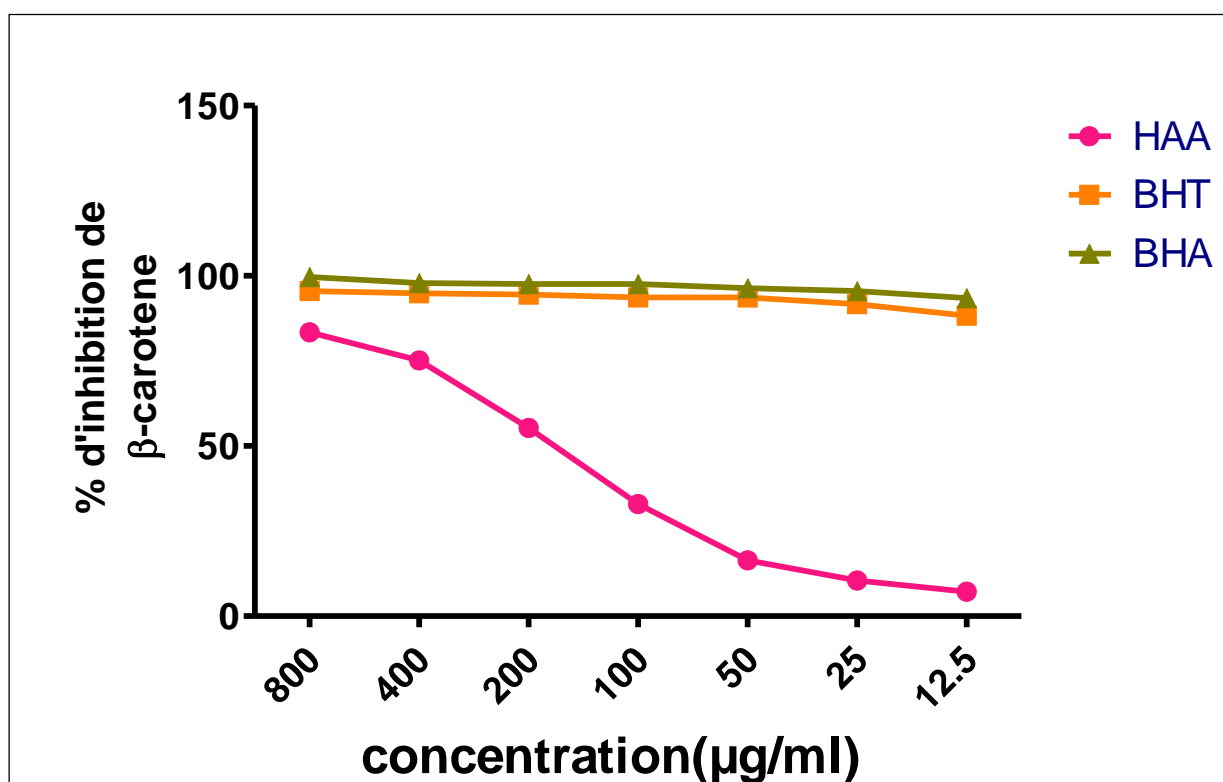


Figure 3.9. Cinétique de l'activité anti-radicalaire de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* et les molécules standards (BHA et BHT) sur le β -carotène.

Selon la figure 3.9, l'HAA à forte concentration (800 $\mu\text{g/ml}$) a révélé une très bonne activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition égal à 87%, comparativement très proche de celui des standards BHA et BHT, qui ont respectivement un pourcentage d'inhibition de 97% et 98%. La capacité antioxydante de l'HAA à travers le test de blanchiment du β -carotène est dose-dépendante.

En tenant compte des valeurs de la CI_{50} présentées dans le tableau 3.8, on note que l'HAA est moins active sur le β -carotène que les standards utilisés, avec une CI_{50} égale à $165,73 \pm 34,96 \mu\text{g/ml}$, considérée supérieure comparativement à celles du BHA, du BHT et de l' α -tocophérol, dont les CI_{50} sont égales à 0,90, 1,05 et 1,79 $\mu\text{g/ml}$, respectivement.

La mesure de l'activité antioxydante de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* par différentes méthodes complémentaires, a permis de montrer ,que cette

huile a un pouvoir antioxydant modéré, et qu'elle est généralement moins active par comparaison avec les standards utilisés.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une certaine variabilité des résultats du potentiel antioxydant de l'HAA en fonction du test utilisé.

En effet, l'HAA s'est avérée moins active lors des tests de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, et modérément active lors du test de blanchiment du β -carotène, très active face au test de réduction du cuivre mais totalement inactive dans le test de réduction ferrique. Cette variabilité des résultats peut être mise en relation avec la composition chimique de l'HAA.

La méthode de piégeage du radical DPPH est fréquemment utilisée pour mesurer la capacité antioxydante des huiles végétales, probablement en raison de sa simplicité, de sa stabilité et de sa fiabilité [253]. Cette réaction est caractérisée par une décoloration de ce radical du violet au jaune avec une diminution de son absorbance [254], alors que le test ABTS mesure l'inhibition du radical cationique, il est considéré comme étant plus efficace, que celui du DPPH, du fait qu'il permet de déterminer le caractère antioxydant des composants lipophiles et hydrophiles, grâce à sa solubilité dans l'eau et dans les solvants organiques [255].

Des résultats similaires ont été obtenus par **TELICHOWSKA et al.** [230] en testant des extraits méthanoliques de *P.serotina* et *P.padus* originaires de Pologne et dont les Cl_{50} étaient de 5.43, et 6.62 mg/ml, respectivement, par le test de piégeage DPPH. Contrairement, à nos résultats **OZCAN et al.** [75] indiquent un bon potentiel antioxydant à l'égard du radical DPPH de l'HAA de cultivars turcs, avec des Cl_{50} allant de 17.34 à 84.84 μ g/ml.

Dans le cas du test ABTS, une valeur de Cl_{50} inférieure à celle observée dans notre étude a été obtenue à partir d'un extrait méthanolique d'amande amère de Turquie, elle est égale à 83,49 μ g/ml [209].

En revanche, les travaux réalisés par **TELICHOWSKA et al.** [230] montrent que les extraits méthanoliques des graines de *P.serotina* et *P.padus* originaires de Pologne ont une très faible capacité à capter le radical ABTS, en affichant des valeurs de Cl_{50} de 8,55 et 9,65 mg/ml, considérées supérieures à celle mentionnée dans notre étude

Les ions métalliques sont principalement impliqués dans les réactions d'oxydation et la formation de ROS, leur réduction permet d'assurer une bonne stabilité oxydative. De ce fait, nous avons évalué le pouvoir réducteur de l'HAA vis-à-vis des ions

de cuivre et de fer. Nos résultats ne diffèrent pas de ceux rapportés **OLEIVERA et al.[256]** qui ont obtenus une bonne activité antioxydante par les méthodes DPPH, ABTS, FRAP et CUPRAC de six cultivars d'amandes provenant du Portugal, avec un pourcentage d'inhibition allant de $64,28 \pm 1,65$ à $90,58 \pm 2,1\%$ pour le test CUPRAC.

La capacité de l'HAA à inhiber la peroxydation lipidique a été mesurée à travers le test de blanchiment du β -carotène. Dans ce test, l'état oxydatif d'une émulsion composée de β -carotène, d'acide linoléique et de l'eau est mesuré par spectrophotométrie en absence et en présence de l'HV. Les radicaux libres générés par l'oxydation de l'acide linoléique dans l'émulsion entraînent une décoloration (blanchiment) du β -carotène, qui peut être suivie au cours du temps et mesurée à 470 nm. Les antioxydants peuvent réduire cette perte de coloration du β -carotène **[252]**.

La détermination de l'activité anti-oxydante d'une huile végétale est une étape nécessaire pour vérifier sa stabilité et sa durée de conservation. Les composés antioxydants naturels améliorent généralement la durée de conservation et la stabilité de l'huile **[257]**.

Compte tenu de la composition chimique de l'HAA, il a été signalé que les tocophérols sont les contributeurs majeurs de l'activité antioxydante des huiles riches en AGI, grâce à leur capacité à piéger les radicaux et à chélater les métaux **[252]**.

Par ailleurs, l'efficacité des tocophérols en tant qu'antioxydants dépend de leurs différents isomères et de leur concentration. L'activité de piégeage des radicaux libres la plus élevée a été obtenue par δ -tocophérol suivi par γ , β et α -tocophérols **[258]**.

L' α -tocophérol, l'isomère majoritaire de l'HAA a été signalé comme étant le réducteur de radicaux libres le plus efficace dans l'oxydation de l'huile par rapport aux autres tocophérols **[258]**.

Toutefois, des effets pro-oxydants peuvent se produire à des concentrations élevées de tocophérols **[259]**. Il a été démontré que le niveau optimal d' α -tocophérol dans une huile est de 100 mg/kg, tandis que le meilleur effet antioxydant de γ -tocophérol (l'isomère minoritaire de l'HAA) est obtenu à une concentration de 250-500 mg/kg d'huile et aucun effet pro-oxydant n'a été détecté pour cet isomère **[259]**.

D'autre part, il a été confirmé que les composés phénoliques peuvent agir comme des agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène et des chélateurs de métaux, ce qui

se traduit par leur pouvoir antioxydant. Dans de nombreuses études, les composés phénoliques sont responsables de la stabilité des huiles riches en AGPI pendant leur stockage [260].

En effet, de nombreuses études ont montré que les acides phénoliques peuvent être des antioxydants efficaces dans les huiles, individuellement ou à différentes proportions, ainsi que dans les mélanges avec les tocophérols, malgré leur faible solubilité dans la phase huileuse. De même, il a été constaté que les polyphénols agissent en synergie avec des concentrations adéquates de phytostérols et de tocophérols pour prévenir la progression de l'oxydation lipidique [261].

D'autre part, l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de la répartition des substitués hydroxyles dans les molécules qui peuvent libérer des atomes aux radicaux peroxyde. La grande efficacité de certains flavonoïdes végétaux de polarité intermédiaire, comme la quercétine, a été mise en évidence pour prévenir l'oxydation des huiles riches en AGPI ω -3 et ω -6 [261].

À des concentrations de 50-400 M, la quercétine exerce une efficacité similaire dans le piégeage des radicaux libres mais sa capacité de chélation est maximale à une concentration de 100 M [261]. La teneur totale en flavonoïdes de l'HAA testée était faible et ne dépassait pas 21 μ g/ml ce qui peut justifier son faible potentiel antioxydant lors des tests DPPH et ABTS.

Cependant, **FRATIANNI et al.** [21] ont constaté qu'il existe une corrélation négative entre l'acide oléique et l'activité antioxydante de cinq huiles du genre *Prunus* provenant d'Italie. Ils ont également suggéré que la teneur élevée en acide oléique pourrait avoir un effet pro-oxydant dans les huiles testées.

Globalement, le potentiel antioxydant modéré de l'HAA est attribué à sa faible teneur en tocophérols, en composés phénoliques et en flavonoïdes, et à la teneur élevée en acide oléique, cette faible activité antioxydante peut avoir un impact sur la stabilité oxydative de cette huile et donc sur sa durée de conservation.

3.3.3. Activité d'inhibition enzymatique de l'huile d'amande amère

3.3.3.1. Activité inhibitrice de l' α -glucosidase et de l' α -amylase

L'effet hypoglycémiant de cette plante a été déterminé par le potentiel de l'HAA à inhiber les enzymes α -glucosidase et α -amylase, qui sont fréquemment utilisées pour le criblage *in vitro* basé sur l'inhibition de l'hydrolyse des glucides [262]. L'inhibition de ces enzymes, pourraient jouer un rôle fondamental dans la gestion du diabète sucré et le contrôle de la concentration de glucose dans le sang [262]. Par ailleurs, nous avons évalué le potentiel inhibiteur de l'HAA vis à vis ces enzymes. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.9 et les figures 3.10 et 3.11

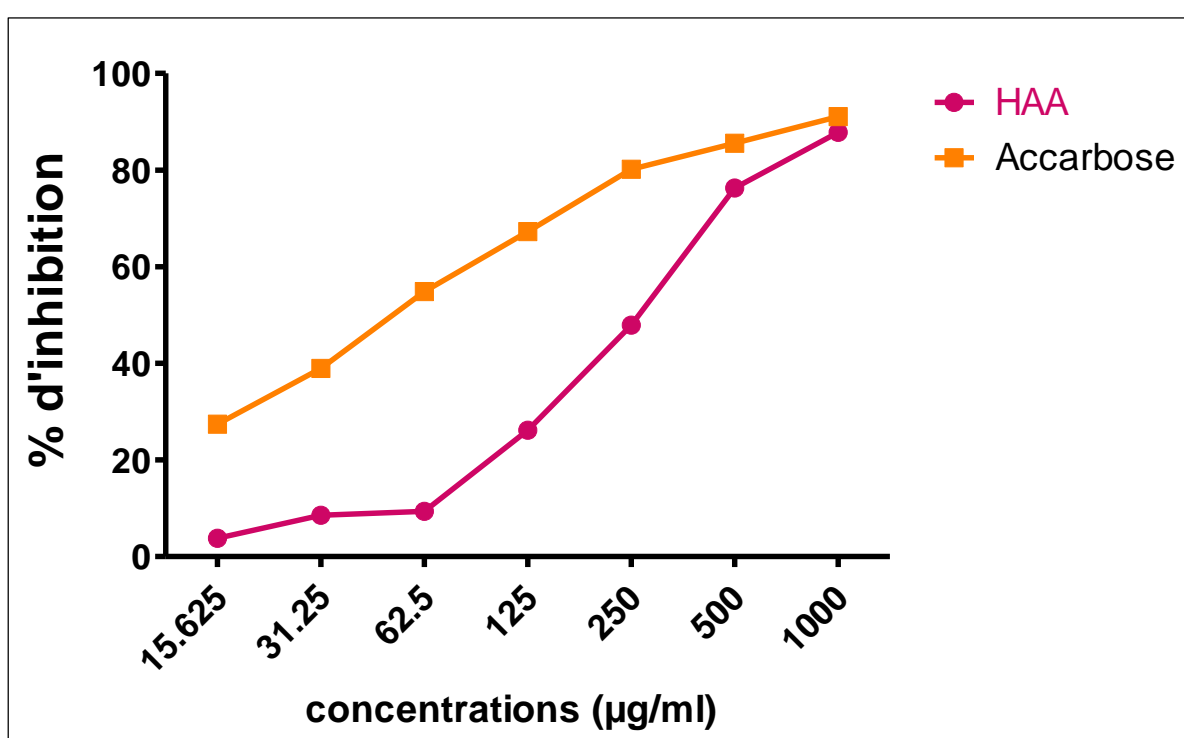


Figure 3.10. Cinétique d'inhibition de l'HAA de l'activité α -glucosidase.

Tableau.3.8. Activités de l'inhibition enzymatique de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* contre les enzymes α -glucosidase, α -amylase et AChE

Extraits	α -Glucosidase CI ₅₀ (mg/ml)	α -Amylase CI ₅₀ (mg/ml)	AChE CI ₅₀ (μ g/ml)
HAA	0.290 \pm 0.39	0.115 \pm 5.94	126.40 \pm 4.67
Acarbose	0.275 \pm 1.59	3.650 \pm 10.70	-
Galantamine	-	-	6.27 \pm 1.15

Les valeurs des CI₅₀ sont définies comme les concentrations qui inhibent 50% et sont calculées par régression linéaire et sont exprimées en moyennes \pm SD (n=3).

"-"non testé

D'après les résultats de la figure 3.10, on observe que le pourcentage d'inhibition de l' α -glucosidase augmente proportionnellement avec la concentration de l'HAA. À la concentration de 1000 μ g/ml, un effet inhibiteur considérable de l'activité α -glucosidase a été obtenu par l'HAA avec un pourcentage d'inhibition est égal à 87,84 \pm 0,79%, assez similaire à celui constaté par l'acarbose (91,05 \pm 0,72%) à 1000 μ g/ml, utilisé comme molécule de référence dans la présente étude.

De plus, les résultats consignés dans le tableau 3.8, indiquent que l'HAA a une bonne activité inhibitrice de l' α -glucosidase avec une valeur de CI₅₀ égale à 0,290 mg/ml, très proche de celle du produit de référence (acarbose, CI₅₀ = 0,275 mg/ml).

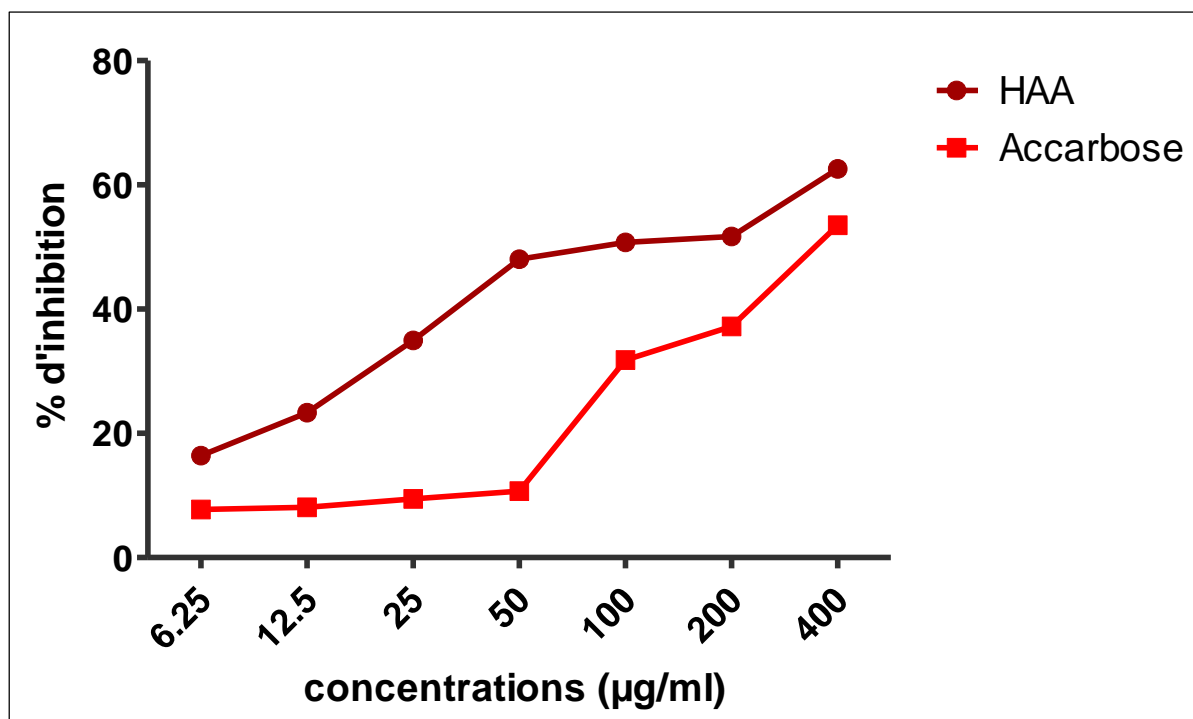


Figure 3.11. Cinétique d'inhibition de l'HAA de l'α-amylase

D'autre part, les résultats illustrés par la figure 3.11 montrent que les pourcentages d'inhibition obtenus par l'HAA, sont nettement supérieurs à ceux obtenus par l'accarbose, utilisé comme standard. En effet, à la concentration de 200 µg/ml, l'HAA a enregistré un effet inhibiteur important égal à $51,71 \pm 0,74\%$, plus élevé que celui observé lors de l'utilisation de l'accarbose ($37,21 \pm 3,54\%$). De même, on remarque que l'HAA a exercé un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'activité α-amylase.

En se basant sur les résultats présentés dans le tableau 3.8, on peut constater, d'une part que l'HAA est plus active sur l'α-amylase, que sur l'α-glucosidase, avec une valeur de CI_{50} inférieure à celle obtenue pour l'α-glucosidase (0,115 mg/ml) et d'autre part, elle est largement inférieure à celle de l'accarbose, qui sert de molécule de référence dans la présente étude ($CI_{50} = 3,65$ mg/ml).

En se référant à la littérature, nos résultats sont comparables avec de à ceux ayant étudié le potentiel antidiabétique *in vitro* via des tests d'inhibition de l'α-glucosidase et de l'α-amylase pour différentes espèces du genre *Prunus* [263,265].

Par ailleurs, sur des modèles animaux, la supplémentation en HAA a exercé un effet bénéfique sur leur niveau de glycémie [266]. Il est intéressant de noter que l'HAA comparée à la pâte d'amande amère entière, a été considérée comme la fraction

bénéfique principale de l'effet hypoglycémique liée à la vitesse de vidange gastrique au lieu de modifier le niveau d'insuline chez les souris [267]. Cela indique que la biodisponibilité de la fraction lipidique de l'huile d'amande amère peut être à l'origine de la diminution de la glycémie. Cependant, à notre connaissance aucune étude disponible dans la littérature n'a abordé son potentiel antidiabétique via l'inhibition des enzymes α -glucosidase et α -amylase.

En outre, nos résultats corroborent avec des études antérieures qui ont montré que certaines huiles végétales telles que l'huile d'*Olea europaea* [268], l'huile de *Curcuma longa L.* [269] et l'huile d'*Argania spinosa* [270] présentaient de fortes activités inhibitrices de l' α -glucosidase et de l' α -amylase [270].

Il existe plusieurs mécanismes d'action des substances antidiabétiques, telles que l'augmentation de la sécrétion d'insuline, la diminution de l'absorption du glucose par le tractus gastro-intestinal, la diminution de la sécrétion de glucagon, la diminution de l'appétit ainsi que l'augmentation de l'absorption et l'utilisation du glucose [271].

En effet, il a été rapporté que les constituants liposolubles contenus dans les huiles extraites des graines de la plante, pourraient avoir un rôle déterminant dans l'inhibition des enzymes associées au diabète de type 2 comme l' α -glucosidase et α -amylase [272].

Les acides gras insaturés ont une valeur nutritionnelle élevée, bien que ces acides ne soient pas de même structure que les glucides, leur action sur les enzymes α -glucosidase et α -amylase appartient au mode d'inhibition compétitive. En fait, l'effet inhibiteur de ces acides augmente avec l'augmentation de la double liaison, ainsi pour l'acide gras la présence de la double liaison est un facteur important d'inhibition des enzymes α -glucosidase et α -amylase [273].

De même, **SU et al.** [274] ont indiqué que les acides gras insaturés, en particulier les acides oléique, linoléique et α -linoléique, pouvaient contribuer fortement à l'inhibition de la voie de l' α -glucosidase et avoir un impact plus limité sur l'activité de l' α -amylase.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que l' α -tocophérol (vitamine E) présent en quantité importante dans les huiles végétales, a une puissante activité inhibitrice sur l' α -glucosidase et l' α -amylase [273]. Des essais randomisés à court terme chez des

patients diabétiques ont également montré l'effet bénéfique de l' α -tocophérol. Une supplémentation orale en α -tocophérol a un effet considérable sur certains facteurs de risques liés à la résistance à l'insuline et au diabète, y compris le stress oxydant, la pression artérielle, le métabolisme lipidique, la fonction endothéliale et l'élimination du glucose médiée par l'insuline.[273,275].

Les activités inhibitrices de l' α -amylase et de l' α -glucosidase de l'HAA présentée dans cette étude ont été considérées comme intéressantes en raison de sa grande richesse en composés liposolubles, principalement en acides gras insaturés et en α -tocophérol.

3.3.3.2. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'activité anti-cholinestérasique de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* a été mesurée par la méthode d'Ellman en utilisant l'enzyme AChE, en vue de déterminer le taux d'inhibition de cette enzyme. Les résultats obtenus fournissent les premières informations sur l'activité anti-AChE de cette huile et sont illustrés dans la Figure 3.12 et le Tableau 3.8.

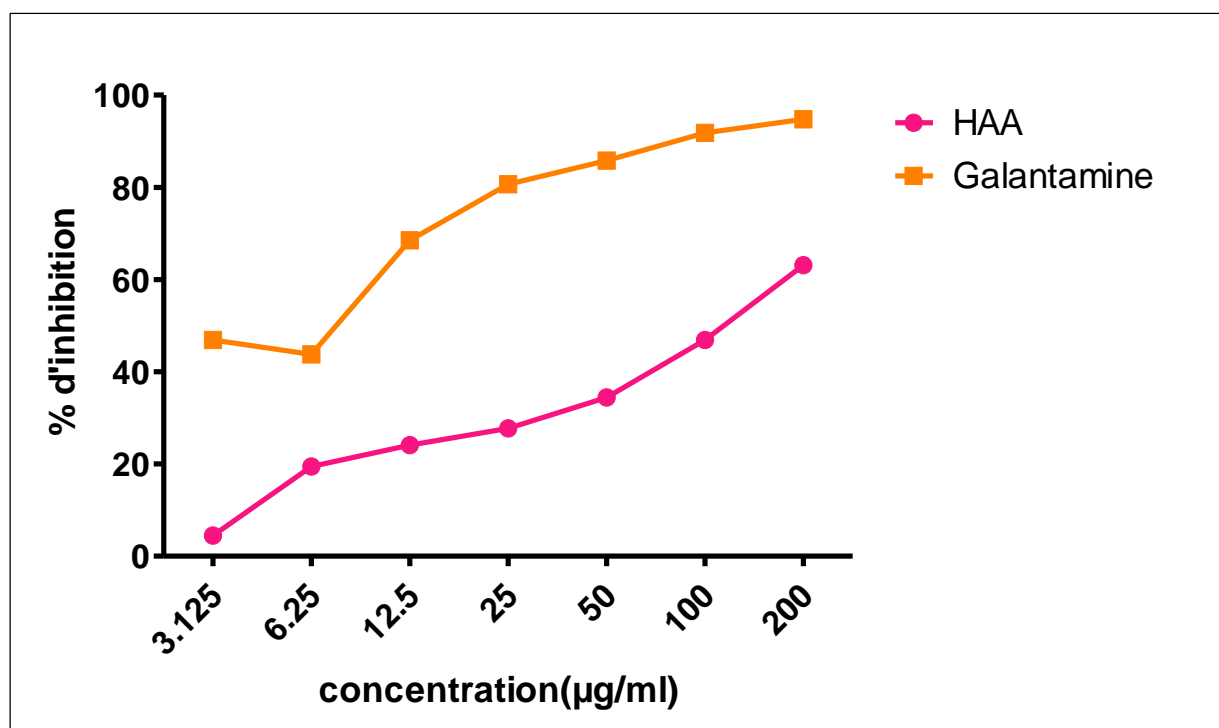


Figure 3.12.Activité inhibitrice de l'AChE de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara*

La figure présentée 3.12 montre la cinétique de l'activité inhibitrice de l'AChE de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* comparée à celle de la galantamine, qui est un traitement de synthèse de la maladie d'Alzheimer.

D'après la figure 3.12, il apparaît que l'HAA a inhibé l'AChE à une concentration comprise entre 12,5 et 200 µg/ml. L'extrait de HAA a montré une faible activité inhibitrice de l'AChE, avec des pourcentages d'inhibition considérablement inférieurs à ceux de la galantamine, dont la valeur de CI_{50} est égale à $126,4 \pm 4,67$ µg/ml (**Tableau 3.9**).

Les composés bioactifs de diverses espèces de *Prunus* ont montré qu'ils peuvent avoir des effets neuroprotecteurs en inhibant l'AChE [276]. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune donnée sur la capacité d'inhibition de l'AChE de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara*.

Dans cette étude, l'HAA a montré une faible activité (CI_{50} 126,4µg/ml) inhibitrice de l'AChE, ce qui est relativement similaire à celle observée par **BONESI et al. [276]** et dont les valeurs des CI_{50} variaient de $97,60 \pm 1,94$ à $171,80 \pm 3,63$ µg/ml pour deux espèces de *Prunus* cultivées en Italie.

Néanmoins, **SEPOL et al. [277]** ont évalué le potentiel inhibiteur des extraits de 25 espèces de plantes vis-à-vis de l'AChE et le BChE, parmi lesquelles l'espèce *P.mahaleb* n'a montré aucune action inhibitrice vis-à-vis de l'AChE.

L'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* contient des polyphénols et des flavonoïdes qui sont des inhibiteurs notables de l'AChE [276].

En effet, il existe une forte corrélation entre la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et l'activité inhibitrice de l'AChE. **MIHAYLOVA et al. [278]** ont indiqué que même de faibles fractions phénoliques ont un effet sur l'AChE ce qui concorde avec nos résultats.

En revanche, les composés phénoliques ont la particularité de se lier aux récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'enzyme AChE et pourraient donc probablement interagir avec les résidus d'acides aminés définissant son site actif par liaison hydrogène. Ceci peut entraîner des effets synergiques, en agissant à la fois comme inhibiteur de l'AChE et comme agoniste des récepteurs de l'ACh [279]. Il a été suggéré que plusieurs groupes hydroxyle dans le composé phénolique renforcent l'action inhibitrice de l'AChE en raison de leur forte affinité avec les récepteurs de l'ACh.

Ces actions inhibitrices expliquent le potentiel inhibiteur de la plupart des composés phénoliques [279].

Toutefois, il n'est pas encore possible de déterminer l'agent responsable à l'inhibition de l'ACHÉ car il est nécessaire d'identifier les fractions appropriées par une purification supplémentaire et l'identification des agents actifs [280].

Selon les résultats de la CG-MS de l'HAA testée, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide palmitoléique, ainsi que d'autres substances identifiées semblent jouer un rôle important dans la prévention des maladies neurodégénératives telles que : la maladie d'Alzheimer et celle de Parkinson, en inhibant les espèces réactives de l'oxygène [280].

3.3.4. Activités anti-inflammatoires de l'huile d'amande amère

3.3.4.1. Activité antiinflammatoire in vitro de l'huile d'amande amère

Dans le but d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires in vitro de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara*, nous avons choisi le modèle de dénaturation de l'albumine de sérum bovin (BSA). Les effets de l'HAA sur la dénaturation thermique de la BSA ont été mesurés à différentes concentrations et les résultats sont illustrés dans la figure 3.13 et le tableau 3.9.

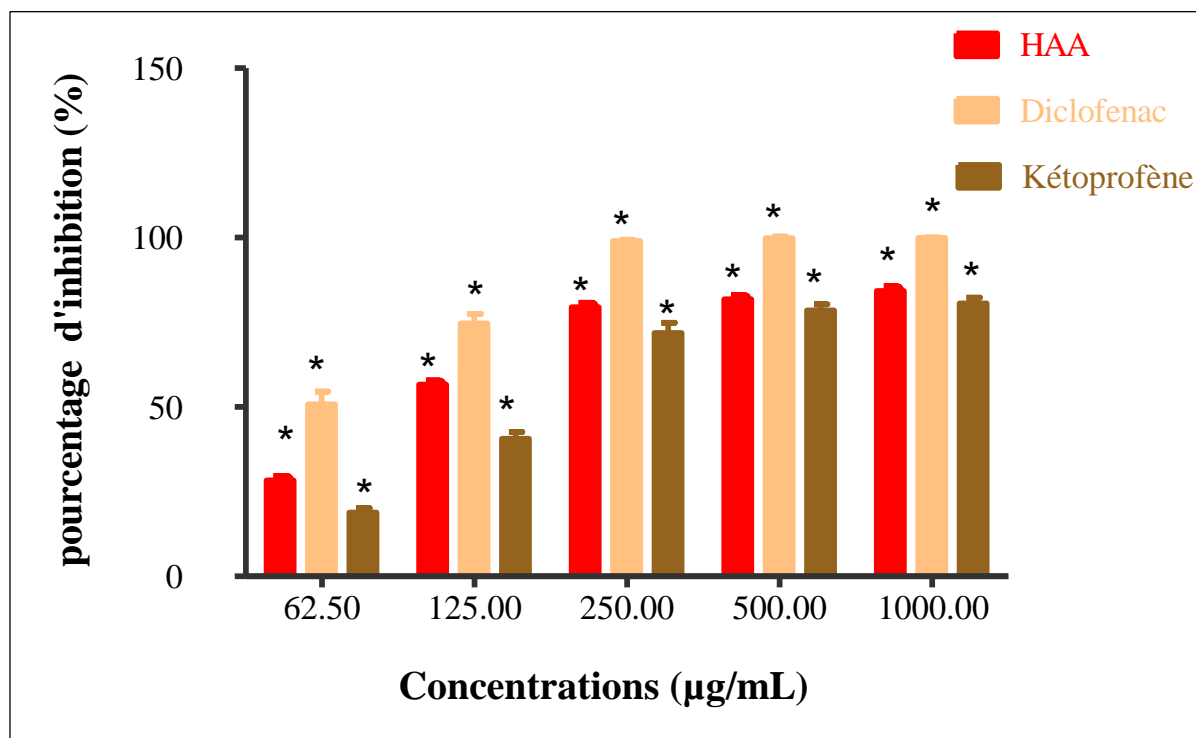


Figure 3.13 : Effet des différents extraits de l'huile des graines *P.amygdalus.varamara*, kétoprofène et le Diclofénac sodique sur l'inhibition de la dénaturation des protéines BSA

Tableau 3.9. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA à différentes concentrations de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* et les molécules standards

Concentrations (µg/ml)	%d'inhibition		
	HAA	Diclofénac de sodium	Kétoprofène
62.5	28,32±0.18*	50,75±0.88	18,85±0.30
125	56,64±0.04*	74,69±0.64	40,69±0.44
250	79,50±0.13*	99,01±0.09	71,81±0.70
500	81,80±0.08*	99,87±0.09	78,55±0.41
1000	84,26±0.30*	99,98±0.00	80,59±0.40
Cl₅₀ (µg/ml)	127.32±0.73	41.89±5.02	166.12±6.06

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD, **P* < 0,05 différence non significative par rapport au contrôle standard effectué par One-way ANOVA suivi du post-hoc test de Dunnett's.

Les différentes concentrations de l'huile des graines des *P.amygdalus var.amara* ont présenté des pourcentages d'inhibition de la dénaturation des protéines non significative ($p < 0.05$) allant de 28.32 % à 84,26 %. Le diclofénac et le kétoprofène ont été utilisés comme molécules standards dans le but de comparer l'efficacité de l'activité anti-inflammatoire à celle de notre huile. À 500 µg/ml, un effet anti-inflammatoire considérable a été obtenu avec un pourcentage d'inhibition de 81,8%, assez proche des valeurs d'inhibition du diclofénac (99,87%) et plus élevé que celui de la molécule standard kétoprofène (78,55%).

Le diclofénac a révélé la meilleure activité inhibitrice de la dénaturation de BSA avec un pourcentage maximal de 99,98 % à 1000 µg/ml, tandis que le kétoprofène a montré le plus faible pourcentage 80,59 à une concentration de 1000µg/ml.

L'HAA a montré une activité inhibitrice de la dénaturation de BSA relativement importante à la concentration de 1000 µg/ml, considérée supérieure à celle enregistrée pour le kétoprofène et assez proche de la valeur du standard diclofénac.

En outre, l'activité anti-inflammatoire de l'HAA n'a montré aucune différence significative entre le diclofénac et le kétoprofène ($p < 0,05$), comme indiqué dans la figure 3.13 et le Tableau 3.10.

L'HAA a exercé un effet anti-inflammatoire dose-dépendant contre la dénaturation des protéines induite par la température élevée (Figure.3.13)

Tel qu'il a été mentionné dans le Tableau 3.10, la CI_{50} ($127,32 \pm 0,73 \mu\text{g/ml}$) de l'extrait testé est inférieure à celle de la molécule standard kétoprofène ($166,12 \pm 6,06 \mu\text{g/ml}$) mais légèrement supérieure à celle du diclofénac. ($41,89 \pm 5,02 \mu\text{g/ml}$).

Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par **FRATIANNI et al.[21]** qui ont évalué le pouvoir anti-inflammatoire *in vitro* de cinq huiles de graines de *Prunus* pressées à froid à travers le test de dénaturation de la BSA, ils ont enregistré une activité supérieure à celle du diclofénac utilisé comme composé de référence. Les valeurs des CI_{50} se situent entre $3,29 \pm 0,206$ et $4,339 \pm 0,403 \mu\text{g/ml}$.

La dénaturation des protéines est un processus qui entraîne la perte de la structure tertiaire et secondaire des protéines en réponse à des facteurs de stress ou à des composés externes. De nombreuses protéines biologiques perdent leurs fonctions

biologiques lorsqu'elles sont dénaturées. Ainsi, la dénaturation des protéines tissulaires est l'une des causes bien connues de l'inflammation [281].

Par conséquent, la détermination de la dénaturation des protéines peut être utile en tant qu'essai de criblage pour la détection des composés anti-inflammatoires, sans l'utilisation de modèle animal [281].

Par ailleurs, nos résultats sur l'activité anti-inflammatoire de l'HAA corroborent ceux obtenus par les huiles des graines de courge et de chardon-Marie [282].

En effet, certaines études ont confirmé l'action anti-inflammatoire des acides gras, principaux composés des huiles végétales. Des compléments alimentaires d'AGI ont été considérés comme étant bénéfiques dans le traitement de la maladie du côlon irritable, du psoriasis, de l'eczéma, de la polyarthrite rhumatoïde et de la colite ulcéreuse [283].

Par ailleurs, **FRATIANI et al.** [21] ont montré qu'il existe une forte corrélation entre la teneur en acides gras dans les huiles végétales et l'effet anti-inflammatoire. Ils ont remarqué que les acides linoléique et palmitoléique ont un effet bénéfique sur l'activité anti-inflammatoire des huiles bien qu'ils soient présents en faible quantité.

D'autre part, l'effet bénéfique de l'HAA peut être dû à la présence de polyphénols. En effet, il a été démontré dans diverses études *in vivo* et *in vitro*, que les polyphénols diminuent les marqueurs de l'inflammation en agissant sur de nombreuses cibles moléculaires dans les voies de signalisation de l'inflammation [284].

Nos résultats ont montré que cette huile a une très bonne capacité à maintenir la structure tridimensionnelle des protéines. Cette capacité pourrait être attribuée à la présence de certains acides gras, en particulier l'acide oléique.

3.3.4.2. Activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'huile d'amande amère

Les effets anti-inflammatoires de l'HAA sont également évalués *in vivo* en utilisant le modèle d'œdème d'oreille induit par le xylène. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est calculé via la mesure de la différence de poids entre les oreilles gauche et droite de chaque souris des différents lots étudiés, les résultats sont présentés dans le tableau 3.10 et la figure 3.14

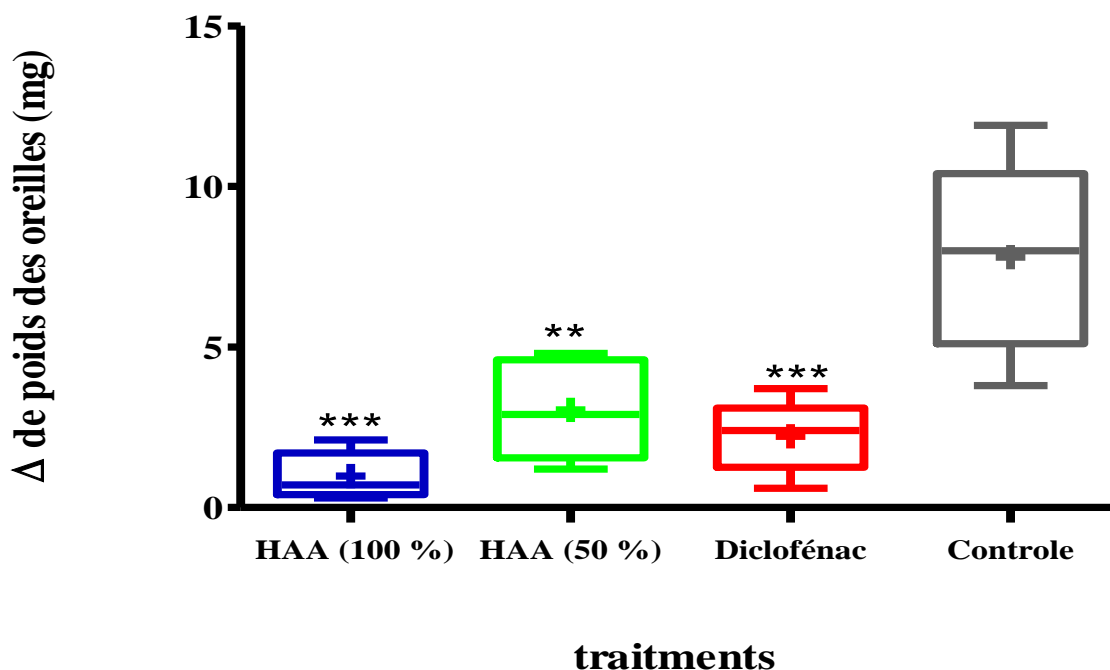


Figure 3.14. Potentiel anti-inflammatoire *in vivo* de l'huile des graines *P.amygdalus var.amara*

Tableau 3.10. Activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'HAA.

Lots	Oreille droite (mg)	Oreille gauche (mg)	Δ de poids des oreilles (mg)	% d'inhibition d'oedème
Témoin- (véhicule)	14.36±3.17	7.52±1.02	7.8±2.16	-
Diclofenac (molecule de reference)	9.46±1.52	7.24±1.4	2.26±0.72***	69.76±6.94*
HAA (100%)	8.24±1.23	7.52±1.05	0.72±0.26***	88.56±7.39*
HAA (50%)	10.44±1.60	7.4±0.44	3.04±1.55**	62.31±6.49*

Les résultats sont exprimés en moyenne ±SD. Les différences statistiques par rapport au contrôle ont été déterminées par ANOVA suivi du test de Tukey ; elles sont différentes du groupe témoin. *P <0,05; **P <0,01 et ***P <0,001 pour l'oreille droite (prétraitée avec le véhicule puis avec le xylène) par rapport à l'oreille droite (prétraitée avec le HAA ou le Diclofénac, puis avec le xylène) des souris dans chaque groupe. *** les valeurs sont significativement différentes (test de Tukey, p<0.001) , ** Les valeurs sont significativement différentes (test de Tukey, p<0,01).

Les résultats rapportés dans le tableau 3.10 et la figure 3.14, mettent en évidence les différences de pourcentage d'inhibition de l'œdème des 4 lots.

Le prétraitement avec l'HAA pure à 100 % (20 µl) a montré un effet anti-inflammatoire remarquable (88,56 %) ($p < 0,001$), suivi par le diclofénac sodique (69,76%) ($P < 0,001$), un anti-inflammatoire non stéroïdien, ayant servi de contrôle positif. De même, l'HAA à 50 % (20µl) a présenté un effet important (62,31 %) assez proche de celui du diclofénac ($P < 0,01$).

Ainsi, les résultats des analyses statistiques nous indiquent qu'il n'existe aucune différence significative ($P < 0.05$) entre les pourcentages de réduction de l'œdème des lots traités par l'HAA et ceux traités par le diclofénac de sodium.

L'inflammation est une réponse défensive de l'organisme contre l'invasion par des corps étrangers [64]. Une réponse inflammatoire aiguë est caractérisée par une rougeur, une chaleur, un gonflement, une douleur et une perte de fonction [65,66].

Actuellement, les thérapies les plus avantageuses pour la gestion des processus inflammatoires sont basées sur l'utilisation d'AINS. Cependant, l'utilisation chronique des AINS est liée à un large éventail d'effets secondaires, allant des problèmes gastro-intestinaux à la toxicité rénale [285]. Ainsi, les huiles végétales représentent une alternative prometteuse pour réduire les processus inflammatoires en raison de leur richesse en métabolites secondaires, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les terpénoïdes et les anthraquinones [285].

Quelques études ont traité les activités anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* des polyphénols et des flavonoïdes végétaux. Elles ont montré que les flavonoïdes spécifiques, en particulier les dérivés de flavones, présentent une activité anti-inflammatoire *in-vitro* en modulant l'expression des gènes pro-inflammatoires comme iNOS, COX-2 et d'autres cytokines [286].

D'autre part, nos résultats corroborent les résultats des études sur le potentiel anti-inflammatoire topique des huiles végétales contenant de l'acide oléique comme composé majoritaire. La littérature rapporte l'utilisation ethnopharmacologique de ces huiles pour soigner et traiter les maladies de la peau [287].

En outre, il a été signalé que l'acide oléique a une activité anti-inflammatoire topique via les récepteurs des glucocorticoïdes, similaire à celle de l'acétate de dexaméthasone, sur la dermatite induite par l'huile de croton. Cet acide oléique ne permet pas l'augmentation des niveaux de glucose dans le sang, l'effet indésirable important lié à la présence des glucocorticoïdes comme la dexaméthasone [288].

Cette divergence entre l'acide oléique et la dexaméthasone est très importante, notamment dans le traitement des processus inflammatoires chez les patients diabétiques qui présentent une augmentation de la pression sanguine [289].

3.3.4.3. Examen histopathologique

Les effets protecteurs de l'HAA sur l'œdème de l'oreille ont été confirmés à l'échelle cellulaire par des examens histopathologiques. Les micrographies de coloration H & E illustrées par la figure 3.15 montrent que les traitements à base de de l'HAA à différentes concentrations (100 et 50%) ont réduit significativement les changements induits par le xylène dans les oreilles des souris.

Le témoin négatif (non traité) : L'inflammation induite par l'application de xylène sur la peau de l'oreille est caractérisée par une infiltration cellulaire, principalement par les leucocytes polynucléaires neutrophiles (PNN), les éosinophiles, et les lymphocytes présents à la limite entre le derme et l'hypoderme. Une congestion sanguine, un œdème, un relâchement du tissu conjonctif et une désorganisation des fibres de la matrice extracellulaire ont également été observés (**Figure 3.15b**).

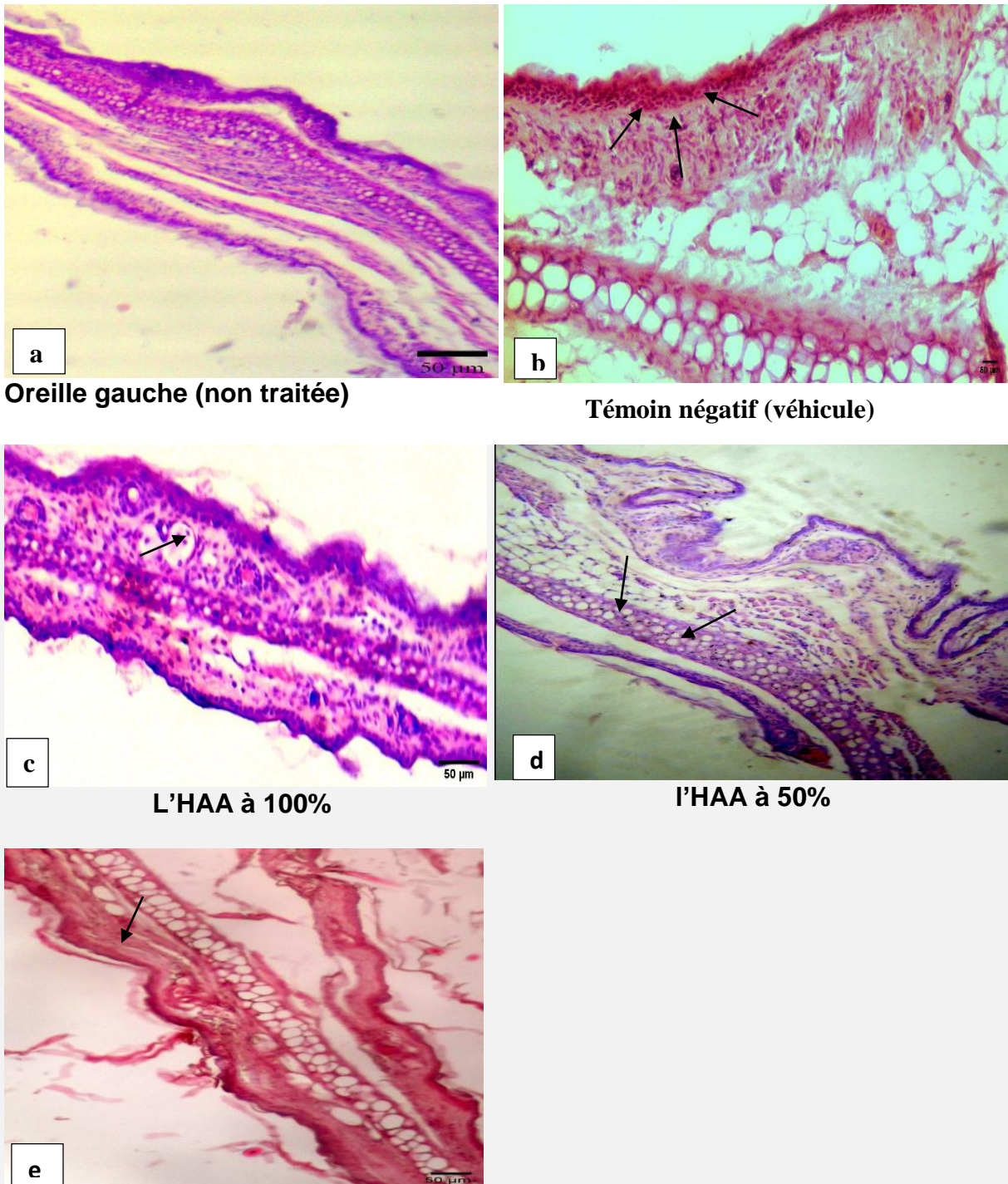
L'HAA à 100% : L'HAA pure a réduit de manière significative l'inflammation due à l'application de xylène, pour laquelle on a observé une diminution significative de l'infiltration des cellules inflammatoires avec absence de congestion sanguine et une faible intensité de l'œdème par rapport au groupe non traité. (**Figure 3.15c**).

L'HAA à 50% : L'HAA diluée à 50 % a montré une légère infiltration de cellules inflammatoires, avec une légère congestion capillaire et un œdème de faible intensité (**Figure 15d**).

Le témoin positif (Diclofénac de sodium) : le groupe traité par le diclofénac sodique, a montré une diminution significative de l'infiltration des cellules

inflammatoires, ainsi que l'absence d'œdème de congestion sanguine dans la couche dermique. (**Figure 15e**).

L'HAA présente un bon potentiel anti-inflammatoire topique de manière dose-dépendante, en réduisant l'infiltration cellulaire et la congestion sanguine grâce à sa forte teneur en acides gras insaturés, particulièrement en acide oléique. Par conséquent, cette huile pourrait éventuellement être recommandée comme un excellent ingrédient pour les soins de la peau dans les domaines cosmétique et pharmacologique



Oreille gauche (non traitée)

Témoin négatif (véhicule)

L'HAA à 100%

l'HAA à 50%

Témoin positif (diclofénac de sodium)

Figure 3.15. Effet de l'HAA à des concentrations de 100 et 50 %, et le diclofénac de sodium (0.5%) (20µl/oreille) sur le modèle de l'induction de l'œdème d'oreille de souris par xylène. Changements histologiques (A-H;hematoxylin-eosin 10x and 20x objectifs) des tissus d'oreille de souris après 5h d'application d'xylène et les traitements. a: oreille gauche ; b:témoin négatif (véhicule); c: l'HAA à 100 %; d:l'HAA à 50%; e: témoin positif (diclofénac de sodium), les flèches noirs indiquent la présence d'infiltrat cellulaire. Echelle : 50 µm.

3.6. Evaluation de l'activité photo-protectrice de l'huile d'amande amère

L'activité photo-protectrice de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* a été évaluée *in vitro* en déterminant le facteur de protection solaire (FPS), qui est généralement utilisé pour classer les niveaux de protection solaire des produits contre les coups de soleil provoqués principalement par rayonnements UV-B , responsables des effets cutanés nocifs.

Ces produits sont classés en fonction de leurs valeurs FPS. Celles situées entre 6 et 10, 15-25, 30-50, et >50 sont respectivement considérées comme ayant une activité de protection solaire minimale, modérée, élevée et maximale [290].

La détermination de la valeur FPS pour notre échantillon a été effectuée par un dosage spectrophotométrique en appliquant l'équation de **Mansur [169]**. Les résultats de l'huile étudiée comparée à deux molécules de références sont présentés par la figure 3.16.et le tableau (**appendice D**).

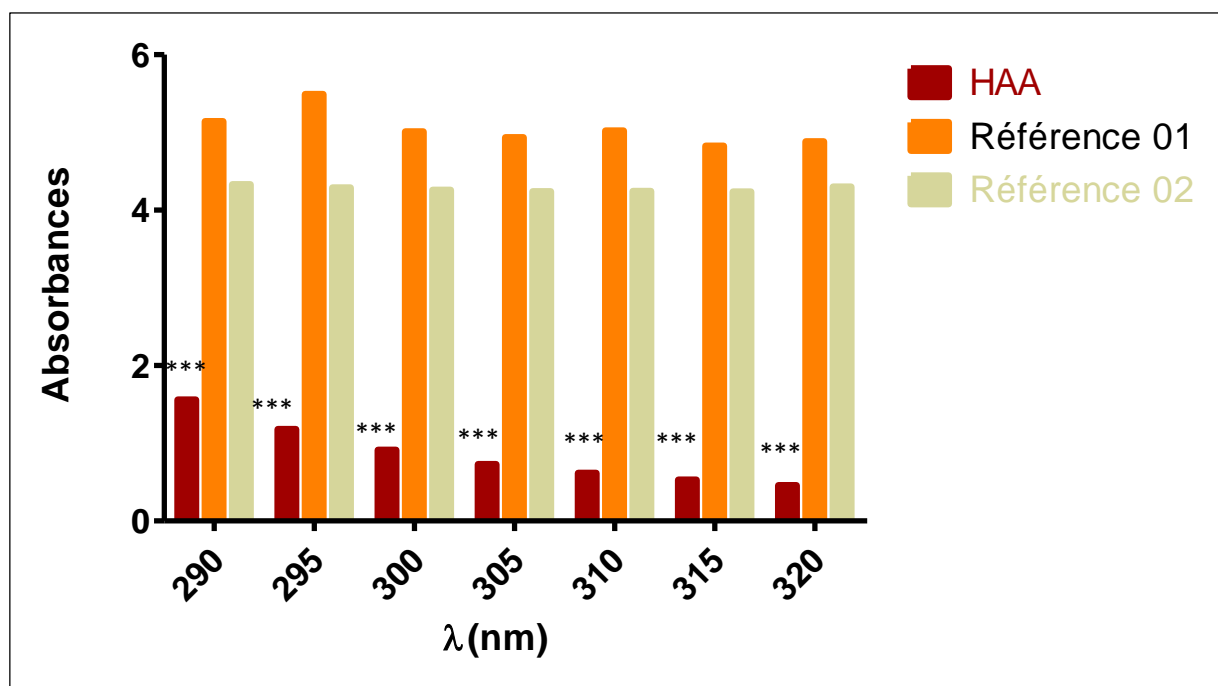


Figure 3.16.Activité photo-protectrice de l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* mesurée à différentes longueurs d'onde λ .

Les valeurs calculées de FPS sont situées dans l'intervalle de 7,88 à 50, 11. La valeur la plus élevée de FPS est de $50,11 \pm 0,53$ pour la molécule de référence 01, suivie par la molécule de référence 02 dont la valeur de FPS est égale à $44,22 \pm 0,35$. Cependant, notre échantillon d'HAA possède moyennement la valeur la plus faible ($7,88 \pm 0,20$).

Les résultats des analyses statistiques montrent qu'il existe une différence significative ($P < 0.001$) entre l'huile des graines de *P.amygdalus var. amara* et les molécules de référence (01 et 02). Par conséquent, l'HAA possède une activité de protection solaire faible en comparaison aux deux molécules de références utilisées qui sont classés parmi les produits de haute protection solaire.

KAUR ET SARAF [291] ont déterminé le FPS de 6 huiles végétales diluées dans des solutions aqueuses éthanoliques par un dosage spectrophométrique en suivant la méthode de Mansur. Ils ont constaté que les valeurs FSP₇ de l'huile d'olive et de l'huile de noix de coco est de 8, celle de l'huile de ricin est de 6 alors que celle de l'huile d'amande douce est de 5. Cette dernière valeur corrobore avec nos résultats.

L'HAA a présenté une faible activité photoprotectrice, cependant comparée à d'autres huiles végétales, telle que l'huile de sésame et l'huile de moutarde, elle semble être prometteuse et peut représenter une solution efficace et sûre pour améliorer les formulations commerciales actuelles [292].

En général, la mesure des valeurs FPS des écrans solaires et l'évaluation de leur efficacité par la méthode de Mansur est devenue une norme mondiale. Cependant, à l'heure actuelle, les profils de sécurité de certains produits de protection solaire conventionnels sont remis en question, en raison de leurs effets toxicologiques controversés [293].

D'une part, ils doivent protéger la peau des rayons UV nocifs, mais d'autre part, certains de leurs ingrédients actifs peuvent être potentiellement dangereux. Quelques-unes de leurs molécules sont susceptibles de se dégrader en présence de la lumière solaire/UVR entraînant souvent une irritation de la peau ou une photodermatose et des réactions photoallergiques [294].

En outre, des études ont montré que certains filtres UV sont capables de pénétrer à travers la peau en quantité suffisante et d'intégrer la circulation sanguine] interférant ainsi avec le système endocrinien [295].

Par conséquent, l'utilisation des huiles végétales et d'antioxydants naturels devient très utile. En effet, les huiles végétales ont été étudiées, en raison de leur richesse en composés bioactifs, tels que les acides gras insaturés, les tocophérols, les phénols apparentés, et autres [296].

Grâce à ces composés, les huiles permettent une revitalisation, une cicatrisation et un rajeunissement de la peau, mais aussi une protection contre les radicaux libres de l'oxygène et une protection solaire [297 ,298].

En se référant à la littérature, on remarque qu'il existe une forte corrélation entre la teneur en composés phénoliques et les valeurs de FSP [299]. Les effets bénéfiques des polyphénols sur la peau comprennent, la photoprotection, l'anti-vieillessement et la photo-chimioprévention [299]. Ils aident également à maintenir une structure appropriée de la peau par l'induction de la synthèse de l'élastine et du collagène, l'inhibition du NF-B et l'inhibition de l'inflammation des tissus [298].

En outre, les flavonoïdes constituent l'une des classes de composés phénoliques les plus importantes en termes de photoprotection. Ces molécules absorbent les rayons UV et réduisent les dommages oxydatifs causés par les ROS. Les doubles liaisons présentes dans la structure des flavonoïdes leur confèrent une grande capacité d'absorption des UVR et les groupes hydroxyles attachés aux anneaux aromatiques contribuent à leur capacité de piégeage des ROS [299].

Par ailleurs, il a été montré que les tocophérols présents dans les huiles végétales peuvent protéger les membranes cellulaires des dommages induits par la lumière UV [300].

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que les faibles valeurs de FPS de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* sont dues à leur basse teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. L'analyse par HPLC de l'HAA a montré sa richesse en tocophérols qui peuvent être les facteurs responsables de l'absorption de la lumière UV par cette huile.

CONCLUSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de cette étude de recherche, les travaux réalisés ont permis de mettre en valeur l'huile végétale de *P.amygdalus var.amara* pressée à froid, par l'identification de ces composés bioactifs, et l'évaluation de quelques activités biologiques et pharmacologiques.

Le contrôle de la qualité des paramètres physicochimiques de l'HAA a permis d'indiquer que cette huile est stable, vierge, non siccative et de bonne valeur nutritionnelle.

L'analyse par CG/MS de la composition chimique de l'HAA a permis d'identifier huit acides gras différents avec prédominance des acides oléique et linoléique.

L'analyse de l'HAA par HPLC a révélé la présence de deux isomères différents de tocophérols avec dominance de l' α -tocophérol.

Le dosage colorimétrique de l'huile a indiqué une faible teneur en composés phénoliques et flavonoïdes.

Concernant l'effet antimicrobien de l'HAA, il a été mis en évidence par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, en présence de quatre types de pathogènes : les bactéries, les levures, les moisissures et les dermatophytes. L'HAA a montré la meilleure activité antibactérienne sur la souche *E.coli*. Les levures et les dermatophytes se sont avérées plus sensibles vis à vis l'action antifongique de l'HAA. L'effet antimicrobien de cette huile peut être attribué à certains acides gras, tocophérols et polyphénols présents dans cette huile.

Le potentiel antioxydant de l'HAA *in vitro* a été évalué par diverses méthodes. Les résultats ont révélé une activité anti-oxydante modérée lors des tests de piégeage des radicaux DPPH• et ABTS•+, ce qui pourrait être expliqué par la faible teneur en polyphénols et flavonoïdes. L'HAA a montré, également, une activité anti-péroxydation lipidique intéressante dans le test de blanchiment du β -carotène et une bonne activité réductrice cuprique dans le test CUPRAC. Ces résultats sont probablement liés à la présence d'un contenu relativement important en tocophérols principalement l' α -tocophérol.

L'activité antidiabétique *in vitro* a été évaluée via les tests d'inhibition des enzymes α -glucosidase et α -amylase. Ces tests ont donné des résultats prometteurs particulièrement sur l'enzyme α -amylase, meilleurs que ceux obtenus par la molécule standard acarbose.

L'effet anti-cholinestérasique de l'HAA est mis en évidence par la méthode d'Ellman en utilisant l'enzyme acétylcholinestérase AChE. Ainsi, l'HAA a affiché une activité inhibitrice de l'AChE, modérée.

Par ailleurs, l'HAA a exercé un effet anti-inflammatoire considérable, comparable à celui du Diclofénac de Sodium lors des tests *in vitro* et *in vivo*, confirmés à l'échelle cellulaire par une étude anatomopathologique.

L'activité photoprotectrice de l'huile des graines de *P.amygdalus var.amara* a également, été évaluée *in vitro* par la mesure du facteur de protection solaire (FPS). Les résultats indiquent que cette huile a une activité photoprotectrice modérée liée à sa faible teneur en polyphénols.

A la lumière de ces résultats encourageants, il serait intéressant de poursuivre d'autres investigations sur le plan phytochimique, toxicologique et pharmacocinétique par :

- L'isolement, la purification, l'identification structurale et la caractérisation des composés bioactifs de cette huile. Ces molécules pourront être réévaluées et éventuellement modulées par rapport à leurs réponses biologiques et toxicologiques.
- Evaluer leurs effets antidiabétiques et anti-cholinestérasique sur des modèles animaux.
- Réaliser des tests *in vivo* de toxicité aiguë ,chronique, et subchronique de l'HAA , sa cytotoxicité et cancérogénicité également , afin de mieux comprendre le profil de sécurité de cette huile .
- Développer des crèmes dermiques à base de cette huile douées d'une activité antimicrobienne antioxydante et anti-inflammatoire.

APPENDICE

APPENDICE A

Coloration H&E (Hématoxyline Eosine)

Les étapes suivantes ont été réalisées dans le laboratoire d'anatomopathologie de l'EPH kolea

1. Préparation des blocs et fixation des pièces

Les organes préalablement fixés dans le formol à 10 % sont disposés dans des cassettes qui sont ensuite placées dans un automate de déshydratation (Leica Optika B-192). Cette étape a pour but de déshydrater les pièces des oreilles, par submersion dans des bains d'éthanol à des concentrations croissantes (60 %, 70%, 90%, 95% et 100%) pour une durée d'une heure chacune. Puis, les pièces sont placées dans deux bains de xylène pendant 2h dans le but d'éliminer toute trace d'éthanol dans les échantillons

L'inclusion (imprégnation), a été faite par immersion des cassettes dans deux bains successifs de paraffine fondue à 56°C pendant 12h.

2. Enrobage et confection des coupes

Les échantillons ont été délicatement retirés des cassettes avec une pince, puis mis dans des moules en inox avant de les remplir de paraffine liquide. Ensuite, les moules ont été déposés sur une plaque refroidissante afin de solidifier la paraffine et réaliser des coupes.

Les blocs de paraffine ont été démoulés pour y être placés dans un microtome (Leica Optika B-192) afin de confectionner des coupes d'environ 5 µm d'épaisseur. Ces rubans ont été déposés sur des lames marquées, puis immergées un court instant dans un bain marie de 60°C.

Par la suite, les lames ont été rangées sur un porte-lame, puis placées dans l'étuve pendant 30 minutes, et immergées dans un bain de xylène afin d'éliminer toute trace de paraffine, et ainsi permettre la pénétration des colorants hydrophiles dans les tissus.

3. Coloration et montage des lames

La coloration des lames s'est faite selon le protocole de coloration à l'Eosine/Hématoxyline de Mayer (HE : l'hématoxyline basique qui colore le noyau acide (basophile) en bleu-violet et l'éosine acide qui colore le cytoplasme basique (acidophile) en rose.

De ce fait, les coupes sont d'abord déparaffiner et réhydratées par submersion successive dans les bains suivants : bain de xylène (20 min), bains d'éthanol (20 min à 100%, 10min à 90%, 10min à 70%). Après rincées avec l'eau de robinet (3 min).

Les coupes réhydratées sont placées dans un bain d'hématoxyline (4 min) pour colorer les noyaux. L'excès de colorant est éliminé par un lavage à l'eau de robinet (3min), puis passer à l'alcool acide (10 min), ensuite rincées par l'eau courante.

Les coupes sont placées dans un bain d'éosine (1 min) afin de colorer le cytoplasme, et l'excès de colorant est éliminé par lavage avec l'eau 3 fois l'eau courante 3 fois.

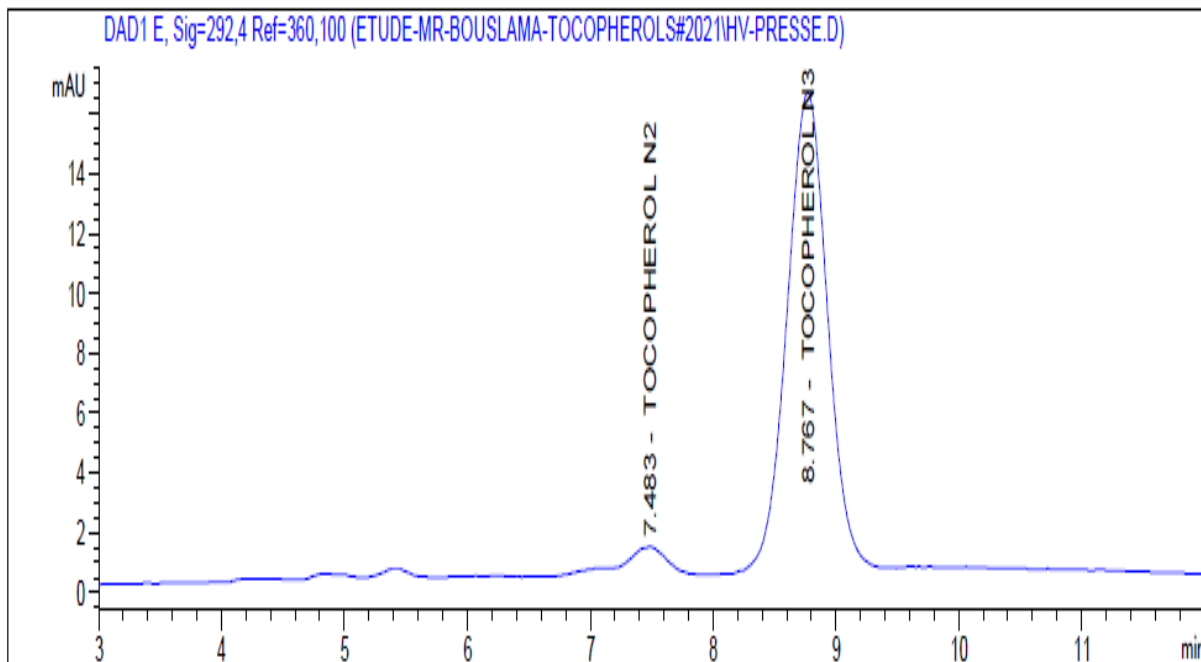
Les lames ont été déshydratées par un passage dans l'alcool absolu (EtOH 5min 70%, 10min 100%), après les placées dans un bain de xylène pendant 10mn.

Les lames ainsi colorées ont été couvertes par des lamelles collées par la résine pour permettre l'adhésion des lames et lamelles.

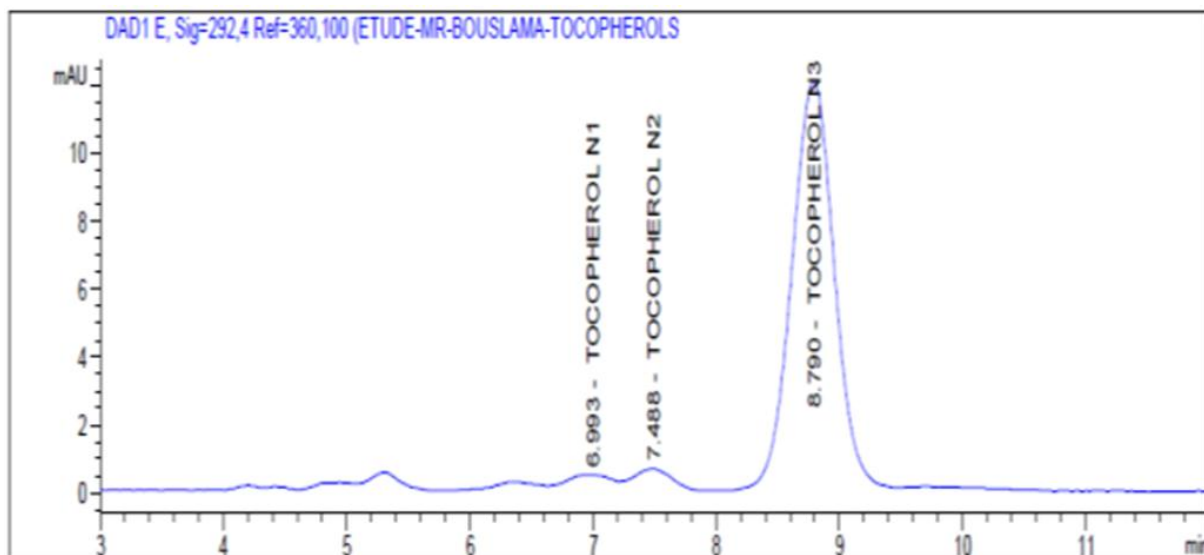
4. Observation microscopique

Les observations des différents pièces des oreilles ont été réalisées à par un microscope Optika B-192B500Ti-5 (10 et 40 ×) (Leica Optika B-192) afin de vérifier le degré de réduction de l'inflammation induite par xylène. Les images numériques ont été obtenues par d'un appareil photo.

APPENDICE B

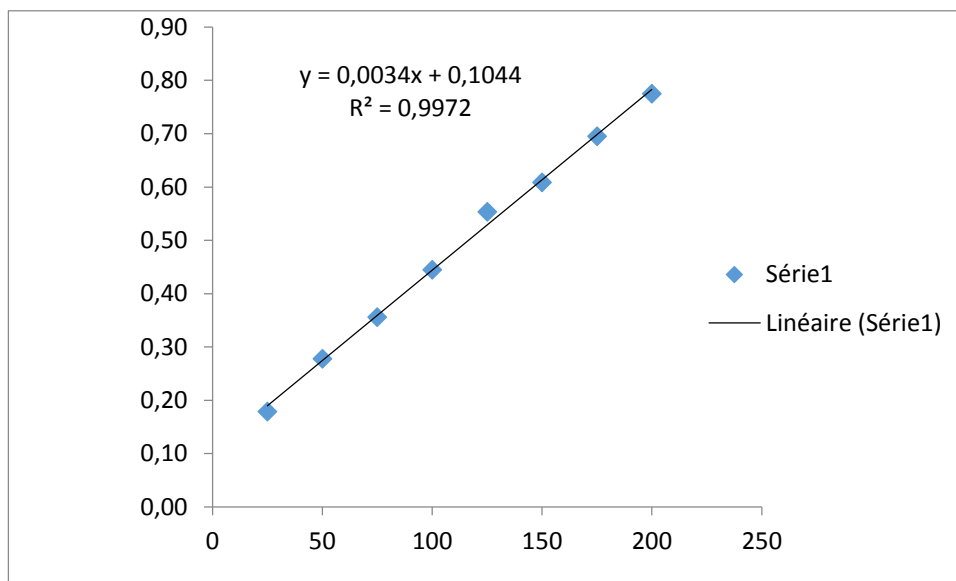


Profil chromatographique des standards des tocophérols

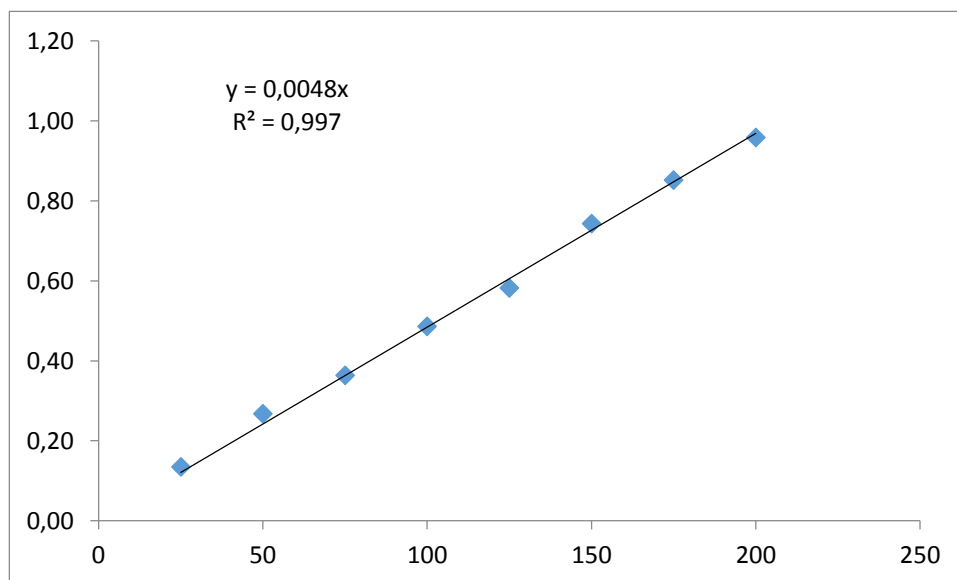


Profil chromatographique de l'huile d'amande amère

APPENDICE C



Courbe d'étalonnage d'acide gallique



Courbe d'étalonnage de la quercitine

APPENDICE D

Les valeurs du facteur de protection solaire

	Reference 2	Reference 1	Huile essentielle
SPF	50,11±0,53	44,22±0,35	7,88± 0,20

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ABTS•+	Acide 2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonique)
AChE	Acetylcholinestérase
ACI	Iodure d'acétylthiocholine
AGS	Acides Gras Saturés
AGI	Acides Gras Insaturés
AGMI	Acides Gras Monoinsaturés
AGPS	Acides Gras Polysaturés
ATB	Antibiotique
ATC	Acétylthiocholine
ATCC	American Type Culture Collection
BChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
CN	Gentamycine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity assay
DPPH•	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DSTA	Démence sénile du type Alzheimer
DTNB	5,5'dithiobisnitrobenzoate
DZI	Diamètre de Zone d'inhibition
EMAG	Ester Méthylique d'Acide Gras
ERO	Espèces réactives d'oxygène

FDA	Food and drug administration
FPS	Facteur de protection solaire
HAA	Huile d'amande amère
HDL	High-density lipoprotein
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HV	Huile végétale
IFN-γ	Interféron gamma
IL-1	Interleukine
LDL	Low Density Lipoprotein
MA	Maladie d'Alzheimer
NF-Kβ	Nuclear factor-kappa B
NMRI	Naval Médical Research Institute
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PGE2	Prostaglandine
PNN	PolyNucléaire Neutrophiles
ROS	Reactive Oxygen Species
SPF	Sun protection factor
TNF-α	Facteurs de nécrose tumorale

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Asadi-Samani, M., Moradi, M., Mahmoodnia, L., Alaei, S., Asadi-Samani, F. and Luther, T.**, Traditional uses of medicinal plants to prevent and treat diabetes; an updated review of ethnobotanical studies in Iran. *Journal of Nephropathology*, 6(3), (2017), pp.118-25.
2. **Mahmoudian-Sani, M., Luther, T., Asadi-Samani, M., Saeedi-Boroujeni, A. and Gholamian, N.**, A new approach for treatment of type 1 diabetes: Phytotherapy and phytopharmacology of regulatory T cells. *Journal of Renal Injury Prevention*, 6(3), (2017), pp.158-63.
3. **Mirhoseini, M., Moradi, M. T. and Asadi-Samani, M.**, Traditionally used medicinal plants in the treatment of kidney stone: a review on ethnobotanical studies in Iran. *Ambient Science*, 3(2) (2016), pp.16-21
4. **Sani, M. R. M., Asadi-Samani, M., Rouhi-Boroujeni, H. and Banitalebi-Dehkordi, M.**, Phytopharmacology and phytotherapy of regulatory T cells: A new approach to treat multiple sclerosis. *DerPharmacia Lettre*, 8(3), (2016), pp.215-20.
5. **Sani, M. R. M., Asadi-Samani, M., Saeedi-Boroujeni, A., Banitalebi-Dehkordi, M. and Bahmani, M.**, Suppressing effects of medicinal plants and their derivatives on inflammasome complex: A systematic review. *International Journal of PharmTech Research*, 9 (6), (2016), pp.325-35.
6. **Shabanian, S., Bahmani, M. and Asadi-Samani, M.**, The medicinal plants effective on female hormones: A review of the native medicinal plants of Iran effective on estrogen, progesterone, and prolactin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(3), (2016), pp.1270-6.
7. **Baharvand-Ahmadi, B. and Asadi-Samani, M.**, A mini-review on the most important effective medicinal plants to treat hypertension in ethnobotanical evidence of Iran. *Journal of Nephro pharmacology*, 6(1), (2017), pp.38.
8. **Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M.**, New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *International journal of preventive medicine*, 5(12), (2014), 1487.

9. **Gholamian-Dehkordi, N., Luther, T., Asadi-Samani, M. and Mahmoudian-Sani, M. R.**, An overview on natural antioxidants for oxidative stress reduction in cancers; a systematic review. *Immunopathologia Persa*, 3(2), (2017), pp.e12.
10. **Samarghandian, S., Borji, A. and Tabasi, S.H.**, Effects of *Cichorium intybus* linn on blood glucose, lipid constituents and selected oxidative stress parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular and Hematological Disorders Drug Targets*, 13(3), (2013), pp. 231-236.
11. **Mansouri, E., Asadi-Samani, M., Kooti, W., Ghasemiboroon, M., Ashtary-Larky, D., Alamiri, F., Afrisham, R. and Noohi, Z.H.**, Anti-fertility effect of hydro-alcoholic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) seed in male Wistar rats. *Journal of Veterinary Research*, 60(3),(2016), pp.357-363.
12. **Samarghandian, S., Afshari, R. and Farkhondeh, T.**, Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat liver. *International Journal of Clinical and Experimental Medicineis*, 7(5), (2014),pp. 1449-1453.
13. **Kooti, W., Hasanzadeh-Noohi, Z., Sharafi-Ahvazi, N., Asadi-Samani, M. and Ashtary-Larky, D.**, Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 14(10), (2014),pp.732- 745.
14. **Bahmani, M., Sarrafchi, A., Shirzad, H. and Rafieian-Kopaei, M.**, Autism: Pathophysiology and promising herbal remedies. *Current Pharmaceutical Design*, 22(3),(2016), pp.277-285.
15. **Chaleshtori, J.S., Soreshjani, E.H., Reisi, F., Tabatabaieifar, M.A., Asadi-Samani, M., Zamanian, N. and Bahmani, M.**, Damage intensity of carvacrol on prostatic cancer cells line Du145 and molecular dynamic simulation of its effect on apoptotic factors. *International Journal of PharmTech Research*, 9(6), (2016),pp.261-273.
16. **Rafieian-Kopaei, M., Shahinfard, N., Rouhi-Boroujeni, H., Gharipour, M. and Darvishzadeh-Boroujeni, P.**, Effects of *Ferulago angulate* extract on serum lipids and lipid peroxidation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2014), 680-856.

17. **Baharvand-Ahmadi, B., Bahmani, M., Tajeddini, P., Naghdi, N. and Rafieian-Kopaei, M.**, An ethno-medicinal study of medicinal plants used for the treatment of diabetes. *Journal of Nephropathology*, 5(1),(2016), pp.44-50.
18. **Sarrafchi, A., Bahmani, M., Shirzad, H. and Rafieian-Kopaei, M.**, Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants. *Current Pharmaceutical Design*, 22(2),(2016), pp. 238-246
19. **Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., Rafieian, M.**, Plants antioxidants: From laboratory to clinic. *Journal of Nephropathology*, 2(2), (2016), pp.152-163.
20. **Pantsi, W. G., Bester, D. J., Esterhuysen, A. J., & Aboua, G.**, Dietary antioxidant properties of vegetable oils and nuts—the race against cardiovascular disease progression. In *Antioxidant-antidiabetic agents and human health*, (2014), pp. 209-238).
21. **Fatianni, F., d'Acerno, A., Ombra, MN, Amato, G., De Feo, V., Ayala-Zavala, JF, ... & Nazzaro, F.**, Composition en acides gras, activité antioxydante et anti-inflammatoire in vitro de cinq huiles de graines de *Prunus* pressées à froid, et leur effet anti-biofilm contre les bactéries pathogènes ,(2021), 8 .
22. **Ouzir, M., Bernoussi, S El Tabyaoui, M., et Taghzouti, K.** Almond oil: A comprehensive review of chemical composition, extraction methods, preservation conditions, potential health benefits, and safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, (2021), 20:3344–3387.
23. **Chaouali, N., Gana, I., Dorra, A., Khelifi, F., Nouioui, A., Masri, W., Belwaer, I., Ghorbel, H., & Hedhili, A.**, Potential toxic levels of cyanide in almonds (*Prunus amygdalus*), apricot kernels (*Prunus armeniaca*), and almond syrup,(2013), ISRN Toxicology.
24. **Dicenta, F., Martinez-Gomez, P., Grane, N., Martin, M. L., Leon, A., Canovas, J. A., & Berenguer, V.** Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2002), 50, 2149-2152.

25. **He, X. Y., Wu, L. J., Wang, W. X., Xie, P. J., Chen, Y. H., & Wang, F.**, Amygdalin-A pharmacological and toxicological review. *Journal of ethnopharmacology*, (2020), 254, 112717.
26. **Shi, J., Chen, Q., Xu, M., Xia, Q., Zheng, T., Teng, J., ... & Fan, L.**, Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: a review. *Cancer Medicine*, 8(6), (2019), 3004-3011.
27. **Moradi, B., Heidari-Soureshjani, S., Asadi-Samani, M., & Yang, Q.**, A systematic review of phytochemical and phytotherapeutic characteristics of bitter almond. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, (2017), 7, 1-9.
28. **Quézel, P., & Santa, S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales(1962).
29. **Rosengarten Jr, F.** The book of edible nuts. Courier Corporation(2004).
30. **En ligne Ladizinsky, G.**, Sur l'origine de l'amandier. *Ressources génétiques et évolution des cultures* , 46 (2), (1999),143-147.
31. FAOSTAT. (2020). Crops by countries/years
<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>
32. **Potter, D., Eriksson, T., Evans, RC, Oh, S., Smedmark, JEE, Morgan, DR, ... & Campbell, CS .**, Phylogénie et classification des Rosacées. *Systématique et évolution des plantes* , 266 (1),(2007), 5-43.
33. **Horvath, A., Balsemin, E., Barbot, J. C., Christmann, H., Manzano, G., Reynet, P., ... & Mariette, S.** Phenotypic variability and genetic structure in plum (*Prunus domestica* L.), cherry plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and sloe (*P. spinosa* L.). *Scientia Horticulturae*, 129(2), (2011), 283-293.
34. **Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M. W., Christenhusz, M. J., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., ... & Stevens, P. F.**, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical journal of the Linnean Society*, 181(1), (2016), 1-20.

35. **Hammiche, V., Merad, R., & Azzouz, M.**, Amandier amer. In *Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen*, (2013), (pp. 29-37).
36. **En ligne Paquereau, J.** Au jardin des plantes de la Bible : botanique, symboles et usages. CNPF-IDF(2016).
37. **Singh, D., Gohil, K.J., Rajput, R.T., & Sharma, V.**, Almond (*Prunus amygdalus* Batsch.): A Latest Review on Pharmacology and Medicinal Uses. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(7), (2022), 3301-3308
38. **Alaoui, S. B., Yasuehi, A. J. I. R. O., & JICA-DERD, I. H. I.** Guide Pratique pour la Fertilisation Raisonnée des Principales Cultures au Maroc(2005).
39. **Boulif, M.**, A review of research on diseases and pests of almonds in Morocco. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, (119), (2016), 199-204.
40. **Belaid, D.** Algérie: Autosuffisance en légumes secs. *Collections brochures agronomiques*(2018).
41. **Natić, M., Zagorac, DD, Ćirić, I., Meland, M., Rabrenović, B., & Akšić, MF** ., Huiles pressées à froid du genre *Prunus*. Dans *Huiles pressées à froid* ,(2020), pp. 637-658.
42. FAOSTAT. (2016). Crops by countries/years
43. **Borràs, E., Amigo, J. M., van den Berg, F., Boqué, R., & Busto, O.**, Fast and robust discrimination of almonds (*Prunus amygdalus*) with respect to their bitterness by using near infrared and partial least squares-discriminant analysis. *Food Chemistry*, (2014), 153, 15–19.
44. **Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Howad, W., Arus, P., & Gradziel, T. M.**, Almonds. In C. R. Kole (Ed.). *Genome mapping and molecular breeding. Fruits & nuts Vol. 4*, (2007), pp.229–242).
45. **Yada, S., Huang, G., & Lapsley, K.**, Natural variability in the nutrient composition of California-grown almonds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(2), (2013), 80-85.
46. **Zhang, N., Zhang, Q. A., Wei, C. X., & Fan, X. H.**, Aqueous two-phase system for the extraction of amygdalin from the debitterized water of apricot kernels. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), (2019), 527-535.

47. **Harris, L. J., & Ferguson, L.**, Improving the safety of almonds and pistachios. In L. J. Harris (Ed.), *Improving the safety and quality of nuts*,(2013), pp. 350–378.
48. **Gou, P., Diaz, I., Guerrero, L., Valero, A., Arnau, J., & Romero, A.**, Physico-chemical and sensory property changes in almonds of Desmayo Largueta variety during toasting/Cambios en las propiedades físico-químicas y sensoriales de almendras de la variedad Desmayo Largueta durante el tostado. *Food Science and Technology International*,(2000), 6(1), 1–7.
49. **Hojjati, M., Lipan, L., & Carbonell-Barrachina, Á. A.**, Effect of roasting on physicochemical properties of wild almonds (*Amygdalus scoparia*). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(9), (2016), 1211–1220.
50. **Kaveh, M., Jahanbakhshi, A., Abbaspour-Gilandeh, Y., Taghinezhad, E., & Moghimi, M. B. F.**, The effect of ultrasound pretreatment on quality, drying, and thermodynamic attributes of almond kernel under convective dryer using ANNs and ANFIS network. *Journal of Food Process Engineering*, (2018),41(7).
51. **Piscopo, A., Romeo, F. V., Petrovicova, B., & Poiana, M.** Effect of the harvest time on kernel quality of several almond varieties (*Prunus dulcis* (Mill.) DAWebb). *Scientia Horticulturae*, 125(1),(2010), 41–46.
52. **Femenia, A., Garcia-Marin, M., Simal, S., Rossello, C., & Blasco, M.**, Effects of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) oil extraction on the cell wall composition of almond fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), (2001),5828–5834.
53. **Leo, L., Rescio, L., Ciurlia, L., & Zacheo, G.** Supercritical carbon dioxide extraction of oil and α -tocopherol from almond seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(13), (2005), 2167–2174.
54. **Marrone, C., Poletto, M., Reverchon, E., & Stassi, A.**, Almond oil extraction by supercritical CO₂: Experiments and modelling. *Chemical Engineering Science*, 53(21), (1998), 3711–3718.
55. **Savoire, R., Lanoiselle, J. L., & Vorobiev, E.**, Mechanical continuous oil expression from oilseeds: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), (2013), 1–16.

56. **Martinez, M. L., Bordon, M. G., Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P. D., & Maestri, D.**, Walnut and almond oil screw-press extraction at industrial scale: Effects of process parameters on oil yield and quality. *Grasas Y Aceites*, 68 (4), (2017), e216.
57. **Ozcan, M.M., Endes, Z., & Er, F.**, Physical and chemical properties of some seed and kernel oils. *Asian Journal of Chemistry*, 22(8), (2010), 6531-6536.
58. **Joshi, D. R., & Adhikari, N.** An overview on common organic solvents and their toxicity. *Journal of Pharmaceutica Research International*, 28(3), (2019), 1-18.
59. **Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Fabiano Tixier, A. S.**, Review of alternative solvent for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16), (2019), 3007.
60. **Sovilj, M. N.** (2010). Critical review of supercritical carbon dioxide extraction of selected oil seeds. *Acta periodica technologica*, (41), (2010), 105-120.
61. **Dassoff, E. S., & Li, Y. O.**, Mechanisms and effects of ultrasound-assisted supercritical CO₂ extraction. *Trends in food science & technology*, 86, (2019), 492-501.
62. **Riera, E., Golás, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., García-Reverter, J., & Subirats, S.**, Effect of high-intensity ultrasound on the particulate almonds oil extraction kinetics using supercritical CO₂. In 6th International Symposium on Supercritical Fluids (April, 2003) pp. 28-30.
63. **Roncero, J. M., Alvarez-Orti, M., Pardo-Gimenez, A., Gomez, R., Rabadan, A., & Pardo, J. E.**, Almond virgin oil: Parameters of regulated physicochemical quality and stability. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 93(4), (2016), 237-243.

64. **Zhu, Y., Wilkinson, K. L., & Wirthensohn, M.**, Changes in fatty acid and tocopherol content during almond (*Prunus dulcis*, cv. Nonpareil) kernel development. *Scientia Horticulturae*, 225, (2017),150-155.
65. **Grundy, M. M. L., Lapsley, K., & Ellis, P. R.**, A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(9), (2016), 1937-1946.
66. **Kodad, O., Socias i Company, R., & Alonso, J. M.**, Genotypic and environmental effects on tocopherol content in almond. *Antioxidants*, 7(1), (2018), 6.
67. **Matthäus, B., Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Adiamo, O. Q., Alsawmahi, O. N., Ghafoor, K., & Babiker, E. E.**, Effect of the harvest time on oil yield, fatty acid, tocopherol and sterol contents of developing almond and walnut kernels. *Journal of Oleo Science*, 67(1), (2018),39-45.
68. **Matthäus, B., Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Adiamo, O. Q., Alsawmahi, O. N., Ghafoor, K., & Babiker, E. E.**, Effect of the harvest time on oil yield, fatty acid, tocopherol and sterol contents of developing almond and walnut kernels. *Journal of Oleo Science*, 67(1), (2018), 39-45.
69. **Imani, A., Hadadi, A., VAEIZI, M., & JOLFAEI, B.**, The effect of genotype and year on the average percentage of oil seed content of almond, (2012).
70. **Zhu, Y., Taylor, C., Sommer, K., Wilkinson, K., & Wirthensohn, M.** Influence of deficit irrigation strategies on fatty acid and tocopherol concentration of almond (*Prunus dulcis*). *Food Chemistry*, 173, (2015)., 821–826.
71. **Wirthensohn, M.** New cultivars from the Australian almond breeding program. *HortScience*, 55(5), (2020), 738-740.
72. **Zamany, A. J., Samadi, G. R., Kim, D. H., Keum, Y. S., & Saini, R. K.** Comparative study of tocopherol contents and fatty acids composition in twenty almond cultivars of Afghanistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(6), (2017), 805-817.
73. **Kodad, O., Fernández-Cuesta, Á., Karima, B., Velasco, L., Ercişli, S., & RAFEL SOCIAS i COMPANY.** Natural variability in phytosterols in almond (*Prunus amygdalus*) trees growing under a southern Mediterranean climate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(5), (2015), 543-549.

74. **Ayadi, M., Ghrab, M., Gargouri, K., Elloumi, O., Zribi, F., Ben Mimoun, M., Boulares, C., & Guedri, W.** Kernel characteristics of almond cultivars under rainfed conditions. *Acta Horticulturae*, 726, (2006), 377–381.
75. **Özcan, M. M., Matthäus, B., Aljuhaimi, F., Mohamed Ahmed, I. A., Ghafoor, K., Babiker, E. E., ... & Alqah, H. A.** Effect of almond genotypes on fatty acid composition, tocopherols and mineral contents and bioactive properties of sweet almond (*Prunus amygdalus* Batsch spp. dulce) kernel and oils. *Journal of Food Science and Technology*, 57(11), (2020), 4182-4192.
76. **Sathe, S. K., Seeram, N. P., Kshirsagar, H. H., Heber, D., & Lapsley, K. A.** Fatty acid composition of California grown almonds. *Journal of food science*, 73(9), (2008), C607-C614.
77. **Maestri, D., Martínez, M., Bodoira, R., Rossi, Y., Oviedo, A., Pierantozzi, P., & Torres, M.** Variability in almond oil chemical traits from traditional cultivars and native genetic resources from Argentina. *Food chemistry*, 170, (2015), 55-61.
78. **Özcan, M. M., Ünver, A., Erkan, E., & Arslan, D.** Characteristics of some almond kernel and oils. *Scientia Horticulturae*, 127(3), (2011), 330-333.
79. **Natić, M., Zagorac, D. D., Ćirić, I., Meland, M., Rabrenović, B., & Akšić, M. F.** Cold pressed oils from genus *Prunus*. In *Cold pressed oils*,(2020), pp. 637-658. Academic Press.
80. **Saura-Calixto, F.** Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), (1998), 4303-4306.
81. **Garcia-Pascual, P., Mateos, M., Carbonell, V., & Salazar, D. M.** Influence of storage conditions on the quality of shelled and roasted almonds. *Biosystems engineering*, 84(2), (2003), 201-209.
82. **Abdallah, A., Ahumada, M. H., & Gradziel, T. M.** Oil content and fatty acid composition of almond kernels from different genotypes and California production regions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(6), (1998), 1029-1033.
83. **Piscopo, A., Romeo, F. V., Petrovicova, B., & Poiana, M.** Effect of the harvest time on kernel quality of several almond varieties (*Prunus dulcis* (Mill.) DA Webb). *Scientia Horticulturae*, 125(1), (2010), 41-46.
84. **Miraliakbari, H., & Shahidi, F.** Oxidative stability of tree nut oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), (2008), 4751-4759.

85. **Dicenta, F., Martínez-Gómez, P., Grané, N., Martín, M. L., León, A., Cánovas, J. A., & Berenguer, V.** Relationship between cyanogenic compounds in kernels, leaves, and roots of sweet and bitter kernelled almonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), (2002), 2149-2152.
86. **Górnaś, P., & Rudzińska, M.** Seeds recovered from industry by-products of nine fruit species with a high potential utility as a source of unconventional oil for biodiesel and cosmetic and pharmaceutical sectors. *Industrial Crops and Products*, 83, (2016), 329-338.
87. **Rabadán, A., Álvarez-Ortí, M., Gómez, R., de Miguel, C., & Pardo, J. E.** Influence of genotype and crop year in the chemometrics of almond and pistachio oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), (2018), 2402-2410.
88. **Barreira, J. C., Casal, S., Ferreira, I. C., Peres, A. M., Pereira, J. A., & Oliveira, M. B. P.** Supervised chemical pattern recognition in almond (*Prunus dulcis*) Portuguese PDO cultivars: PCA-and LDA-based triennial study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), (2012), 9697-9704.
89. **Martin-Carratala, M. L., Llorens-Jordá, C., Berenguer-Navarro, V., & Grané-Teruel, N.** Comparative study on the triglyceride composition of almond kernel oil. A new basis for cultivar chemometric characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), (1999), 3688-3692.
90. **Azzi, A.** Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biology*, 26, (2019), 101259.
91. **Kodad, O., Estopanan, G., Juan, T., Mamouni, A., & Socias i Company, R.** Tocopherol concentration in almond oil: Genetic variation and environmental effects under warm conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), (2011), 6137-6141.
92. **López-Ortiz, C. M., Prats-Moya, S., Sanahuja, A. B., Maestre-Pérez, S. E., Grané-Teruel, N., & Martín-Carratalá, M. L.** Comparative study of tocopherol homologue content in four almond oil cultivars during two consecutive years. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), (2008), 144-151.
93. **Cabral, C. E., & Klein, M. R. S. T.** Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 109, (2017), 475-482.

94. **Esche, R., Müller, L., & Engel, K. H.** Online LC-GC-based analysis of minor lipids in various tree nuts and peanuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(47), (2013), 11636-11644.
95. **Maguire, L. S., O'sullivan, S. M., Galvin, K., O'connor, T. P., & O'brien, N. M.** Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *International journal of food sciences and nutrition*, 55(3), (2004), 171-178.
96. **Robbins, K. S., Shin, E. C., Shewfelt, R. L., Eitenmiller, R. R., & Pegg, R. B.** Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(22), (2011), 12083-12092.
97. **Fernandes, G. D., Gómez-Coca, R. B., Pérez-Camino, M. D. C., Moreda, W., & Barrera-Arellano, D.** Chemical characterization of major and minor compounds of nut oils: almond, hazelnut, and pecan nut. *Journal of Chemistry*, (2017).
98. **Franklin, L. M., & Mitchell, A. E.** Review of the sensory and chemical characteristics of almond (*Prunus dulcis*) flavor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(10), (2019), 2743-2753.
99. **Lee, J., Xiao, L., Zhang, G., Ebeler, S. E., & Mitchell, A. E.** Influence of storage on volatile profiles in roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(46), (2014), 11236-11245.
100. **Navarro, V. B., Teruel, N. G., & Carratalá, M. M.** Oxidation stability of almond oil. In *III International Symposium on Pistachios and Almonds 591*, (2001, May), pp. 125-131.
101. **Raisi, M., Ghorbani, M., Mahoonak, A. S., Kashaninejad, M., & Hosseini, H.** Effect of storage atmosphere and temperature on the oxidative stability of almond kernels during long term storage. *Journal of Stored Products Research*, 62, (2015), 16-21.
102. **Severini, C., Gomes, T., De Pilli, T., Romani, S., & Massini, R.** Autoxidation of packed almonds as affected by Maillard reaction volatile compounds derived from roasting. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), (2000)., 4635-4640.
103. **Farzaei, M. H., Shams-Ardekani, M. R., Abbasabadi, Z., & Rahimi, R.** Scientific evaluation of edible fruits and spices used for the treatment of peptic ulcer in traditional Iranian medicine. *International Scholarly Research Notices*, (2013).

104. **Mikaili, P., Shayegh, J., Sarahroodi, S., & Sharifi, M.** Pharmacological properties of herbal oil extracts used in Iranian traditional medicine. *Adv Environ Biol*, 6(1), (2012), 153-158.
105. **Anwar, M., Shousha, W. G., El-Mezayen, H. A., Awadallah, R., El-Wassef, M., Nazif, N. M., & El-Bana, M. A.** Almond oil and extracted diosmin as prophylaxis for the endothelial dysfunction in diabetic rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(11), (2014)., 184-194.
106. **Atef, A. A.** Therapeutic impacts of almond oil and olive oil on cholesterol dynamics and oxidative status in rats fed on atherogenic diet: Mechanism of action. *Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 32(1), (2014), 1-18.
107. **Kato, K., Vo, P. H., Furuyashiki, T., Kamasaka, H., & Kuriki, T.** Co-ingestion of whole almonds and almond oil with carbohydrate suppresses postprandial glycaemia in mice in an insulin-dependent and insulin-independent manner. *Journal of nutritional science*, (2019), 8.
108. **Gorji, N., Moeini, R., & Memariani, Z.** Almond, hazelnut and walnut, three nuts for neuroprotection in Alzheimer's disease: A neuropharmacological review of their bioactive constituents. *Pharmacological research*, 129, (2018), 115-127.
109. **Pribis, P., & Shukitt-Hale, B.** Cognition: the new frontier for nuts and berries. *The American journal of clinical nutrition*, 100(suppl_1), (2014), 347S-352S.
110. **Al-Attar, A.M.** Therapeutic influences of almond oil on male rats exposed to a sublethal concentration of lead. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), (2020), 581–587.
111. **Sultana, Y., Kohli, K., Athar, M., Khar, R. K., & Aqil, M.** Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B–induced cutaneous photoaging in mice. *Journal of cosmetic dermatology*, 6(1),(2007),14-19.
112. **Navaee, M., & Rakhshkhorshid, M.** Comparing the effect of foot massage with grape seed oil and sweet almond oil on physiological leg edema in primigravidae: A randomized clinical trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2020).
113. **Habibzadeh, H., Dalavan, O. W., Alilu, L., Wardle, J., Khalkhali, H., & Nozad, A.** Effects of foot massage on severity of fatigue and quality of life in hemodialysis patients: a randomized controlled trial. *International journal of community based nursing and midwifery*, 8(2), (2020),92.

114. **Chang, S. Y.** Effects of aroma hand massage on pain, state anxiety and depression in hospice patients with terminal cancer. *Journal of Korean Academy of Nursing*, 38(4),(2008), 493-502.
115. **Kyle, G.** Evaluating the effectiveness of aromatherapy in reducing levels of anxiety in palliative care patients: results of a pilot study. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 12(2), (2006),148-155.
116. **Moradi, M., Khachian, A., Amini Behbahani, F., Saatchi, K., & Haghani, H.** The effect of aromatherapy by inhalation and massage on radiotherapy-induced fatigue in patients with cancer. *Journal of Client-Centered Nursing Care*, 6(2) ,(2020), 79-86.
117. **Wirthensohn, M. G., Chin, W. L., Franks, T. K., Baldock, G., Ford, C. M., & Sedgley, M.** Characterising the flavour phenotypes of almond (*Prunus dulcis* Mill.) kernels. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(4),(2008), 462-468.
118. **Tisserand, R., & Young, R.** Constituent profiles. In *Essential oil safety*,(2014),pp. 483–647.
119. **Ruangkanchanasetr, S., Wananukul, V., & Suwanjutha, S.** Cyanide poisoning, 2 cases report and treatment review. *Journal-Medical Association of Thailand*, 82, (1999), S162-S167.
120. **Sanchez-Verlaan, P., Geeraerts, T., Buys, S., Riu-Poulenc, B., Cabot,C., Fourcade,O.,Megarbane, B.,&Genestal,M.** An unusual cause of severe lactic acidosis: Cyanide poisoning after bitter almond ingestion. *Intensive Care Medicine*, 37(1),(2011),168–169.
121. **Pavlović, N., Vidović, S., Vladić, J., Popović, L., Moslavac, T., Jakobović, S., & Jokić, S.** Recovery of tocopherols, amygdalin, and fatty acids from apricot kernel oil: Cold pressing versus supercritical carbon dioxide. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), (2018),1800043.
122. **Bai, S. H., Brooks, P., Gama, R., Nevenimo, T., Hannet, G., Hannet, D., ... & Wallace, H. M.** Nutritional quality of almond, canarium, cashew and pistachio and their oil photooxidative stability. *Journal of food science and technology*, 56(2), (2019),792-798.
123. **Esfahlan, A. J., Jamei, R., & Esfahlan, R. J.** The importance of almond (*Prunus amygdalus* L.) and its by-products. *Food Chemistry*, 120(2),(2010), 349–360.

124. **Othman, L., Sleiman, A., & Abdel-Massih, R. M.** Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. *Frontiers in microbiology*, 10, (2019), 911.
125. **Satchanska, G.** Antibacterial activity of plant polyphenols. In *Secondary Metabolites*. (2022).
126. **Haque, M.** Antibiotic stewardship, antimicrobials resistance, and rational use of medicine. *Australasian Medical Journal (Online)*, 10(8), (2017),743.
127. **Radulovic, N. S., Blagojevic, P. D., Stojanovic-Radic, Z. Z., & Stojanovic, N. M.** Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current medicinal chemistry*, 20(7), (2013), 932-952.
128. **Cowan, M. M.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), (1999),564-582.
129. **Lefer, D. J., & Granger, D. N.** Oxidative stress and cardiac disease. *The American journal of medicine*, 109(4), (2000), 315-323.
130. **MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M. L.** Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), (2006), 2046-2056.
131. **Salazar, M., Pariente, J. A., Salido, G. M., & González, A.** Ethanol induces glutamate secretion by Ca²⁺ mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes. *Neurochemistry international*, 52(6), (2008),1061-1067.
132. **Santos-Sánchez, N. M., Salas-Coronado, R., VillanuevaCañongo, C., & Hernández-Carlos, B.** Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*. IntechOpen.(2019).
133. **Favier, A.** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), (2003),863-832.
134. **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K.** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), (2005),4290-4302.
135. **Zeraik, M. L., Serteyn, D., Deby-Dupont, G., Wauters, J. N., Tits, M., Yariwake, J. H., ... & Franck, T.** Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*, 128(2), (2011), 259-265.
136. **Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring

- the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4),(1993),407-412.
137. **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), (1995),25-30.
 138. **Pecoits-Filho, R., Abensur, H., Betônico, C. C., Machado, A. D., Parente, E. B., Queiroz, M., ... & Vencio, S.** Interactions between kidney disease and diabetes: dangerous liaisons. *Diabetology & metabolic syndrome*, 8(1), (2016), 1-21.
 139. **Canivell, S., & Gomis, R.** Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity reviews*, 13(4-5), (2014),403-407.
 140. **Nazaruk, J., & Borzym-Kluczyk, M.** The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochemistry Reviews*, 14(4), (2015),675-690.
 141. **Adeloye, D., Ige, J. O., Aderemi, A. V., Adeleye, N., Amoo, E. O., Auta, A., & Oni, G.** Estimating the prevalence, hospitalisation and mortality from type 2 diabetes mellitus in Nigeria: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 7(5), (2017), e015424.
 142. **Al-Abbasi, T. M., Al-Farhan, A., Al-Khulaidi, A. W., Hall, M., Llewellyn, O. A., Miller, A. G., & Patzelt, A.** Important plant areas in the Arabian Peninsula. *Edinburgh Journal of Botany*, 67(1), (2010),25-35.
 143. **Derosa, G., & Maffioli, P.** α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of medical science: AMS*, 8(5), (2012),899.
 144. **Kajaria, D., Tripathi, J., Tripathi, Y. B., & Tiwari, S.** In-vitro α amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug—Shirishadi. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 4(4), (2013), 206.
 145. **Naveen, J., & Baskaran, V.** Antidiabetic plant-derived nutraceuticals: a critical review. *European journal of nutrition*, 57(4), (2018),1275-1299.
 146. **Asghari, B., Zengin, G., Bahadori, M. B., Abbas-Mohammadi, M., & Dinparast, L.** Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: A natural remedy. *European Journal of Integrative Medicine*, 22,(2018),44-49.

147. **Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O.** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, (2014),244-251.
148. **Knopman, D. S., Petersen, R. C., & Jack, C. R.** A brief history of “Alzheimer disease”: Multiple meanings separated by a common name. *Neurology*, 92(22), (2019),1053-1059.
149. **Hippius, H., & Neundörfer, G.** The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience* (2022).
150. **Engelsma, T., Jaspers, M. W., & Peute, L. W.** Considerate mHealth design for older adults with Alzheimer's disease and related dementias (ADRD): A scoping review on usability barriers and design suggestions. *International Journal of Medical Informatics*, 152, (2021),104494.
151. **Nicolas, G., Acuña-Hidalgo, R., Keogh, M. J., Quenez, O., Steehouwer, M., Lelieveld, S., & Hoischen, A.** Somatic variants in autosomal dominant genes are a rare cause of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(12), (2018),1632-1639.
152. **Menghani, Y. R., Bhattad, D. M., Chandak, K. K., Taksande, J. B., & Umekar, M. J.** A Review: Pharmacological and herbal remedies in The Management of Neurodegenerative disorder (Alzheimer's). *International Journal of Pharmacognosy and Life Science*, 2(1),(2021),18-27.
153. **Hashmi, A., Srivastava, V., Kalam, S. A., & Mishra, D. K.** Alzheimer's Disease: An Insightful Review on the Future Trends of the Effective Therapeutics(2022).
154. **Santos, C. Y., Snyder, P. J., Wu, W. C., Zhang, M., Echeverria, A., & Alber, J.** Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: a review and synthesis. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 7, (2017), 69-87.
155. **Thakur, A. K., Kamboj, P., Goswami, K., & Ahuja, K.** Pathophysiology and management of Alzheimer's disease: An overview. *J. Anal. Pharm. Res*, 7(1) (2018).

156. **Galasko, D., Schmitt, F., Thomas, R., Jin, S., Bennett, D., & Ferris, S.** Detailed assessment of activities of daily living in moderate to severe Alzheimer's disease. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 11(4),(2005), 446-453.
157. **Kerppers, F. K., Cordeiro, M. E. R., Mazur, T. B., Bittencourt, H., da Luz, K. P., Hosni, A. P., ... & Julik, A. D.** Pain neuromodulation exerted by *Ruta graveolens* aqueous extract in experimental models of nociception. *Brazilian Journal of Development*, 7(4), (2021), 43667-43682.
158. **Jost, B. C., & Grossberg, G. T.** The evolution of psychiatric symptoms in Alzheimer's disease: a natural history study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 44(9), (1996),1078-1081.
159. **Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Tortelli, R., Santamato, A., & Logroscino, G.** Amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease in the time of prevention trials: the way forward. *Expert review of clinical immunology*, 10(3), (2014),405-419.
160. **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), (1961),88-95.
161. **Karim, N., Khan, I., Khan, W., Khan, I., Khan, A., Halim, S. A., ... & Al-Harrasi, A.** Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of asparacosin a involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines inhibition: An in-vitro, in-vivo, and in-silico approach. *Frontiers in immunology*, 10, (2019), 581.
162. **Al-Harrasi, A.** Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activities of Asparacosin A Involve Selective Cyclooxygenase 2 and Inflammatory Cytokines Inhibition: An in-vitro, in-vivo, and in-silico Approach(2020).
163. **Yang, M., Wang, Y., Patel, G., Xue, Q., Njateng, G. S. S., Cai, S., ... & Kai, G.** In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of different extracts from *Epigynum auritum* through down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 261, (2020),113105.
164. **Eze, F. I., Uzor, P. F., Ikechukwu, P., Obi, B. C., & Osadebe, P. O.** In vitro and in vivo models for anti-inflammation: An evaluative review. *INNOSC Theranostics and Pharmacological Sciences*, 2(2), (2019), 3-15.
165. **Lim, H. J., Bak, S. G., Park, E. J., Ku, S. K., Lee, S., Lee, S. W., ... & Rho, M. C.** Retrofractamide C derived from *Piper longum* alleviates xylene-induced

- mouse ear edema and inhibits phosphorylation of ERK and NF- κ B in LPS-induced J774A. 1. *Molecules*, 25(18), (2020),4058.
166. **Buso, P., Radice, M., Baldisserotto, A., Manfredini, S., & Vertuani, S.** Guidelines for the development of herbal-based sunscreen. *Herbal medicine*, 43-61. Dutra, E. A., Oliveira, D. A. G. D. C., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Santoro, M. I. R. M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, (2017),381-385.
167. **Dutra, E. A., Oliveira, D. A. G. D. C., Kedor-Hackmann, E. R. M., & Santoro, M. I. R. M.** Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, (2004),381-385.
168. **Azevedo, J. S., Viana Jr, N. S., & Soares, C. D. V.** UVA/UVB sunscreen determination by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry. *// Farmaco*, 54(9), (1999),573-578.
169. **Mansur, M. A., Ong, K. C. G., & Paramasivam, P.** Shear strength of fibrous concrete beams without stirrups. *Journal of structural engineering*, 112(9), (1986), 2066-2079.
170. ISO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of density, 6882 (1987)
171. ISO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of refractive index value, 6320 (1983)
172. ISO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of ultraviolet absorbance expressed as specific UV extinction, 3656 (2011)
173. ISO, Animal and Vegetable fats and oils. Determination of peroxide value. Iodometric (visual) endpoint determination, 3960(2007)
174. ISO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of acid value and acidity, 660 (2009)
175. ISO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of saponification value, 3657 (2002)
176. SO, Animal and vegetable fats and oils. Determination of iodine value, 3961 (2009)
177. ISO, Animal and Vegetables Fat and Oils. Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters. Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids.

- International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 12966-2 (2011)
178. **Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., & Adlouni, A.** Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer investigation*, 24(6), (2006), 588-592.
179. ISO, Animal and Vegetables Fat and Oils. High Performance Liquid Chromatography of tocopherols. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland. 9936 (2002)
180. **Singleton, V. L., & Rossi, J. A.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3),(1965),144-158.
181. **Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V.** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), (2010),992-999.
182. **Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), (2007),816-822.
183. **Perez, C.** Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp*, 15, (1990),113-115.
184. **Blois, M. S.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), (1958),1199-1200.
185. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), (1999), 1231-1237.
186. **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), (2004), 7970-7981.

187. **Oyaizu, M.** Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), (1986), 307-315.
188. **Marco, G. J. A** rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), (1968),594-598.
189. **Verma, A. M., Kumar, A., Kavitha, D., & Anurag, K. B.** Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in-vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), (2011),1-6.
190. **Kandikattu, K., Bharath R. K, P., Venu P, R., Sunil K, K., Ranjith S.B.,** Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), .(2013),729-730.
191. **Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., & Zhang, H.** Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of ethnopharmacology*, 151(2), (2014),944-950.
192. **Martoja, R., & Martoja-Pierson, M.** Initiation aux techniques de l'histologie animale(1967).
193. **More, B. H., Sakharwade, S. N., Tembhurne, S. V., & Sakarkar, D. M.** Evaluation of Sunscreen activity of Cream containing Leaves Extract of *Butea monosperma* for Topical application. *International Journal of Research in Cosmetic Science*, 3(1), (2013),1-6.
194. **Hanine, H., Zinelabidine, L. H., H'ssaini, H., Ennahli, S., Latrache,H., & Hmid, I.** Phenotypic, morphological diversity and biochemical characterization of 14 almond cultivars from Morocco. *Moroccan Journal of Chemistry*, 3(3), (2015),394–406.
195. **Čolić, S. D., Akšić,M.M. F., Lazarević, K. B., Zec, G. N., Gašić, U.M.,Zagorac, D. Č. D., & Natić, M. M.** Fatty acid and phenolic profiles of almond grown in Serbia. *Food Chemistry*, 234, (2017), 455–463.
196. **Askin, M. A., Balta, M. F., Tekintas, F. E., Kazankaya, A., & Balta, F.** Fatty acid composition affected by kernelweight in almond [*Prunus dulcis* (Mill.)DAWebb.] genetic resources. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(1), (2007),7–12.

197. **EL Ayeb-Zakhama, A., Chahdoura, H., Ziani, B. E. C., Snoussi, M., Khemiss, M., Flamini, G., & Harzallah-Skhiri, F.** Ailanthus altissima (Miller)., Swingle seed oil: chromatographic characterization by GC-FID and HS-SPME-GC-MS, physicochemical parameters, and pharmacological bioactivities. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(14), (2019),14137-14147.
198. **Deng, J., Liu, Q., Zhang, Q., Zhang, C., Liu, D., Fan, D., & Yang, H.** Comparative study on composition, physicochemical and antioxidant characteristics of different varieties of kiwifruit seed oil in China. *Food chemistry*, 264, (2018), 411-418.
199. **Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., & Özcan, M. M.** Characterization of physico-chemical and bioactive properties of oils of some important almond cultivars by cold press and soxhlet extraction. *Journal of food science and technology*, 57(3), (2020),955-961.
200. **Dezashibi, Z., Azadmard-Damirchi, S., & Piravi-Vanak, Z.** Effect of co-extraction of pomegranate seed oil with green tea leaves on the extraction yield and quality of extracted oil. *OCL*, 29, (2022), 25.
201. **Song, H. G., Choi, I., Lee, J. S., Chung, M. N., Yoon, C. S., & Han, J.** Comparative study on physicochemical properties of starch films prepared from five sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, (2021),758-767.
202. **Goli, S. A. H., Sahafi, S. M., Rashidi, B., & Rahimmalek, M.** Novel oilseed of *Dracocephalum kotschyi* with high n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acid ratio. *Industrial Crops and Products*, 43, (2013) ,188-193.
203. **Nayak, B. S., & Patel, K. N.** Physicochemical characterization of seed and seed oil of *Jatropha curcas* L. collected from Bardoli (South Gujarat). *Sains Malaysiana*, 39(6), (2010) ,951-955.
204. **Cerchiara, T., Chidichimo, G., Ragusa, M. I., Belsito, E. L., Liguori, A., & Arioli, A.** Characterization and utilization of Spanish Broom (*Spartium junceum* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 31(2), (2010), 423-426.
205. **Li, H., Ji, J., Yang, L., Lei, N., Wang, J., & Sun, B.** Structural and physicochemical property changes during pyroconversion of native maize starch. *Carbohydrate polymers*, 245, (2020), 116560.

206. **Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S. K., Ismail, M., & Salimon, J.** Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *European journal of scientific research*, 29(3), (2009), 396-403.
207. **Alimentarius, C.** Codex standard for named vegetable oils. Codex Stan 210, (2013), *FAO/WHO: Rome, Italy*.
208. **Yıldız, M., Gürcan, Ş. T., & Özdemir, M.** Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. *Lipid/Fett*, 100(3), (1998), 84-86.
209. **Keser, S., Demir, E., & Yılmaz, Ö.** Phytochemicals and Antioxidant Activity of the Almond Kernel (*Prunus dulcis* Mill.) from Turkey. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 36(3), (2014).
210. **Kalogeropoulos, N., & Tsimidou, M. Z.** Antioxidants in Greek virgin olive oils. *Antioxidants*, 3(2), (2014), 387-413.
211. **Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N.** Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, (2017), 1-16.
212. **El Bernoussi, S., Boujema, I., Harhar, H., Belmaghraoui, W., Matthäus, B., & Tabyaoui, M.** Evaluation of oxidative stability of sweet and bitter almond oils under accelerated storage conditions. *Journal of Stored Products Research*, 88, (2020), 101662.
213. **Zhong, Y., Zhang, Z., Chen, J., Niu, J., Shi, Y., Wang, Y., ... & Luan, M.** Physicochemical properties, content, composition and partial least squares models of *A. trifoliata* seeds oil. *Food chemistry: X*, 12, (2021), 100131.
214. **Acet, T.** Determining the phenolic components by using HPLC and biological activity of *Centaurea triumfetti*. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(1), (2021), 159-164.
215. **Chamli, D., Bootello, M. A., Bouali, I., Juhri, S., Boukhchina, S., & Martínez-Force, E.** Chemical characterization and thermal properties of kernel oils from Tunisian peach and nectarine varieties of *Prunus persica*. *Grasas y Aceites*, 68(3), (2017), e211-e211.
216. **Rapposelli, E., Rigoldi, M. P., Satta, D., Delpiano, D., Secci, S., & Porceddu, A.** Genetic, phenotypic, and commercial characterization of an almond collection from Sardinia. *Plants*, 7(4), (2018), 86.

217. **Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E., & Elvevoll, E. O.** Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), (2014), 3281-3290.
218. **Leaf, A.** Omega-3 fatty acids and prevention of arrhythmias. *Current opinion in lipidology*, 18(1), (2007), 31-34.
219. **Daniel, C. R., McCullough, M. L., Patel, R. C., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., Thun, M. J., & Calle, E. E.** Dietary intake of ω -6 and ω -3 fatty acids and risk of colorectal cancer in a prospective cohort of US men and women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(2), (2009), 516-525.
220. **Ouilly, J. T., Bazongo, P., Bougma, A., Kaboré, N., Lykke, A. M., Ouédraogo, A., & Bassolé, I. H. N.** Chemical composition, physicochemical characteristics, and nutritional value of *Lanneakerstingii* seeds and seed oil. *Journal of analytical methods in chemistry*, (2017).
221. **Kamal-Eldin, A.** Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(12), (2006), 1051-1061.
222. **Debbabi, O. S., Amar, F. B., Rahmani, S. M., Taranto, F., Montemurro, C., & Miazzi, M. M.** The Status of Genetic Resources and Olive Breeding in Tunisia. *Plants*, 11(13), (2022), 1759.
223. **Kodad, O., Sociasi Company, R., Prats, M. S., & López Ortiz, M. C.** Variability in tocopherol concentrations in almond oil and its use as a selection criterion in almond breeding. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(3), (2006), 501-507.
224. **Čolić, S., Basić, Z., Zec, G., Bakić, I., Rahović, D., Akšić, M. F., & Mickovski Stefanović, V.** The Effect of Changing Climatic Conditions on the Morphological Traits and Chemical Composition of Almond Kernels. *Horticulturae*, 8(6), (2022), 487.
225. **Zhu, Y., Wilkinson, K. L., & Wirthensohn, M.** Changes in fatty acid and tocopherol content during almond (*Prunus dulcis*, cv. Nonpareil) kernel development. *Scientia Horticulturae*, 225, (2017), 150-155.
226. **Kodad, O., Estopañán, G., Juan, T., Alonso, J. M., Espiau, M. T., & Company, R. S.** Oil content, fatty acid composition and

- tocopherol concentration in the Spanish almond genebank collection. *Scientia Horticulturae*, 177, (2014),99-107.
227. **El Bernoussi, S., Boujemaa, I., Harhar, H., Belmaghraoui, W., Matthäus, B., & Tabyaoui, M.** Evaluation of oxidative stability of sweet and bitter almond oils under accelerated storage conditions. *Journal of Stored Products Research*, 88, (2020),101662.
228. **Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N.** Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, (2017),1-16.
229. **Zahedi, H., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Sahebkar, A., Ranjbar, S. H., Najafi, A., Hosseini, S., ...& Shadnough, M.** Therapeutic effects of supplementation with Curcuminoids in critically ill patients receiving enteral nutrition: a randomized controlled trial protocol. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19(2), (2020),1609-1614.
230. **Telichowska, A., Kobus-Cisowska, J., Ligaj, M., Stuper-Szablewska, K., Szymanowska, D., Tichoniuk, M., & Szulc, P.** Polyphenol content and antioxidant activities of *Prunus padus* L. and *Prunus serotina* L. leaves: Electrochemical and spectrophotometric approach and their antimicrobial properties. *Open Chemistry*, 18(1), (2020),1125-1135.
231. **Kalogeropoulos, N., & Tsimidou, M. Z.** Antioxidants in Greek Virgin Olive Oils. *Antioxidants*, 3, (2014),387–413.
232. **Zeb, A.** A comprehensive review on different classes of polyphenolic compounds present in edible oils. *Food Research International*, 143, (2021), 110312.
233. **Li, D., Pfeiffer, T. W., & Cornelius, P. L.** Soybean QTL for yield and yield components associated with Glycine soja alleles. *Crop Science*, 48(2), (2008),571-581.
234. **Kumari, R.** Lipid Content And in vitro Antimicrobial Activity of Oil Seed of Some Indian Medicinal Plants.
235. **Badalamenti, N., Russi, S., Bruno, M., Maresca, V., Vaglica, A., Ilardi, V., ...& Basile, A.** Dihydrophenanthrenes from a sicilian accession of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge showed antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. *Plants*, 10(12), (2021), 2776.

236. **Nobre, C. B., de Sousa, E. O., de Lima Silva, J. M. F., Coutinho, H. D. M., & da Costa, J. G. M.** Chemical composition and antibacterial activity of fixed oils of *Mauritiaflexuosa* and *Orbignyasperiosa* associated with aminoglycosides. *European Journal of IntegrativeMedicine*, 23, (2018),84-89.
237. **Mukherjee, P. K., & Houghton, P. J.** The worldwide phenomenon of increased use of herbal products: opportunities and threats. *Evaluation of HerbalMedicinalProducts. Pharmaceutical Press, London, UK*, (2009), 12-3.
238. **Nobre, C. B., de Sousa, E. O., de Lima Silva, J. M. F., Coutinho, H. D. M., & da Costa, J. G. M.** Chemical composition and antibacterial activity of fixed oils of *Mauritiaflexuosa* and *Orbignyasperiosa* associated with aminoglycosides. *European Journal of IntegrativeMedicine*, 23, (2018), 84-89.
239. **Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., & Shiina, T.** Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International journal of molecular sciences*, 12(1), (2011), 462-475.
240. **Kim, Y. H., Lee, Y., Kim, S., Yeom, J., Yeom, S., Seok Kim, B., ...& Park, W.** The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in the formation of biofilms. *Proteomics*, 6(23), (2006), 6181-6193.
241. **Cushnie, T. T., & Lamb, A. J.** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), (2005),343-356.
242. **Baba, S. A., & Malik, S. A.** Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaemajacquemontii*Blume. *Journal of Taibah university for science*, 9(4), (2015) ,449-454.
243. **Şengün, İ. Y., &Yücel, E.** Antimicrobial properties of wild fruits. *BiologicalDiversity and Conservation*, 8(1), (2015), 69-77.
244. **Oulia, P., Saderi, H., Rasouli, I., & Sefidkon, F.** Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions, (2009).
245. **Ramadan, M. F., Asker, M. M. S., &Tadros, M.** Antiradical and antimicrobial properties of cold-pressed black cumin and cuminoils. *European Food Research and Technology*, 234(5), (2012), 833-844.

246. **Ibrahim, S. Y., El-Salam, A., & Magdy, M.** Anti-dermatophyte efficacy and environmental safety of some essential oils commercial and in vitro extracted pure and combined against four keratinophilic pathogenic fungi. *Environmental health and preventive medicine*, 20(4), (2015), 279-286.
247. **Shin, S., & Lim, S.** Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *Journal of applied microbiology*, 97(6), (2004), 1289-1296.
248. **Pandey, D. K.** Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Caesulia axillaris* Roxb. (Compositae). *Angew. Botanik*, 56, (1982), 259-267.
249. **Prasad, N. R., Anandi, C., Balasubramanian, S., & Pugalendi, K. V.** Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), (2004), 21-24.
250. **Ahmad, Z.** The uses and properties of almond oil. *Complementary therapies in clinical practice*, 16(1), (2010), 10-12.
251. **Tabassum, N., & Vidyasagar, G. M.** Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), (2013), 19-28.
252. **Zhang, Y. J., Gan, R. Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A. N., Xu, D. P., & Li, H. B.** Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*, 20(12), (2015), 21138-21156.
253. **Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbau, A., Fella, H., Abrini, J., & Dakka, N.** Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial pathogenesis*, 111, (2017), 41-49.
254. **El-Sawi, S. A., Ibrahim, M. E., & Ali, A. M.** In vitro cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of leaves of *Laurus nobilis* L. grown in Egypt and its chemical composition. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 3(1), (2009), 16-23.
255. **Fancello, F., Zara, S., Petretto, G. L., Chessa, M., Addis, R., Rourke, J. P., & Pintore, G.** Essential oils from three species of *Mentha* harvested in Sardinia: Chemical characterization and evaluation of their biological activity. *International journal of food properties*, 20(sup2), (2017), 1751-1761.

256. **Oliveira, I., Meyer, A. S., Afonso, S., Aires, A., Goufo, P., Trindade, H., & Gonçalves, B.** Phenolic and fatty acid profiles, α -tocopherol and sucrose contents, and antioxidant capacities of understudied Portuguese almond cultivars. *Journal of foodbiochemistry*, 43(7), (2019), e12887.
257. **Christodouleas, D. C., Fotakis, C., Nikokavoura, A., Papadopoulos, K., & Calokerinos, A. C.** Modified DPPH and ABTS assays to assess the antioxidant profile of untreated oils. *Food Analytical Methods*, 8(5), (2015), 1294-1302.
258. **Ananth, D. A., Deviram, G., Mahalakshmi, V., Sivasudha, T., & Tietel, Z.** Phytochemical composition and antioxidant characteristics of traditional cold pressed seed oils in South India. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, (2019), 416-421.
259. **Ramadan, M. F., & Moersel, J. T.** Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), (2006), 838-842.
260. **Janu, C., Kumar, D. S., Reshma, M. V., Jayamurthy, P., Sundaresan, A., & Nisha, P.** Comparative study on the total phenolic content and radical scavenging activity of common edible vegetable oils. *Journal of foodbiochemistry*, 38(1), (2014), 38-49.
261. **Grajzer, M., Szmalcel, K., Kuźmiński, Ł., Witkowski, M., Kulma, A., & Prescha, A.** Characteristics and antioxidant potential of cold-pressed oils—Possible strategies to improve oil stability. *Foods*, 9(11), (2020), 1630.
262. **Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, E. R., & Lyng, J.** Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chemistry*, 338, (2021), 128119.
263. **Bouhrim, M., Ouassou, H., Boutahiri, S., Daoudi, N. E., Mechchate, H., Gressier, B., ... & Bnouham, M.** *Opuntia adillenii* (Ker Gawl.) Haw., seeds oil antidiabetic potential using in vivo, in vitro, in situ, and ex vivo approaches to reveal its underlying mechanism of action. *Molecules*, 26(6), (2021), 1677.
264. **Tlili, N., Kirkan, B., & Sarikurkcu, C.** LC-ESI-MS/MS characterization, antioxidant power and inhibitory effects on α -amylase and tyrosinase of bioactive compounds from hulls of *Amygdalus communis*: The influence of the extracting solvents. *Industrial crops and products*, 128, (2019), 147-152.

265. **Ali, A., Ali, A., Warsi, M. H., & Ahmad, W.** Chemical characterization, antidiabetic and anticancer activities of *Santolinachamaecyparissus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8), (2021), 4575-4580.
266. **Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, E. R., & Lyng, J.** Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chemistry*, 338, (2021), 128119.
267. **Kato, E. T., Silverman, M. G., Mosenzon, O., Zelniker, T. A., Cahn, A., Furtado, R. H., ...& Wiviott, S. D.** Effect of dapagliflozin on heart failure and mortality in type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 139(22), (2019), 2528-2536.
268. **Collado-González, J., Grosso, C., Valentão, P., Andrade, P. B., Ferreres, F., Durand, T., ...& Gil-Izquierdo, Á.** Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by Spanish extra virgin olive oils: The involvement of bioactive compounds other than oleuropein and hydroxytyrosol. *Food chemistry*, 235, (2017), 298-307.
269. **Lekshmi, P. C., Arimboor, R., Indulekha, P. S., & Nirmala Menon, A.** Turmeric (*Curcuma longa* L.) volatile oil inhibits key enzymes linked to type 2 diabetes. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(7), (2012), 832-834.
270. **Daoudi, N. E., Bouhrim, M., Ouassou, H., Legssyer, A., Mekhfi, H., Ziyat, A., ...& Bnouham, M.** Inhibitory effect of roasted/unroasted *Arganiaspinosa* seeds oil on α -glucosidase, α -amylase and intestinal glucose absorption activities. *South African Journal of Botany*, 135, (2020), 413-420.
271. **Choudhury, H., Pandey, M., Hua, C. K., Mun, C. S., Jing, J. K., Kong, L., ...& Kesharwani, P.** An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: A systematic review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(3), (2018), 361-376.
272. **Rocha, S., Sousa, A., Ribeiro, D., Correia, C. M., Silva, V. L., Santos, C. M., ... & Freitas, M.** A study towards drug discovery for the management of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by chalcone derivatives. *Food & function*, 10(9), (2019), 5510-5520.

273. **Teng, H., & Chen, L.** α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), (2017),3438-3448.
274. **Su, J., Wang, H., Ma, C., Lou, Z., Liu, C., Rahman, M. T., ... & Nie, R.** Correction: Anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice. *Food & function*, 6(10), (2015) ,3400-3400.
275. **Liu, S., Lee, I. M., Song, Y., Van Denburgh, M., Cook, N. R., Manson, J. E., & Buring, J. E.** Vitamin E and risk of type 2 diabetes in the women's health study randomized controlled trial. *Diabetes*, 55(10), (2006), 2856-2862.
276. **Bonesi, M., Tenuta, M. C., Loizzo, M. R., Sicari, V., & Tundis, R.** Potential application of *Prunus armeniaca* L. and *P. domestica* L. leaf essential oils as antioxidant and of cholinesterases inhibitors. *Antioxidants*, 8(1), (2018),2.
277. **Senol, F. S., Orhan, I. E., Ozgen, U., Renda, G., Bulut, G., Guven, L., ...& Sekeroglu, N.** Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *South African Journal of Botany*, 102, (2016),102-109.
278. **Mihaylova, D., Desseva, I., Popova, A., Dincheva, I., Vrancheva, R., Lante, A., & Krastanov, A.** GC-MS metabolic profile and α -glucosidase-, α -amylase-, lipase-, and acetylcholinesterase-inhibitory activities of eight peach varieties. *Molecules*, 26(14), (2021),4183.
279. **Jabir, N. R., Khan, F. R., & Tabrez, S.** Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. *CNS neuroscience & therapeutics*, 24(9), (2018),753-762.
280. **Erdogan, M. K., Gecibesler, I. H., Yapar, Y., Gundogdu, R., Kirici, M., Behcet, L., & Taslimi, P.** Fatty acid composition, enzyme inhibitory effect, antioxidant and anticancer activity of extract from *Saponaria prostrata* WILLD. subsp. *anatolica* HEDGE. *Bioorganic Chemistry*, 113, (2021),105032.
281. **Opie, E. L.** On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *The Journal of experimental medicine*, 115(3), (1962),597.
282. **Harrabi, S., Ferchichi, A., Fellah, H., Feki, M., & Hosseinian, F.** Chemical composition and in vitro anti-inflammatory activity of wheat germ oil depending on the extraction procedure. *Journal of Oleo Science*, 70(8), (2021),1051-1058.

283. **Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., & Zhang, H.** Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *Journal of ethnopharmacology*, 151(2), (2014),944-950.
284. **Lekouaghet, A., Boutefnouchet, A., Bensuici, C., Gali, L., Ghenaiet, K., & Tichati, L.** In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots. *South African Journal of Botany*, 132, (2020),103-107.
285. **Pegoraro, N. S., Camponogara, C., Cruz, L., & Oliveira, S. M.** Oleic acid exhibits an expressive anti-inflammatory effect in croton oil-induced irritant contact dermatitis without the occurrence of toxicological effects in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, (2021),113486.
286. **Mostafa, E. S., Nawwar, M. A., Mostafa, D. A., Ragab, M. F., & Swilam, N.** **Karafsin**, a unique mono-acylated flavonoid apiofurnoside from the leaves of *Apium graveolens* var. *secalinum* Alef: In vitro and in vivo anti-inflammatory assessment. *Industrial Crops and Products*, 158, (2020),112901.
287. **Burlando, B., & Cornara, L.** Revisiting Amazonian plants for skin care and disease. *Cosmetics*, 4(3), (2017), 25.
288. **Sharma, S., Kumar, D., Singh, G., Monga, V., & Kumar, B.** Recent advancements in the development of heterocyclic anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 200, (2020),112438.
289. **Tamez-Pérez, H. E., Quintanilla-Flores, D. L., Rodríguez-Gutiérrez, R., González-González, J. G., & Tamez-Peña, A. L.** Steroid hyperglycemia: prevalence, early detection and therapeutic recommendations: a narrative review. *World journal of diabetes*, 6(8), (2015),1073.
290. **Sadiyah, E. R., Sakti, E. R. E., & Ratnasari, I.** SUNSCREEN ACTIVITY OF SUGAR PALM (*ARENCA PINNATA* (WURMB) MERR.) LEAF STALK ASHES EXTRACT. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 2(1), (2019), 62-70.
291. **Kaur, C. D., & Saraf, S.** In vitro sun protection factor determination of herbal oils used in cosmetics. *Pharmacognosy research*, 2(1), (2010),22.

292. **Badea, G., Lăcătușu, I., Badea, N., Ott, C., & Meghea, A.** Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 67, (2015), 18-24.
293. **Pardeike, J., Hommoss, A., & Müller, R. H.** Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International journal of pharmaceutics*, 366(1-2), (2009), 170-184.
294. **Ribeiro, A. R., Silva, S. S., & Reis, R. L.** Challenges and opportunities on vegetable oils derived systems for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, (2022), 112720.
295. **Lacatusu, I., Arsenie, L. V., Badea, G., Popa, O., Oprea, O., & Badea, N.,** New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers. *Industrial Crops and Products*, 123, (2018), 424-433.
296. **Wang, S. Q., Osterwalder, U., & Jung, K.,** Ex vivo evaluation of radical sun protection factor in popular sunscreens with antioxidants. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(3), (2011), 525-530.
297. **Rastogi, S. C.,** UV filters in sunscreen products– a survey. *Contact dermatitis*, 46(6), (2002), 348-351.
298. **De la Coba, F., Aguilera, J., Korbee, N., de Gálvez, M. V., Herrera-Ceballos, E., Álvarez-Gómez, F., & Figueroa, F. L.,** UVA and UVB photoprotective capabilities of topical formulations containing mycosporine-like amino acids (MAAs) through different biological effective protection factors (BEPFs). *Marine drugs*, 17(1), (2019), 55.
299. **Torres-Contreras, A. M., Garcia-Baeza, A., Vidal-Limon, H. R., Balderas-Renteria, I., Ramírez-Cabrera, M. A., & Ramirez-Estrada, K.,** Plant Secondary Metabolites against Skin Photodamage: Mexican Plants, a Potential Source of UV-Radiation Protectant Molecules. *Plants*, 11(2), (2022), 220.
300. **Oomah, B. D., Ladet, S., Godfrey, D. V., Liang, J., & Girard, B.,** Characteristics of raspberry (*Rubusidaeus L.*) seed oil. *Food chemistry*, 69(2), (2000), 187-193.