

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mohamed Khider Biskra

Faculté des Sciences et technologie

Département : Chimie industrielle

Réf : .....



جامعة محمد خيضر بسكرة

جامعة محمد خيضر بسكرة

كلية العلوم و التكنولوجيا

قسم: الكيمياء الصناعية

المرجع: .....

Thèse présentée en vue de l'obtention  
Du diplôme de  
**Doctorat en sciences en: Chimie Industrielle**

Spécialité (Option): Génie chimique

**Etude phytochimique et activité biologique  
d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L  
dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued  
Souf)**

Présentée par :  
**Salah Eddine LAOUINI**

Soutenue publiquement le 30/10/2014

**Devant le jury composé de :**

<i>Barkat Djamel</i>	<i>Professeur</i>	<i>Président</i>	<i>Université Mohamed khider Biskra</i>
<i>Ladjel Segni</i>	<i>Professeur</i>	<i>Directeur de thèse</i>	<i>Université Kasdi merbah d'Ouargla</i>
<i>Dendougui Hocine</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université Kasdi merbah d'Ouargla</i>
<i>Lanez Touhami</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université d'El Oued</i>
<i>Meghezzi Ahmed</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université Mohamed khider Biskra</i>
<i>Omari Mahmoud</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>Université Mohamed khider Biskra</i>

## Abstract

The date palm (*Phoenix dactylifera* L) consisted, for the people of southern Algeria, as tree of providence. Dates and their extracts are also used for many centuries as a medicine against allergy, inflammation, constipation and gastro protective; they also have a high antibacterial and antioxidant activity. However, no studies are conducted to evaluate the extract from the leaves of date palm (*Phoenix dactylifera* L) in point of view pharmacology effect. In this study we have evaluated the phytochemical composition, antioxidant antibacterial, antifungal and antimutagenic properties and anti-inflammatory properties determined by measuring the inhibition of nitric oxide (NO) production of leaves extract of three varieties Ghars, Deglet Nour and Hamraya from *Phoenix dactylifera* L. Moreover, the antidiabetic effect was evaluated by inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. According to the results, the extracts have very important values for polyphenols, flavanoids, flavonols, condensed tannin, anthocyanin and high antioxidant activity against DPPH, FRAP, ABTS,  $\text{OH}\cdot$ . Also the three extracts reveal a considerable antimicrobial potency and antifungal considerable activity. The three varieties exhibited significant anti-inflammatory effects using in-vitro inhibition of NO, exhibited potent antimutagenic high inhibitory level of the Ames response induced by the indirect mutagen 2- aminoanthracene and also displayed high inhibition actions against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. The results suggest that the leaves of the three selected varieties of *Phoenix dactylifera* L can be considered as a good source of natural antioxidant, antimicrobial and anti-inflammation drugs as well as potent antidiabetic medicine.

**Keywords:** *Phoenix dactylifera* L, leaves, Polyphenols, DPPH, Antidiabetic, Anti-inflammatory, antimicrobial, south Algeria.

## المخلص

تعرضنا في هذا العمل إلى استخلاص عصارات ثلاثة أنواع من ورق النخيل وهي دقلة نور و الغرس و الحمراية حيث كانت الإشكالية الأساسية مبنية على عدم وجود دراسة سابقة لهذه المستخلصات. تمثل شجرة النخيل (*Phoenix dactylifera* L) لسكان جنوب الجزائر أهمية حيوية للحياة وتستخدم أيضا منذ قرون كدواء ضد الحساسية و الإتهاب و الإمساك و أمراض المعدة و مضادات حيوية للجراثيم و الأكسدة . ومع ذلك لم يتم التطرق إلى أي دراسة لتقييم و تثمين أوراق هذه الشجرة و انصبت كل الدراسات حول ثمارها و هي التمر. إن فحوى هذا العمل هو دراسة تقييم و تثمين مستخلصات أوراق نخيل التمر في منظور تكوينها الكيميائي النباتي وفعاليتها ضد الجراثيم و لأكسدة و تأثيرها على الفطريات و كمضاد للالتهابات عن طريق قياس تثبيط أكسيد النيتريك (NO) . بالإضافة إلى ذلك قمنا بدراسة تأثيرها كمضاد السكري عن طريق تثبيط إنزيمات  $\alpha$  الأميليز و  $\alpha$  جلوكوزيداز. انطلاقا من النتائج المتحصل عليها وجدنا أن مستخلصات أوراق النخيل غنية بالمكونات الفيتوكيميائية كمادة البوليفينول و الفلافونويد و الفلافونول و الانثوسيانين كما أظهرت نشاط تثبيطي قوي كمضاد للأكسدة ضد الجذور الحرة ل DPPH و FRAP و ABTS و  $\text{OH}\cdot$ . كما تظهر المستخلصات نشاط فعال ضد البكتيريا و الفطريات . أظهرت الأصناف الثلاثة لها تأثيرات فعالة مضادة للالتهابات في تثبيط NO و تثبيط عال للطفور الناجمة عن 2-aminoanthracene و أيضا فعالية عالية لتثبيط  $\alpha$  الأميليز و  $\alpha$  جلوكوزيداز. اعتمادا إلى هذه النتائج يمكننا اعتبار أن مستخلصات أوراق الأصناف الثلاثة كمصدر هام و جيد لمضادات الأكسدة الطبيعية، للميكروبات و مضادة الالتهابات و للسكري.

## الكلمات المفتاحية

نخيل التمر، الفينولات، DPPH ، مضاد السكري، مضاد البكتيريا، مضاد الالتهاب، الجنوب الجزائري

## Remerciements

Arrivé au bout du chemin de ma thèse, je prends quelques temps pour regarder en arrière et voir un peu ce trajet que j'ai parcouru pendant les années afin d'exprimer tous mes remerciements, et si j'y arrive, mes sentiments à ceux qui m'ont accompagné et soutenu jusqu'à ce point précis de ma vie :

Pr. Segni LADJEL, non seulement pour son implication en tant que mon directeur de recherche, mais également pour m'avoir encouragé et soutenu pendant les années de mon doctorat. Son amour pour la recherche, sa gentillesse et sa patience m'ont aidé de finir ce travail et m'aideront encore dans mon cheminement de carrière.

Pr. Mohammed Ridha OUAHRANI le codirecteur du thèse pour la rigueur et un intérêt constant a dirigé ce travail avec beaucoup d'enthousiasme en me faisant bénéficier de ses compétences scientifiques. Je tiens à lui exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'attention qu'il a porté à cette thèse, pour les encouragements, pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée, sa constante disponibilité et la gentillesse dont il a fait preuve à mon égard.

Pr. LANEZ Touhami, directeur de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) et rédacteur en chef du "journal of fundamental and applied sciences", de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour effectuer une bonne partie de ce travail et poursuivre la recherche, puis m'a guidé pendant ces années de thèse avec sa grande expérience et ses précieux conseils.. Je le remercie vivement pour sa collaboration et sa présence parmi les jurys.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.

Je remercie vivement Monsieur DENDOUGUI Hocine, Professeur à département de chimie, faculté des Sciences de la matière à l'Université Kasdi Merbah Ouargla qui me fait l'honneur, malgré ses importantes charges, d'accepter de juger mes travaux de thèse en tant qu'examineur.

Je profite de cette occasion d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur: BARKAT Djamel , Professeur et chef de département de chimie industrielle, Faculté des Sciences et technologie à l'Université Mohamed Khider Biskra pour l'honneur qu'il me fait d'avoir

accepter de présider le jury de ma thèse malgré leurs nombreuses occupations et responsabilité.

Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à Monsieur OMARI Mahmoud Professeur à département de chimie, faculté des sciences de la matière; l'Université Mohamed Khider Biskra de l'honneur qu'il me fait d'avoir d'accepter de juger mes travaux de thèse en tant qu'examineur.

Trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour Monsieur MEGHEZZI Ahmed Professeur à département de chimie, faculté des sciences de la matière; l'Université Mohamed Khider Biskra pour l'honneur qu'il me font en acceptant de participer au Jury de cette thèse malgré leurs nombreuses occupations et charges.

Pr. Noureddine GHERRAF, pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'il a pu me fournir, les efforts, la gentillesse, et le support que j'ai reçu lors des moments les plus difficiles de ce travail.

Pr. BENHAOUA Boubaker Doyen du faculté des sciences et technologie à Université d'El Oued, de m'avoir encouragé afin de prendre des décisions importantes dans ma vie professionnelle. Merci de m'avoir fait autant voyager durant ma thèse, Tunisie et de m'avoir fait participer à des congrès internationaux, cela m'a permis d'échanger sur mes travaux de recherche. J'ai apprécié beaucoup votre amitié, votre dynamisme et votre bonne humeur tout au long de ma thèse.

Dr. Sonia MOKNI, laboratoire de traitement des eaux usées, Centre de recherche et technologie des eaux Hammam-lif en Tunisie, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire en pour effectuer les tests d'évaluation des activités antibactérienne et antifongique de ce travail. Je le remercie vivement pour sa collaboration.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS): Abdelkarim, Abdelhamid, Achour; et un merci particulier à Ali TLIBA qui m'a beaucoup aidé dans les démarches administratives au début de la thèse.

Et à tous ceux que j'aurais oublié bien involontairement, merci !

## Dédicace

*Je Dédie ce travail à*

*A la mémoire de ma mère que dieu repose son âme en paix*

*A mon père que dieu protège*

*En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui*

*est pour moi la meilleure des récompenses*

*A Radja mon épouse qui m'a toujours encouragé et à mes côtés pour me soutenir, pour m'aider dans la mesure du possible, mais surtout pour donner du goût à ma vie par sa*

*tendresse*

*A mes yeux Amjad et Sadok El Amine*

*A mes frères et mes amis*

# Sommaire

Introduction générale.....	01
Chapitre I	
Généralités et présentation de Phoenix Dactylifera L	
I.1. Introduction.....	04
I.2. Quelques mots d'histoire	
I.3. Situation de la culture du palmier dattier en Algérie.....	07
I.4. Passé et présent de la culture du palmier dattier en Algérie.....	07
I.5. Production du palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera</i> L).....	08
I.6. Diversité des espèces et des usages.....	09
I.7. Etude ethnobotanique de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	10
I.7.1. Taxonomie et systématique .....	10
I.7.2. Description générale des organes du palmier dattier	
A. Le système racinaire.....	12
B. Le tronc ou stipe.....	13
C Les bourgeo.....	13
D.les feuilles.....	16
I.7.3. L'Appareil de reproduction.....	16
I.7.3.1. Les spathes ou inflorescences.....	16
I.7.3.2. Les fleurs.....	16
I.7.3.3. Le fruit.....	16
I.7.3.4. Cycle végétatif.....	17
I.8. Exigences climatiques du palmier dattier.....	21
I.8.1. Les exigences climatiques.....	21
I.8.2. Les exigences édaphiques .....	22
I.8.3. Les exigences hydriques.....	22
I.9. Répartition géographique du <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	22
I.9.1. Dans le monde.....	22
I.9.2. En Algérie.....	23
I.10. Caractéristiques morphologiques des dattes des variétés sélectionnées.....	24
I.10.1. Deglet Nour.....	24

I.10.2. Ghars .....	26
I.10.3. Hamraya ou Deglet Hamra.....	27
I.11. Composition biochimique de la datte.....	27
I.11.1. Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe " .....	27
1.11.2.Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau " .....	34
1.12. Utilisations des dattes en médecine traditionnelle.....	35

## Chapitre II

### Etude phytochimique et pharmacologique des métabolites secondaires

II. 1.Présentation générale sur les polyphénols.....	36
II.1.1. Principales sources et utilisations actuelles des polyphénols.....	36
II.2.Classification des polyphénols.....	39
II.2.1.Polyphénols monomériques.....	39
Acides phénoliques.....	39
II.2.2. Les tanins .....	42
II.2.2.1. Les tanins hydrolysable.....	42
II.2.2.2. Les tanins condensés .....	43
II.3. Propriétés chimiques des polyphénols.....	44
II.3.1. Nucléophilie.....	45
II.4.2. Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives.....	46
II.5. Les polyphénols comme antioxydants.....	46
II.6. Propriétés thérapeutiques des polyphénols.....	47
II.6.1. Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques in vitro.....	48
II.6.2. Effet antiallergique.....	48
II.6.3. Effet anti-inflammatoire.....	49
II.6.4. Effet anti-ulcère.....	51
II.6.5. Propriétés anti-cancérigènes .....	53
II.6.6. Polyphénols et maladies cardio-vasculaires .....	55
II.7. les flavonoïdes .....	59
II.7.1. Généralités sur les flavonoïdes.....	62
II.7.2.Distribution et biosynthèse.....	64
II.7.2.1. Les flavonoïdes stricto sensu.....	60
II.7.2.2. Les flavanones.....	67
II.7.2.3. Les isoflavonoïdes.....	69

II.7.2.4. Les roténoïdes.....	82
II.7.2.4. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylé.....	83
II.7.3. Fonctions des flavonoïdes pour les plante.....	88
II.7.3.1. Rôle de protection contre le stress environnemental.....	88
II.7.3.2. Rôles comme composés de défense.....	89
II.7.3.3. Activités biologiques des flavonoïdes.....	92
II.7.4. Activités antimicrobiennes.....	92
II.7.4.1. Activité antibactérienne.....	92
II.7.4.2. Activité antifongique.....	94
II.7.4.3. Activité antivirale.....	95
II.7.4.4. Activités antiparasitaires.....	95
II.7.4.5. Activités estrogéniques et anti-estrogéniques.....	96
II.7.4.6. Effets protecteurs vasculaires.....	98
II.7.4.7. Potentiel antioxydant.....	98
II.7.4.8. Propriétés anti hépatotoxiques.....	99
II.7.4.9 Propriétés inhibitrices d'enzymes.....	100
II.7.4.10. Propriétés antiallergiques.....	100
II.7.4.11. Activité anti-ulcérogène.....	100
II.7.4.12. Activité anti-inflammatoire.....	100
II.7.4.13. Activité sur les maladies neurodégénératives.....	101
II.7.4.14. Activité sur le système cardio-vasculaire.....	101
II.7.4.15. Autres effets biologiques des flavonoïdes .....	102
II.8. Les stéroïdes.....	102
II.8.1. Classification.....	103
II.9. Les saponines.....	105

### Chapitre III

#### Parie expérimental

III.1. Matériels et méthodes.....	77
III.1.1. Réactifs chimiques et appareillage.....	78
III.1.2. Matériels végétaux.....	78
III.2. Méthodologie.....	78
III.2.1. Préparation des échantillons.....	79
III.2.2. Extraction des composés phénoliques.....	80



---

III.2.3. Principe d'extraction par soxhlet.....	80
III.2.4. Préparation des extraits.....	81
III.2.5. Résultats et discussions de rendement des extractions des composés phénoliques.....	81
III.3. Réaction de caractérisation (Screening phytochimique).....	82
III.3.1. Screening phytochimiques préliminaires.....	83
III.3.2. Résultats et discussions.....	84
III.3.4. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible) .....	85
III.3.4.1.La spectrophotométrie.....	85
Domaine UV-visible de la spectrophotométrie.....	85
III.3.4.2. Analyses quantitatives.....	86
III.3.4.3. Courbes d'talonnages des dosages des PPT, FVT, FLT, ATT, TC et AAS.....	86
III.3.4.4. Résultats et discussions de compositions phytochimiques.....	86
III.3.5. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC).....	85
III.3.5.1. Appareillage.....	85
III.3.5. L'Analyse par HPLC des composés phénoliques.....	86
III.3.5. 1. Conditions opératoires d'HPLC.....	86
III.3.5. 2. Résultats des chromatogrammes d'étalons .....	87
III.3.5. 2. Résultats des courbes d'étalonnages des polyphénols standards.....	88
III.3.5. 3. Chromatogrammes HPLC des extraits de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	88
III.3.5. 4. Analyses de Alpha-tocophérol.....	89
III.3.5. 5. Résultats et discussions d'analyses (Alpha-tocophérol).....	90
III.4. Détermination de l'activité antioxydante des extraits.....	90
III.4.1. Pouvoir réducteur.....	91
III.4.2. Pouvoir antioxydant total.....	91
III.4.3. Le test DPPH.....	92
III.4.4. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante DPPH.....	93
III.4.5. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante totale.....	94
III.4.6. Résultats de détermination de pouvoir réducteur.....	94
III.4.7. Le test $\beta$ -carotène.....	95
III.4.8. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante de test $\beta$ -carotène.....	95
III.4.9. Mesure du pouvoir de réduction ferrique (le test FRAP).....	97
III.4.10. Résultats et discussions de test FRAP.....	98
III.4.11. Le test ABTS.....	99
III.4.12. Résultats d'inhibition de radical ABTS.....	101

---

III.4.13. L'inhibition de radical hydroxyle (OH <sup>·</sup> ).....	102
III.4.14. Résultats d'inhibition de radical OH <sup>·</sup> par les extraits.....	103
III.4.15. Activité de piégeage de radical superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	104
III.4.16. Résultats d'inhibition de radical O <sub>2</sub> <sup>-</sup> par les extraits.....	105
III. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	106
III.5.1.Principe de la méthode.....	106
III.5.2. Résultats de l'évaluation <i>in vitro</i> des propriétés anti-inflammatoires des extraits.....	107
III.5.2. Relation entre composés phénoliques et l'activité anti-inflammatoire.....	108
III.6. Evaluation de l'activité antimicrobiennes des extraits de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	110
III.6.1 L'effet bactériostatique.....	110
III.6.2.L'effet bactéricide.....	111
III.6.3.Méthode de diffusion pour l'estimation de l'activité antimicrobienne.....	114
III.6.4. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.....	115
• Préparation du milieu gélose nutritif.....	120
• Champignons.....	121
• Conditions d'incubation.....	123
• Protocole.....	124
III.6.5. Résultats des analyses antimicrobienne des extraits.....	125
III.6.6. Résultats d'analyses antifongique.....	127
III.7. Evaluation des propriétés antidiabétique (inhibition des enzymes $\alpha$ amylase et $\alpha$ glucosidase) des extraits.....	128
III.7.1. Le diabète – Généralités.....	130
III.7.2 Classification du diabète.....	131
III.7.2. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase.....	136
III.7.3. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-glucosidase.....	138
III.7.4. Résultats d'effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase et Alpha-glucosidase.....	142
III.8. Evaluation des propriétés antimutagène des extraits.....	142
III.8.1. Le test antimutagéniques.....	145
III.8.2. Résultats d'analyses d'activité antimutagène des extraits.....	144
Conclusion générale.....	146
Références bibliographiques.....	149
Liste des tableaux.....	167
Listes des figures.....	169

# Introduction générale

## **INTRODUCTION GENERALE**

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes, qui forment des sources riches en produits naturels utilisés depuis des siècles pour soigner diverses maladies [1]. Il est estimé qu'environ 60% à 75% de la population mondiale et 80% de la population africaine recourent à la médecine traditionnelle pour répondre à leurs besoins pour lesquelles la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs de ces dernières [2,3,4], c'est parce qu'elles produisent une large gamme de composés phytochimiques qui sont utilisés par la plante comme un produit chimique de défense contre les prédateurs.

Selon des statistiques récentes, on estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle [5]: obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels, composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique [6], soit d'une autre façon, d'environ 60% des médicaments anticancéreux et 75% de composés pour les maladies infectieuses sont des produits naturels ou leurs dérivés [7,8]. De plus, les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques [9], ce qui fait que les plantes sont des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...), l'extraction brute, naturelle de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments [10].

Aujourd'hui, les agents antioxydants de source naturelle ont suscité un intérêt particulier car ils peuvent protéger le corps humain contre les maladies causées par les radicaux libres avec sans effets secondaires; ceci est contraire aux agents antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroquinone tertiaire (BHQT) largement commercialisés dans l'industrie alimentaire, leur application provoquent un potentiel risque et toxicité pour la santé humaine [11]. Aussi ils ont été trouvés à exposer des maladies cancérogènes, mutagènes, [12,13]. Pour cette raison la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle a

constitué d'ailleurs un des axes prioritaires de dernière années, la recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers (composés phénoliques), ou encore un criblage systématique des espèces et ou toute combinaison des précédentes.

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont l'un des plus important groupe de composés présents dans les plantes, où sont largement distribués, comprenant au moins 8000 différentes structures connues [14]. Les polyphénols sont également des produits du métabolisme secondaire des plantes. Ces composés sont signalés présentent une activité antioxydant remarquable et jouent un rôle d'inhibiteur des radicaux libres efficaces comme anion superoxyde, hydroxyle, oxyde de nitrique, peroxyde de nitrogène et activité antimicrobienne [15,16,17,18].

les polyphénols possèdent une potentielle dans la prévention des maladies chroniques, cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète sucré, les maladies neurodégénératives, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, anti-athérogènes et antithrombotique [19,20,21]. Leur activité protectrice a été attribué initialement à leurs propriétés antioxydantes, anti-radicaux libres et les propriétés de chélateur de métaux, puis à la capacité d'inhibiter ou de réduire différentes enzymes [22].

Vu que l'importance que présente le *Phoenix dactylifera* L (600 variétés) dans les régions du Sud-est d'Algérie, notre travail de thèse s'inscrit dans ce contexte général à pour objectif d'étudier la composition phytochimique et quantification de composition des polyphénols par HPLC d'extrait des feuilles des trois variétés *Phoenix dactylifera* L (palmier dattier) Ghars, Deglet Nour et Hamraya. Le second objectif est d'évaluer l'activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antimutagène et antidiabétique d'extrait des feuilles de *Phoenix dactylifera* L (palmier dattier). Avec 600 variétés [23,24,25]

Les polyphénols qui font le sujet d'étude sont extraits à partir des feuilles des trois variétés de *Phoenix dactylifera* L Ghars, Deglet Nour et Hamraya de la région d'Oued Souf.

Ce manuscrit comporte trois chapitres. Le premier chapitre présente un rappel des principales données bibliographiques et présentation botanique de *Phoenix dactylifera* L et de sa place dans les classifications phylogéniques, le deuxième chapitre présente un synthèse bibliographique sur les polyphénols et qui permettra de décrire les métabolites

secondaires principaux, ses activités pharmacologique et biologique. Le troisième chapitres couvre l'ensemble des travaux personnels expérimentaux, principaux méthodes, matériels, produits chimique et réactifs utilisées. Le quatrième chapitre décrira en premier lieu les résultats acquis lors de travail de thèse , qui est en l'occurrence les résultats de la préparation de l'extrait des feuilles de trois variétés sélectionnées, l'analyse phytochimique et en deuxième lieu la quantification des composés phénoliques détermine par HPLC. Les résultats de l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, antidiabétique et antimutagène d'extrait des feuilles des variétés sélectionnées prendront place dans ce chapitre .

On terminera ce travail de thèse pour une conclusion générale donnant un récapitulatif sur les principaux résultats obtenus durant ce travail ainsi que les perspectifs qui feront l'objectifs d'ultérieurs travaux et une liste complète des références bibliographiques pour l'ensemble des chapitres.

**Chapitre I**

**Généralités et présentation de**

***Phoenix Dactylifera L***

### I.1. Introduction

Dans le Sahara Algérien, le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*, *Phoenix dactylifera L*) est le pilier des écosystèmes oasiens ou il permet de limiter les dégâts d'ensablement, joue un rôle protecteur contre le rayonnement solaire intense pour les cultures sous-jacentes (arbres fruitiers, cultures maraichères et céréales). Par sa présence dans ces zones désertiques, les diverses formes de vies animales et végétales, indispensables pour le maintien et la survie des populations, sont possibles.

Il a de plus un rôle socioéconomique majeur pour les populations de ces régions pour lesquelles il fournit d'une part un fruit, la datte dont les qualités alimentaires sont indéniables et qui constitue une source de revenus très appréciables pour plus de 100 000 familles du Sud Algérien avec 9 % des exportations agricoles, d'autre part une multitude de sous produits (culinaire, artisanal et menuiserie...).

### I.2. Quelques mots d'histoire

Il y a quelques millénaires, les dattes représentaient déjà un fruit d'excellence chez les Mésopotamiens et les Egyptiens des temps pharaoniques. Offrandes pour les dieux, véritables viatiques accompagnant les morts dans leur périlleux voyage vers l'au-delà, elles étaient aussi la nourriture indispensable pour le commun de mortels. *Phoenix dactylifera* est le nom latin du palmier-dattier, le vocable voyageur qui viendrait peut-être de « Phénicie » ? En français, le nom du fruit, « datte », remonterait au XIII<sup>e</sup> siècle. De sa racine grecque *dactylos*, on retient l'idée du « doigt », par référence à la forme du fruit, d'où le nom d'une des variétés, les Deglet Nour ou « doigts de lumière », métaphore pour dire sa transparence, sa porosité aux rayons du soleil [26]. C'est dans le bassin de l'Euphrate, où furent créées les plus vieilles oasis, que se concentreraient les origines géographiques de l'arbre. C'est là qu'il y aurait été domestiqué et cultivé. Plus précisément, c'est dans le Schott al Arab, entre le Tigre et l'Euphrate, ou peut-être même en Egypte, dans la vallée du Nil, qu'auraient été inventées ses méthodes de culture. Certains voient dans les Sumériens les initiateurs en ce domaine. De ces régions, il s'est répandu à l'ouest dans toute l'Afrique du Nord et vers l'est jusqu'en Inde. Le palmier-dattier (Figure. 1) serait vraisemblablement dans ces régions la première espèce végétale domestiquée par l'homme et il est un des arbres fruitiers les plus cultivés au monde [26]. De la famille des Acéracées (Palmacées), c'est l'arbre des régions semi-arides et arides, qui offrent malgré tout des ressources en eau suffisantes et constantes. Le dattier est l'une



des rares plantes à pouvoir survivre dans le climat inhospitalier du désert où il trouve soleil, chaleur et air sec propice au murissement de ses fruits. Arbre providentiel, le dattier apporte de nombreux bienfaits dans la vie quotidienne. Son exploitation est totale, qu'il s'agisse du tronc, des palmes, des folioles, de la bourre. Aussi, il se transforme en poutres, cordages, paniers ou vans, il fournit farine, boisson mais son intérêt majeur réside dans les lourds régimes de dattes qu'il produit. Exportées dans tout le Bassin méditerranéen, par voie maritime ou terrestre, les dattes étaient déjà très prisées des Grecs et des Romains qui en importaient en grande quantité de différentes variétés. Encore aujourd'hui, au Proche-Orient et au Moyen-Orient, ainsi qu'en Afrique du Nord, qui restent ses zones de prédilection, la datte continue de jouer un rôle important bien que l'alimentation se soit diversifiée.





**Figure 1.** *Phoenix Dactylifera L*

### **I.3. Situation de la culture du palmier dattier en Algérie**

L'Algérie est un pays phoenicicole classe au sixième rang mondial et au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture avec 160 000 ha et plus de 2 millions de jardins et sa production annuelle moyenne de dattes de 500 000 tonnes. Le palmier dattier en Algérie est établi en plusieurs oasis réparties sur le Sud du pays où le climat est chaud et sec (zone saharienne). Sa culture s'étend depuis la frontière Marocaine à l'ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'est et depuis l'Atlas Saharien au nord jusqu'à Reggane (sud-ouest), Tamarrasset (centre) et Djanet (sud-est). Près d'un millier de cultivars a été inventorié et les trois régions principales de culture se distinguent sur le plan de la diversité génétique. A cette catégorie, il faut ajouter un grand nombre de pieds francs qui poussent au hasard dans les oasis et qui représentent une source appréciable pour de nouvelles sélections de cultivars appréciables.

La distribution des cultivars principaux montre une répartition est ouest très marquée. Une cinquantaine de cultivars se retrouvent dans deux ou trois régions mais la majorité des cultivars reste endémique à leur région ou à leur zone d'origine.

À l'est, le cultivar Deglet Nour, dont les dattes sont destinées à l'exportation vers les pays du Nord, continue à prendre de l'ampleur et frôle aujourd'hui les 50 % de la population des palmiers dattiers plantés.

Les cultivars produisant des dattes sèches (Degla Beida, Tinnaser) sont exportés vers les pays d'Afrique subsaharienne. Parfois, les dattes comme celles du cultivar Hamraya sont exportées vers la Russie ou la Chine. Parmi les cultivars émergents, Tafezwin est exportable vers les pays d'Amérique du Sud, Bentqbal, en mode congelé, est très renommé sur le marché local à Ghardaïa (est). Agaz, datte primeur produite au Tidikelt (ouest), se commercialise bien sur les marchés de Ouargla et de Ghardaïa.

### **I.4. Passé et présent de la culture du palmier dattier en Algérie**

Dans un passé lointain (début du XXe siècle), la culture du palmier dattier était une culture de subsistance mais diversifiée et basée sur l'économie de l'eau grâce au système des Foggaras. Il n'en demeure pas moins que 4 500 000 palmiers étaient exploités. Puis durant la période coloniale, les superficies augmentent (6 700 000 palmiers), les techniques culturales s'améliorent et les cultures sous jacentes en particulier d'arbres fruitiers sont introduites. La variété Deglet Nour devient la datte de table et d'exportation. Le *Fusarium*

*oxysporum* fsp *albedinis*, champignon responsable de la maladie du bayoud, est identifié alors qu'il a été signalé pour la première fois à Béni Ounif en 1898. La diversité génétique est ramenée à trois types de dattes : molles, demi-molles et sèches. La restructuration de la phoeniculture débute avec les années de l'indépendance ou des actions de lutte contre le bayoud sont menées avec le soutien de la FAO et la création de stations de recherche dans le Sud Algérie [27]. Mais c'est aussi la période d'un exode rural qui aboutit à la perte de savoirs et de savoir faire, les cultivateurs s'intéressant de plus en plus à des cultures plus rapidement rentables : céréaliculture, cultures maraichères. Les palmeraies traditionnelles déclinent et les Foggaras sont moins entretenues.

Au cours des années 1980, de nouveaux périmètres de culture saharienne sont créés et des actions de plantation de palmier sont menées en particulier à Tindouf, Bechar et Tamanrasset en même temps que se développe dans ces régions un réseau électrique et que les ressources hydriques sont mobilisées. Le nombre de palmiers passe à 8 000 000.

Ce chiffre passera à 9 000 000 dans les années 1990 grâce à un soutien aux investisseurs qui permet la création de grands périmètres à Biskra, El Oued, Guerrara, El Meniaa, Adrar, In Salah. Les recherches en biotechnologie se développent et des vitro plants sont plantés à Adrar, Touggourt et El Meniaa. La maladie de la feuille cassante est signalée à Adrar, Biskra et Ghardaïa.

À partir de l'année 2000, on observe un rajeunissement de la palmeraie Algérienne qui atteint d'abord 13 500 000 palmiers sur 120 830 ha en 2002 pour être aujourd'hui à 17 000 000 d'individus sur 160 000 hectares. Le système goutte à goutte est généralisé, les études sur la diversité génétique et les approches biotechnologiques

Les exportations de la Deglet Nour vers le Nord et d'autres variétés vers les pays d'Afrique reprennent. Mais la recherche reste limitée à quelques équipes éparpillées et l'usage des sous produits du palmier et de la datte ne s'est pas développé. Les premières actions pour la mise en place d'un réseau national de recherche sur le palmier dattier ne se sont pas concrétisées.

### **I.5. Production du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*)**

Le palmier produit environ en moyenne 60 kg de fruits par an mais, bien entretenu, il peut donner jusqu'à 100 kg. Les premières dattes n'adviennent que vers l'âge de 5 ans et la production continuera bien au-delà de 50 ans, en moyenne 80 ans peut-être même

100 ans. La maturation des fruits est lente, plusieurs mois, et la récolte commence après les grandes chaleurs. Au Sahara septentrional, elle débute au mois d'octobre, dans les palmeraies d'Algérie ou de Tunisie, et se poursuit sur au moins deux ou trois mois. Certaines conditions sont impératives pour obtenir de bons résultats : une température constante et supérieure à 30 C° pendant toute la période de maturation, une humidité relative restant très faible, ce qui exclut les zones trop proches de la mer, et surtout aucune pluie ne doit atteindre les fruits. En certaines régions, en Tunisie par exemple, où quelques averses menacent les palmeraies en fin de saison, on coiffa chaque régime d'un « chapeau » pour les protéger.

### **I.6. Diversité des espèces et des usages**

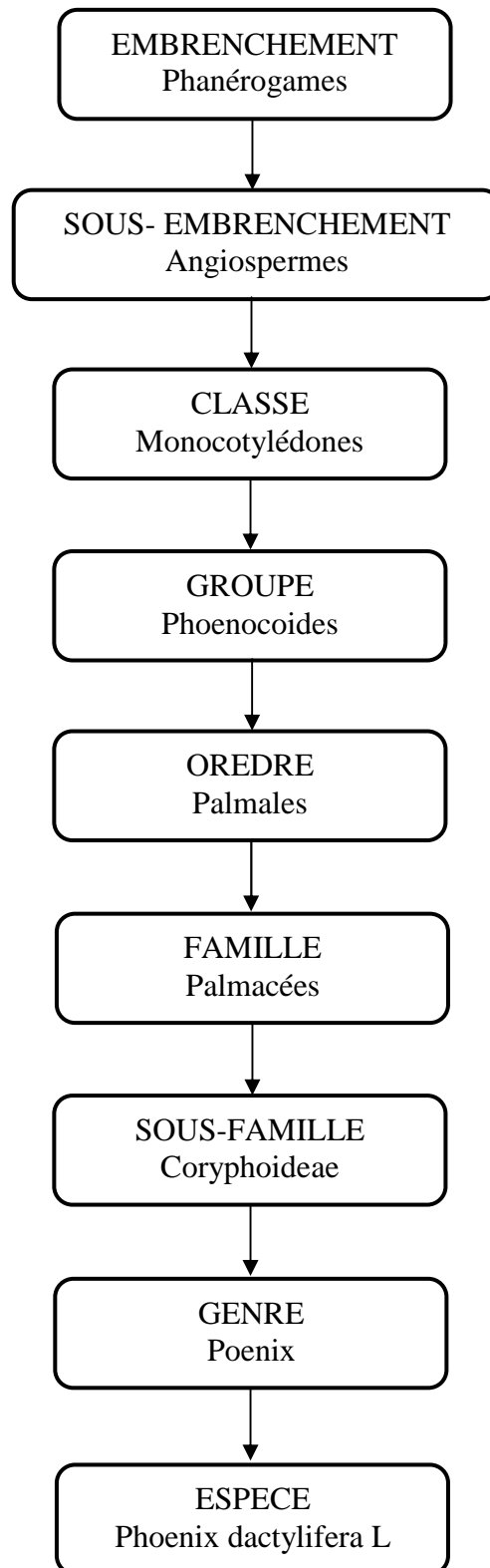
Reflète de son importance dans la vie de l'oasien, la richesse du vocabulaire lié à ce fruit, tout comme celle qui est liée à l'arbre d'ailleurs, a étonné tous les observateurs. Quelle que soit la région, on cite des noms différents se rapportant aux variétés qui sont multiples, mais aussi jusqu'à six ou sept noms exprimant les étapes successives de maturation de la dattes. Il y a un mot nouveau selon que celle-ci est petite, verte, ou grosse, selon qu'elle engage déjà sa croissance, qu'elle change de couleur, encore lisse et jaune, ou qu'elle arrive à maturité, adoptant une teinte ambrée, ou que déjà elle se flétrisse, devenant presque confite.

Dans le passé, la diversité des espèces était vitale. Ne fallait-il pas des dattes disponibles toute l'année, donc des variétés permettant des récoltes étalées et échelonnées sur plusieurs mois, et en même temps des variétés se prêtant à des traitements et conditionnements divers ? Sèches, demi sèches ou molles, les dattes sont traitées différemment. Les premières, naturellement déshydratées, se conservent longtemps transformées en farines ou simplement concassées. Pour le transport et les caravanes, elles conviennent particulièrement. Les dattes molles sont réduites en pâte et on les entrepose dans différents récipients. Les demi sèches ou demi-molles après séchage au soleil se prêtent aussi bien à la consommation locale qu'à la vente. De leur côté, les nomades gardaient les dattes sèches parfois enfouies dans le sable dans l'attente du départ de la caravane. Les fruits malvenus sont réservés au bétail, ainsi que les noyaux, après avoir été concassés et réduits en poudre. Les dattes précoces, fruits d'avant-saison, sont tout particulièrement appréciées. On déguste les toutes premières, fraîches, molles au goût de miel, elles ouvrent la saison des récoltes.

## I.7. Etude ethnobotanique de *Phoenix dactylifera L*

### I.7.1. Taxonomie et systématique

Le palmier dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera L.* [28]. *Phoenix* dérive de Phoinix, nom du dattier chez les Grecs de l'antiquité, qui le considéraient comme l'arbre des phoeniciens ; *dactylifera* vient du latin *dactylus* dérivant du grec *dactulos* signifiant doigt, en raison de la forme du fruit (Munier, 1973). Selon Munier (1973), est une plante dioïque, c'est-à-dire existe des dattiers males (Dokhar) et des dattiers femelles (Nakhla). la classification du palmier dattier est comme présentée dan la figure 2.



**Figure 2.** Classification de l'espèce *Phoenix dactylifera L*

### I.7.2. DESCRIPTION GENERALE DES ORGANES DU PALMIER DATTIER

Le Palmier Dattier est une plante monocotylédone à croissance apicale dominante. Le diamètre du tronc de l'arbre demeure généralement stable sous les mêmes conditions à partir de l'âge adulte. On distingue 3 parties : un système racinaire, un organe végétatif composé du tronc et de feuilles et un organe reproductif composé d'inflorescences mâles ou femelles (Figure 1). Les valeurs quantitatives et qualitatives des organes végétatif et reproductif sont variables. Il semble possible de caractériser les cultivars par la comparaison de la plupart de ces paramètres qui forment des index taxonomiques différentiels.

#### A. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier est dense de type fasciculé, formé de plusieurs types de racines dont le diamètre ne dépasse pas 1,5 cm et qui émergent partiellement au dessus du niveau du sol à une hauteur allant jusqu'à 50 cm de la base du tronc. Ces racines, dépourvues de poils absorbants, sont structurées comme suit: d'abord les racines du premier ordre (auxirhyzes), qui émettent des racines du deuxième ordre (mésorhyses), donnant naissance à leur tour à des racines de troisième ordre (brachyrhyses). Toutes ces racines peuvent présenter des pneumatodes qui sont des petites plaques verrues et farineuses placées sur les racines et qui jouent un rôle respiratoire. Munier (1973) puis Oihabi (1991) [29], distinguent quatre zones du sol (I, II, III et IV) occupées par les racines. L'ensemble de ces racines est lié directement, avec un système vasculaire au niveau de la

base du tronc. Leur nombre équivaut généralement, à celui des vaisseaux. Le développement et l'importance du système racinaire (quantité, densité, longueur...) dépendent du mode et du système de culture, des caractéristiques physico-chimiques et agronomiques du sol, de la profondeur de la nappe phréatique et probablement du cultivar et du système de culture. Verticalement, les racines prennent une longueur pouvant aller jusqu'à 8 et parfois 15 m, en profondeur. Nous avons trouvé des racines du palmier prolongeant la hauteur d'un puits de 10 m de profondeur [30]. Dans les sols fertiles à humidité régulièrement favorable, les racines se concentrent généralement dans un horizon de 1 à 1,5 m. Dans le cas du cultivar Deglet Nour [31] a rapporté que le système racinaire peut s'étaler sur une superficie qui peut atteindre 167 m<sup>2</sup>. En profondeur, les racines d'un arbre adulte peuvent épuiser l'eau à plus de 8 m. Horizontalement, les racines se



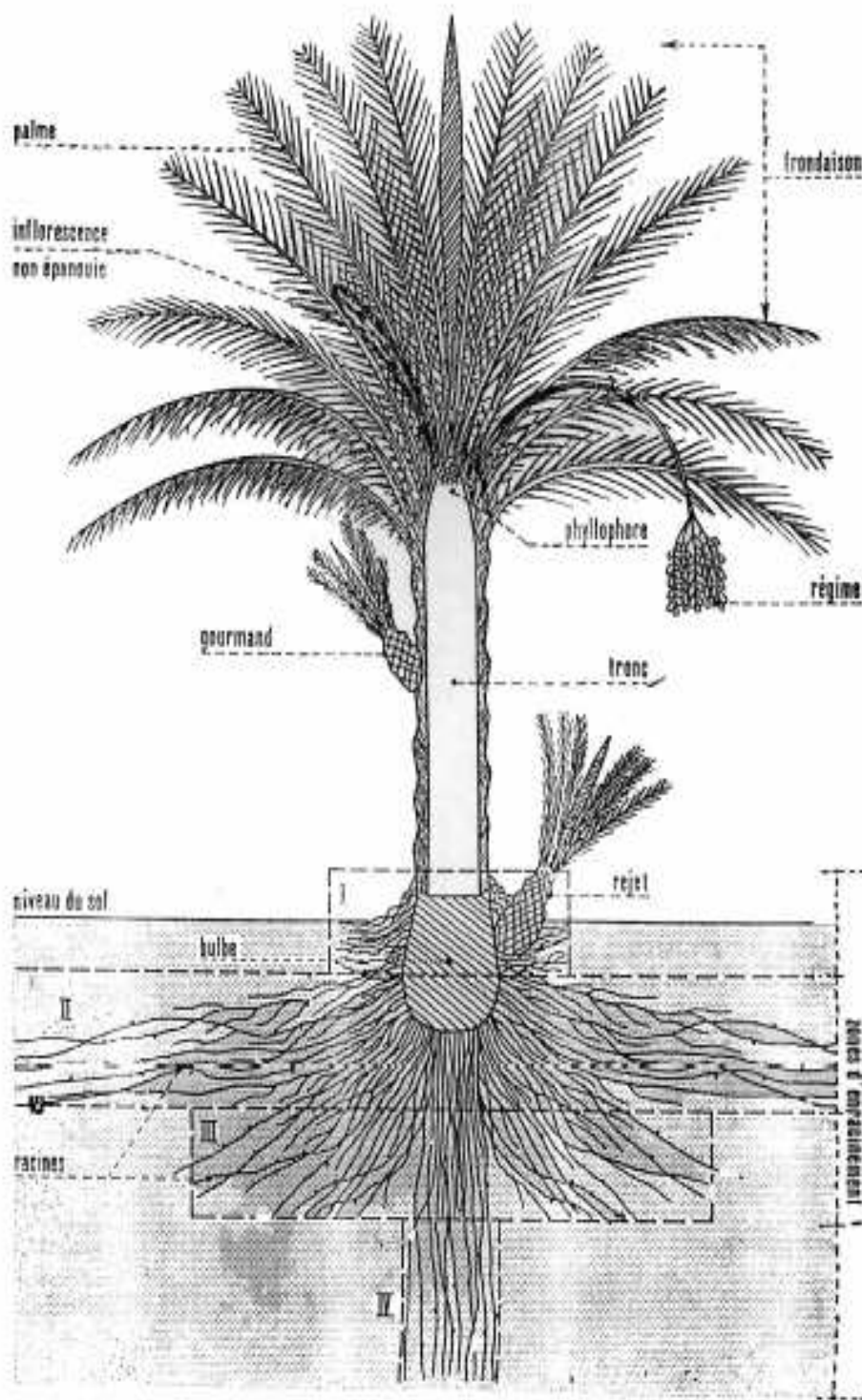
rencontrent et forment un réseau très dense en cas de plantations plus ou moins rapprochées, et peuvent se prolonger jusqu'à 30 m et plus en cas de palmiers solitaires [30].

### **B. Le tronc ou stipe**

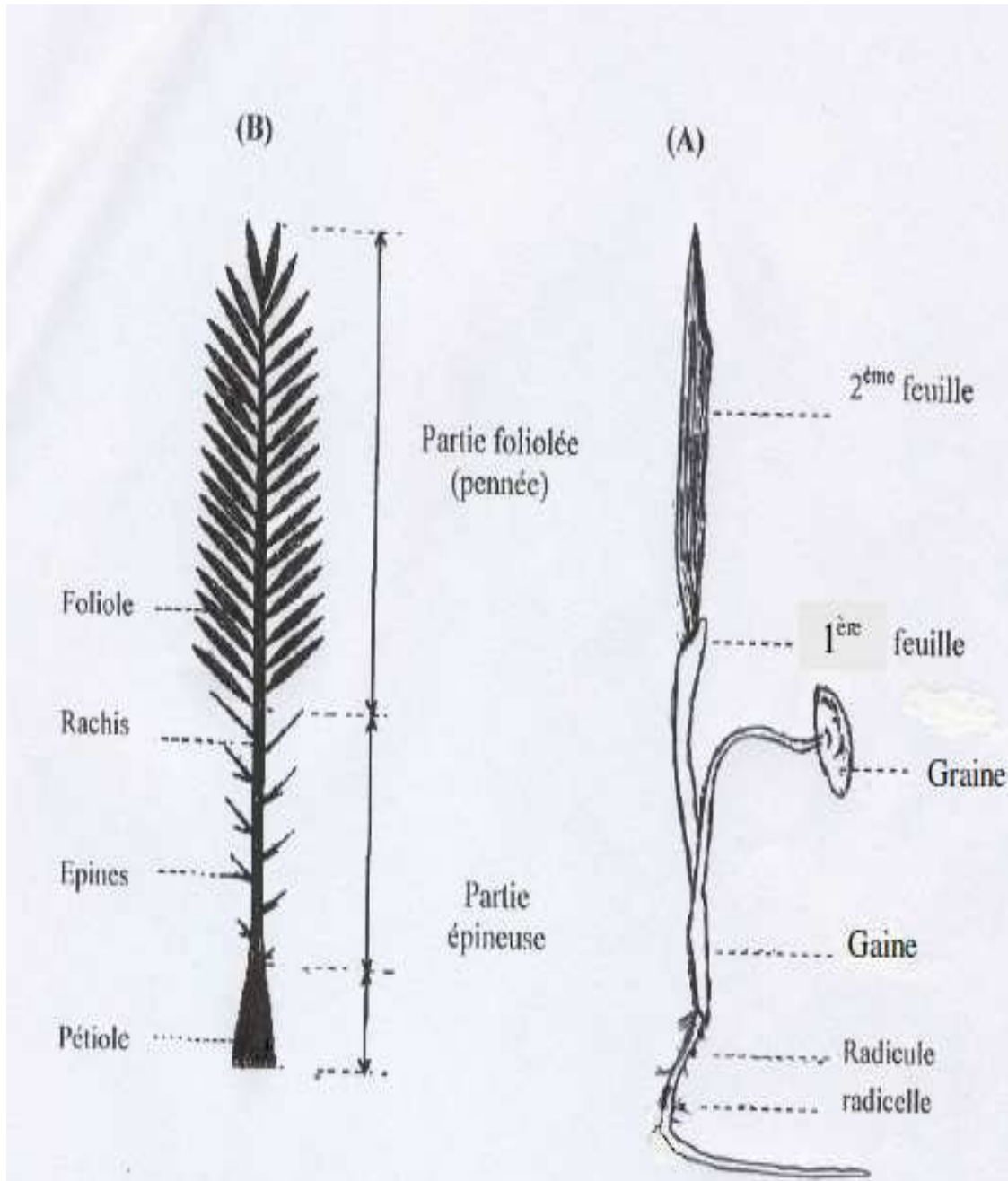
Le tronc cylindrique appelé aussi stipe ou tige, est non ramifié, lignifié et de couleur marron brun. Le tronc est généralement, monopodique et recouvert à sa surface par la base des palmes coupées cornafs, recouvertes à leur tour par un fibrillum 'lif'. Ces cicatrices de la base des feuilles restent visibles pendant des années. Quelques fois, certains cultivars peuvent avoir une forme du tronc tronconique, mais jamais ramifié. Sa hauteur peut atteindre plus de 30 mètres [32].

### **C. Les bourgeons**

A l'aisselle de chaque palme, se trouve un bourgeon axillaire qui peut se développer pour donner naissance à un rejet, à la base du stipe ou aérien attaché au tronc, dénommé vulgairement 'rekeb' dans la partie basale de l'arbre ou une inflorescence dans la partie supérieure. La plupart des bourgeons axillaires végétatifs finissent par avorter durant la phase juvénile du palmier. Le bourgeon apical ou terminal est responsable de la croissance en hauteur du palmier et du développement des feuilles et de bourgeons axillaires. Grâce aux très faibles variations de température jour et nuit au niveau de ce bourgeon et aux différences de température qui surgissent pendant les saisons froides et chaudes (allant jusqu'à 15°C) par rapport à l'extérieur du bourgeon, ce dernier permet au palmier dattier de tolérer et de s'adapter à l'hostilité des conditions sahariennes (Al-Bakr, 1972).



**Figure 3.** Figuration schématique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) d'après Munier (1973)



**Figure 4.** A: Jeune feuille d'un plant issu de semis de graine. B: une palme (feuille) d'un palmier dattier adulte (d'après Sedra, 2003).

## **D. Les feuilles**

Les feuilles jeunes de plants issus de graines et âgés de moins de deux ans, présentent un pétiole et un limbe entier (Figure 4). Après ce stade, les feuilles adultes montrent un pétiole ou rachis bien développé, un limbe penné découpé en folioles composées et une série d'épines solitaires et/ou groupées, différentes en taille, nombre et position.

### **I.7.3. L'Appareil de reproduction**

#### **I.7.3.1. Les spathes ou inflorescences**

Le Palmier dattier est une plante dioïque. Les organes de reproduction sont composés d'inflorescences mâles ou femelles portées par des palmiers différents. Les spathes ont une forme de grappes d'épis protégés par une bractée ligneuse close et fusiforme. Elles sont de couleur vert-jaunâtre et sont formées à partir de bourgeons développés à l'aisselle des palmes (Figure 5).

#### **I.7.3.2. Les fleurs**

Les fleurs sont unisexuées à pédoncule très court. Elles sont de couleur ivoire, jaune-verdâtre selon le sexe et le cultivar ou la variété. En période de pollinisation, les spathes s'ouvrent d'elles-mêmes suivant, la ligne médiane du dos (Figure 5). La fleur femelle est globulaire, d'un diamètre de 3 à 4 mm; elle est constituée d'un calice court, de trois sépales soudés et d'une corolle, formée de trois pétales ovales et de six étamines avortées ou staminoïdes (Figure 5). Le gynécée comprend trois carpelles, indépendants à un seul ovule anatrope. Au moment de la pollinisation, un seul ovule est fécondé, ce qui aboutit au développement d'un seul carpelle qui, à son tour, évolue pour donner à maturité, le fruit appelé datte. Les autres ovules avortent et tombent après la pollinisation. La fleur mâle a une forme légèrement allongée et est constituée d'un calice court, de trois sépales soudés et d'une corolle formée de trois pétales et de six étamines (Figure 5). Les fleurs mâles sont généralement, de couleur blanche crème, à odeur caractéristique de pâte de pain. Les phénomènes de changement de sexe chez le palmier ou de l'existence d'inflorescences des deux sexes à la fois, sont très rares.

#### **I.7.3.3. Le fruit**

Le fruit est une baie contenant une graine appelée communément, noyau (Figure 6). Après fécondation, l'ovule évolue pour donner un fruit de couleur verte (taille d'un pois puis d'un fruit de raisin jusqu'à la taille normale de la datte). En effet, cinq stades d'évolution du fruit

sont connus et prennent des appellations locales différentes (Tableau 1) en fonction des pays et des régions, par exemples:

**Tableau 1.** Stades d'évolution du fruit et ses appellations en langue locale

Pays	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV	Stade V
Algérie	Loulou	Khelal	Bser	Martouba ou Mretba	Tmar
Maroc	Lilou	Bourchime	Bleh	Nekkar ou Rteb	Tmar
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Engueï	Bleh	Tmar
Libye	-	Gamag	Bser	Routab	Tmar
Iraq et plusieurs pays du golf arabe	Hababouk	Kimri	khalal	Routab	Tmar
Durée estimée du stade en semaines	4-5	7-8	3-5	2-4	2-3

#### I.7.3.4. Cycle végétatif

Le genre *Phoenix* est unique dans sa morphologie mais aussi dans son développement, il est possible de distinguer aussi bien au niveau pratique que théorique cinq phases de développement dans la croissance des palmiers. Ces cinq phases ne sont pas définies strictement, elles sont décrites sur des critères morphologiques alors qu'elles correspondent en réalité à des périodes physiologiques qui ne sont ni connues avec exactitude, ni bien comprises.

##### Stade 1 : La graine

Elle possède un albumen (endosperme) dur et corné dont l'embryon dorsal est toujours très petit par rapport à l'albumen (2 à 3 mm).

##### Stade 2 : Phase germinative

A ce stade, la plantule ou la germination vit sur les réserves de l'albumen. La première feuille est de forme linière et lancéolée, cette forme est une des caractéristiques du genre *Phoenix*.

**Stade 3 : Construction de la plante**

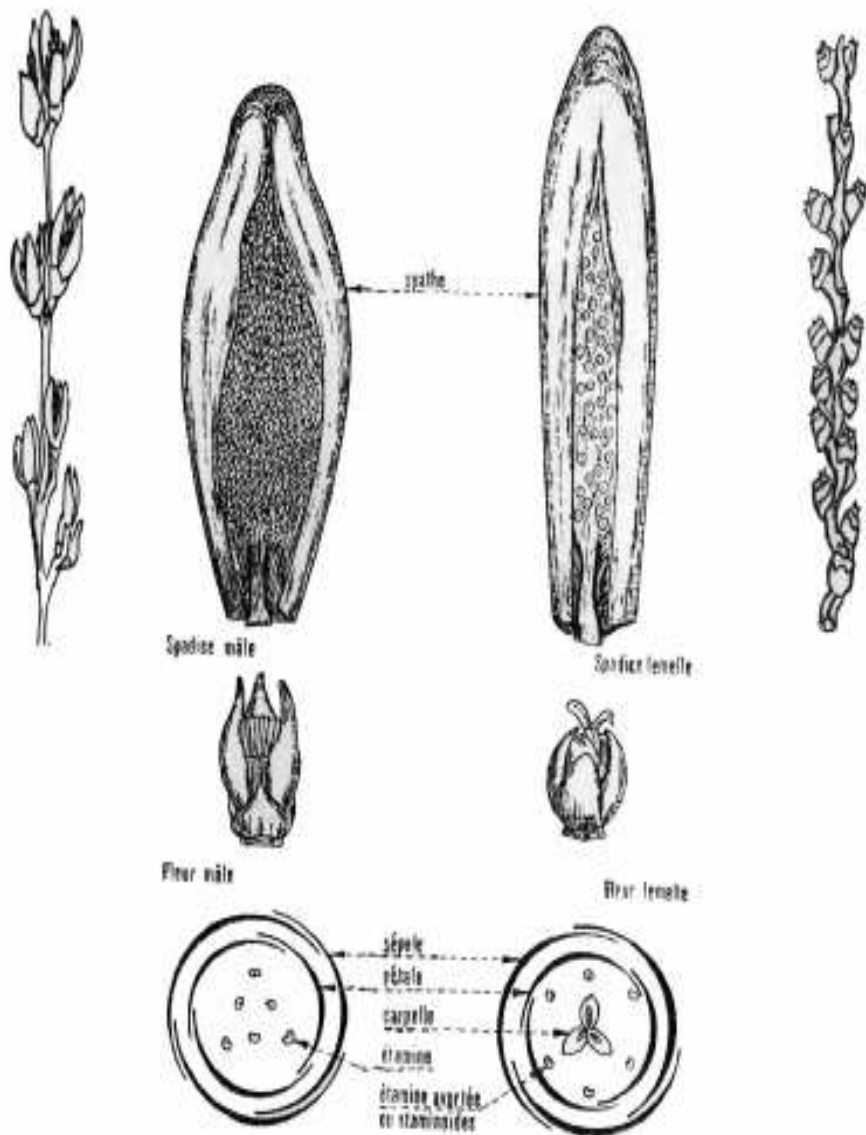
Cette phase post germinative est la plus importante dans l'ontogénie des palmiers car elle aboutit à la constitution de l'axe primaire. La plante devient autotrophe et son système vasculaire doit se construire, durant cette phase appelée aussi "phase d'établissement" observe une série de feuilles à limbe para penné puis penné et qui ont une insertion spiralée caractéristique des genres *Phoenix*.

**Stade 4 : la phase adulte végétative**

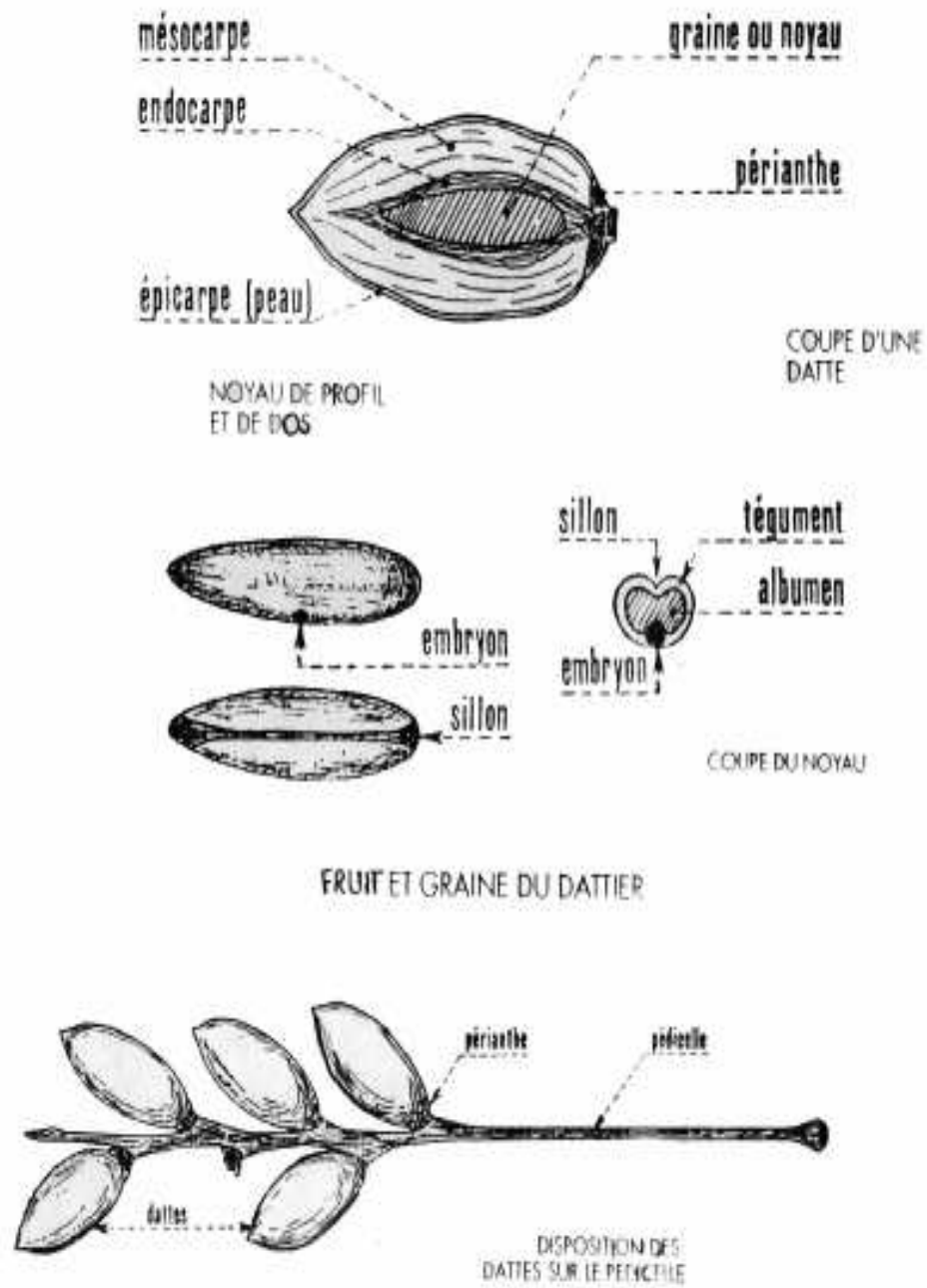
Le dattier va construire son tronc ou stipe et acquérir son « porte de palmier » par extension continue de l'axe végétatif. Cette phase où il produit essentiellement des feuilles et accumule des réserves peut durer de 3 à 8 ans. Le tronc couvert par la base des feuilles anciennes mortes et/ou coupées, peut atteindre 20 à 30 m de haut et environs 1 m de diamètre.

**Stade 5 : La phase adulte reproductive**

Entre la 5<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> année (pouvant aller jusqu'à 10 ans) le dattier commence à produire des inflorescences. Le dattier étant dioïque, ce n'est qu'à ce stade que l'on peut reconnaître son sexe (les quatre stades précédents apparaissent identiques chez les pieds mâles et femelles). Ce dioïque entraîne une allogamie obligatoire qui permet un brassage génétique mais aussi une hétérozygotie [Riedacker et al., 1990].



**Figure 5.** Spathes, inflorescences et fleurs du palmier dattier (d'après Munier, 1973)



**Figure 6.** Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du palmier dattier (d'après Sedra, 2003)



## **I.8. Exigences climatiques du palmier dattier**

### **I.8.1. Les exigences climatiques**

- **La température**

Le palmier dattier est une espèce thermophile. Son activité végétative se manifeste à partir de 7 à 10°C selon les individus, les cultivars et les conditions climatiques. Elle atteint son maximum de développement vers 32°C et commence à décroître à partir de 38°C. La floraison se produit après une période fraîche ou froide [33,34]. La somme des températures nécessaire à la fructification (indice thermique) est de 1000 à 1660°C, selon les régions phoenicoles (Munier, 1973). La période de la fructification débute à la nouaison et se termine à la maturation des dattes, elle varie de 120 à 200 jours selon les cultivars et les régions [33].

- **La lumière**

Le dattier est une espèce héliophile, et la disposition de ses folioles facilite la photosynthèse, la faible luminosité favorise le développement des organes végétatifs au dépend de la production de dattes, ainsi les fortes densités de plantation sont à déconseiller (Munier, 1973).

- **Eau**

Pour assurer une bonne production dattière, l'arbre a besoin de 16.000 à 20.000 m<sup>3</sup>/ha/an, selon la nature du sol, la profondeur de la nappe et le degré d'insolation et de température. Les estimations sont de l'ordre de 50 L/mn/ha en été et de 40 L/mn/ha en hiver.

- **Sol**

Les palmiers sont cultivés dans des sols très variés ils se contentent de sols squelettiques : sableux, sans aucune consistance mais affectionne les sols meubles et profonds assez riches ou susceptibles d'être fertilisés. C'est une espèce qui craint l'argile (Anonyme, 1993).

- **L'humidité de l'air**

Les faibles humidités de l'air stoppent l'opération de fécondation et provoquent le dessèchement des dattes au stade de maturité, au contraire les fortes humidités provoquent des pourritures des inflorescences et des dattes, respectivement au printemps et à l'automne. Donc le dattier est sensible à l'humidité de l'air. Les meilleures dattes sont récoltées dans les régions où l'humidité de l'air est moyennement faible (40%).

- **Le vent**

Les vents ont une action mécanique et un pouvoir desséchant. Ils augmentent la transpiration du palmier, entraîne la brûlure des jeunes pousses et le dessèchement des dattes. Les vents ont aussi une action sur la propagation de quelques prédateurs des palmiers dattiers comme *Ectomyelois cérationiae* [35].

### **I.8.2. Les exigences édaphiques**

Le palmier dattier s'accommode aux sols de formation désertique et subdésertique très divers, qui constitue les terres cultivables de ces régions. Il croit plus rapidement en sol léger qu'en sol lourd, où il entre en production plus précocement. Il exige un sol neutre, profond, bien drainé et assez riche, ou susceptible d'être fertilisés [36].

### **I.8.3. Les exigences hydriques**

Malgré que le palmier dattier est cultivé dans les régions les plus chaudes et plus sèches du globe, il est toujours localisé aux endroits où les ressources hydriques du sol sont suffisantes pour subvenir assez aux besoins des racines. Les besoins du palmier en eau dépendent de la nature de sol, des variétés ainsi que du bioclimat. La période des grands besoins en eau du palmier se situe de la nouaison à la formation du noyau de fruit [37].

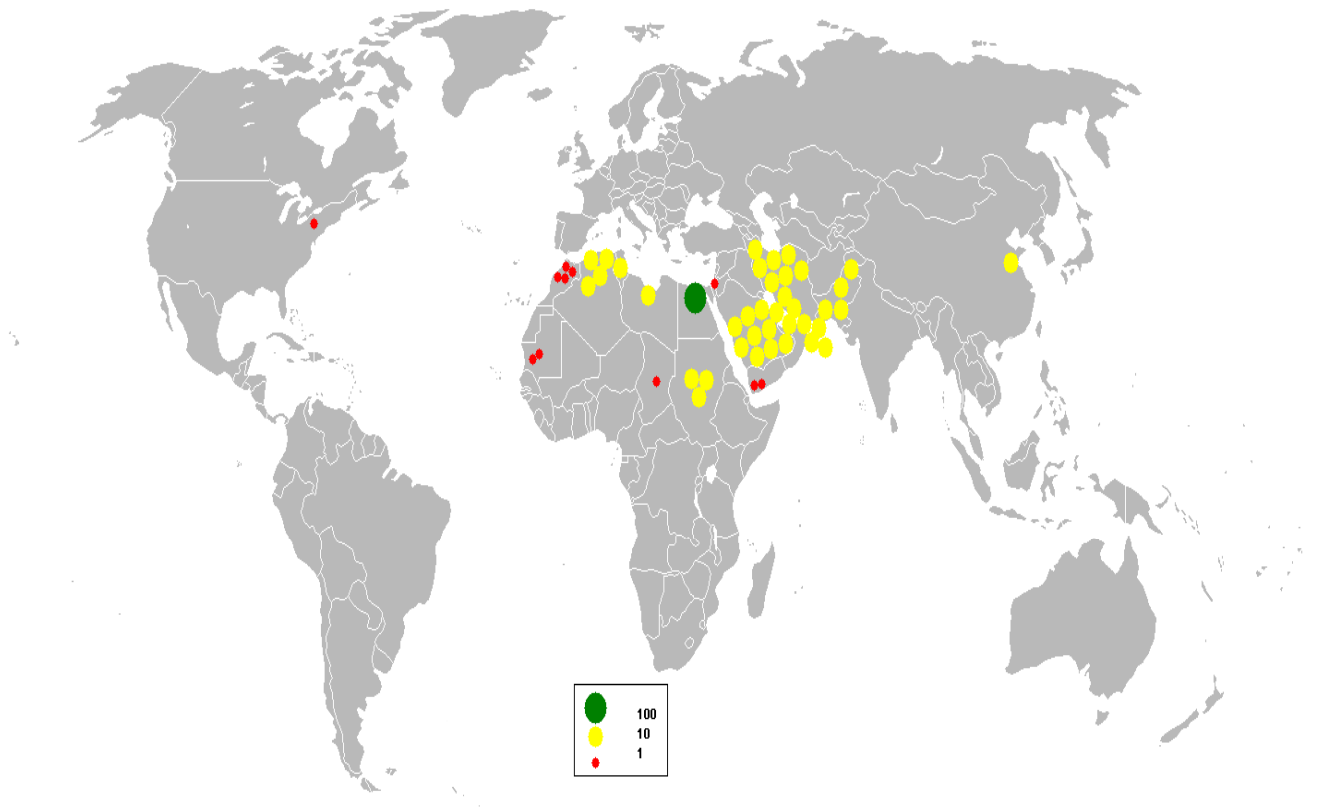
Les services agricoles et de l'hydraulique du sud algérien estiment les besoins en eau d'irrigation à 21.344 m<sup>3</sup>/ha/an, soit 173,45 m<sup>3</sup>/palmier/an [38], situe les besoins en eau du palmier en sol sableux entre 22 863,6 m<sup>3</sup> à 25 859,5 m<sup>3</sup>/ha/an, soit 183,95 m<sup>3</sup> à 210,24 m<sup>3</sup>/palmier/an.

## **I.9. Répartition géographique du *Phoenix dactylifera L***

### **I.9.1. Dans le monde**

La culture du palmier dattier est concentrée dans les régions arides au Sud de la Méditerranée et dans la frange méridionale du proche Orient de puis le Sud de l'Iran à l'Est jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest, entre les altitudes 35° Nord et 15° Sud. L'Espagne reste le seul pays d'Europe à produire des dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche, située à l'Ouest d'Alicante à 39° Nord. Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie .

Au Etats-Unis d'Amérique (Figure 7).



**Figure 7.** Répartition géographique du *Phoenix dactylifera L* et principaux pays producteurs dans le monde

### I.9.2. En Algérie

La culture du palmier dattier occupe toutes les régions situées sous l'Atlas saharien depuis la frontière Marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière Est Tuniso-Libyenne. Du Nord au Sud du pays, elle s'étend depuis la limite Sud de l'Atlas saharien jusqu'à Reggane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est (Tableau 2).

Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de 120 830 hectares. Cependant, quatre principales wilayas représentent 83,6 % du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23 %, Adrar 22 %, El-Oued 21 % et Ouargla 15 %.

Tableau 2 . Répartition géographique et nombre de palmiers dattiers en Algérie

Wilaya	Superficie Occupée (ha)	Deglet- Nour	Ghars	Degla Beida	Total Palmiers Dattiers	
					Total	En rapport
El Oued	27395	1808140	681000	284860	2774000	2140000
Biskra	24894	1319190	430710	783460	2533360	1998580
Ouargla	19625	0	0	2704780	2704780	1997650
Adrar	16811	967580	846450	120170	1934200	1585770
Autre	15665	315640	257520	151615	2089310	1343610
<b>Total</b>	<b>104390</b>	<b>4410550</b>	<b>221568</b>	<b>5409420</b>	<b>12035650</b>	<b>9065610</b>

### I.10. Caractéristiques morphologiques des dattes des variétés sélectionnées

La datte est constituée d'une partie charnue (la chaire) et d'un noyau. Les dattes des cultivars présentent des caractéristiques morphologiques différentes. Les dattes se varient selon la couleur, la forme et le goût. Une datte est dite de qualité physiologique acceptable, quand elle présente (Açouren, 2001) :

- Aucune anomalie et aucun endommagement ;
- Un poids supérieur ou égal à 6 g ;
- Un poids en pulpe supérieur ou égale à 5 g ;
- Une longueur supérieure ou égale à 3,5 cm.

En Algérie, les dattes les plus populaires sont : Deglet Nour Hamraya (Deglet Hamra) et Ghars.

#### I.10.1. Deglet Nour

La Deglet Nour / Deglet-En-Nour qui veut dire « doigts de lumière » a été ramenée en Algérie vers le 8<sup>ème</sup> siècle. C'est un fruit très énergétique. Cette datte est légendaire pour la perfection qu'on lui connaît. Elle est qualifiée de « la reine des dattes » et l'un des

produits phares de l'agriculture algérienne. Dotée d'un goût très doux, juteuse et quasi-transparente, elle est la plus populaire des dattes.

La datte Deglet Nour est une datte demie molle et excellente. Ses dimensions (Bennamia, 2006),

- Un poids moyen de 12 g ;
- Une longueur moyenne de 6 cm ;
- Un diamètre moyen de 1,8 cm;
- Un noyau lisse, de petite taille 0,8-3cm, pointu aux deux extrémités. La rainure ventrale est peu profonde, le micropyle est central.

La datte Deglet Nour est de forme fuselée, ovoïde, légèrement aplatie du côté périanthe. Au stade Tmar, la datte devient ombrée, avec un épicarpe lisse et brillant. Le mésocarpe est fin, de texture fibreuse (Bennamia, 2006).



**Figure 8.** la variété sélectionnée de *Phoenix dactylifera L* Deglet Nour

### I.10.2. Ghars

La datte Ghars se caractérise essentiellement par une consistance très molle, à maturité complète. Ses dimensions sont:

- Un poids moyen de 9 g ;
- Une longueur moyenne de 4 cm ;
- Un diamètre moyen de 1,8 cm.

Cette datte au stade Bser est de couleur jaune, mielleuse au stade Routable et brun foncé à maturité. L'épicarpe est vitreux brillant, collé et légèrement plissé. Le mésocarpe est charnu, de consistance molle et de texture fibreuse. Le périanthe est de couleur jaune-clair, légèrement voûté.



**Figure 9.** la variété sélectionnée de *Phoenix dactylifera L* Ghars

### I.10.3. Hamraya ou Deglet Hamra

La datte Hamraya se caractérise essentiellement par une consistance très molle, à taille plus grande que Ghars. Ses dimensions sont:

- Un poids moyen de 13 g ;
- Une longueur moyenne de 5.5 cm ;

Un diamètre moyen de 2,3 cm.



**Figure 10.** la variété sélectionnée de *Phoenix dactylifera L* Hamraya

## I.11. Composition biochimique de la datte

### I.11.1. Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe "

- **L'eau**

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % .

**Tableau 3.** Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région en % [39].

Variétés	Consistance	Teneur en eau
Deglet Nour	Demi-molle	22.60
Ghars	Sèche	13.70
Mech-Degla	molle	25.40

- **Le pH**

Le pH de la datte est légèrement acide, il varie entre 5 et 6. Ce pH est préjudiciable aux bactéries mais approprié au développement de la flore fongique [Reynes et al., 1994].

- **L'acidité**

L'acidité de la datte est faible est varie entre 2,02 et 6,3 g d'acide/Kg. Une forte acidité est souvent associée à une mauvaise qualité. Le taux de l'acidité de la datte est proportionnel à la teneur en eau et donc inversement proportionnel au degré de maturité. Des travaux faits par les mêmes chercheurs sur la variété Deglet Nour, montrent qu'au cours des différents stades de l'évolution de cette variété, les acides organiques décelés sont l'acide malique et acétique, ils apparaissent et disparaissent entre le stade Kimri et le début de stade Khalal, puis à partir de ce stade ils se stabilisent en quantité égale, c'est ce qui est indiqué par le tableau suivant.



**Tableau 4.** Modification de pH de Deglet Nour au cours de son développement

Stades de maturation	pH
bleh vert	5,5
Khalal	5,7
50% Martouba	6
Martouba 100%	6,2

- **Les sucres**

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélée essentiellement la présence de trois types de sucres : le saccharose, le glucose et le fructose [40,41]. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol [42,43,44]. La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 60 et 80 % du poids de la pulpe fraîche . Le tableau 5 montre la teneur en sucres dans les dattes, signalons une grande variabilité des teneurs pour le saccharose et les sucres réducteurs. La teneur en saccharose varie entre 0,8 et 52,4 %, celle des sucres réducteurs est de 20 à 94 % de matière sèche.

**Tableau 5.** Teneur en sucres de quelques variétés de dattes algériennes de la région de Zibans, en % de matière sèche [45]

Variétés	Consistance	Sucre totaux	Saccharose	Sucre réducteurs
Chars		87,42	5,00	82,12
Tantboucht	Molle	79,80	0,90	78,80
Deglet-Ziane		84,00	2,45	81,45
Ltima		78,51	4,29	73,40
Safraia	Demi- Molle	79,00	1,31	77,61
El-Ghazi		94,90	0,80	94,00
Mech-Degla		75,10	52,40	20,00
Kenta	Sèche	72,30	40,55	36,80
Horra		82,46	50,00	29,86

- **Les protides**

La pulpe de datte ne renferme qu'une faible quantité de protéines. De nombreuses analyses faites par différents auteurs ont montré que les matières protéiques représentent environ 2%. La composition en acides aminés des protéines de la pulpe de datte révèle la présence de 6 à 8 acides aminés indispensables pour l'homme avec une absence de la méthionine et de phénylalanine.

- **Les lipides**

La pulpe des dattes contient une faible quantité de lipides. Elle est de l'ordre de 0,13 à 1,9% du poids frais. Cette quantité de lipides est concentrée dans l'épicarpe de la datte, sous forme d'une couche de cires.

- **Les minéraux**

Les dattes peuvent être considérées comme les fruits les plus riches en éléments minéraux.

**Tableau 6 .** Composition de 100 g de dattes en éléments minéraux [46,47]

Eléments minéraux	Na	K	P	Ca	Mg	Fe	Zn
Quantité (mg)	35	65	57	63	50	1,9	0,34

- **Les vitamines**

La pulpe de datte contient des vitamines en quantités variable selon les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe B en quantité appréciable, mais peu de vitamine C.

**Tableau 7.** Composition vitaminique de la pulpe de datte

Vitamines	Quantité (mg/100g)
Acide ascorbique (C)	5-20
Thiamine (B1)	0,06-0,13
Riboflavine (B2)	0,05-0,17
Acide nicotinique (PP)	0,5-0,6
Acide pantothénique (B5)	0,06-0,07
Biotine	0,004-0,006

- **Les fibres alimentaires**

La consommation de dattes contribue à l'apport en fibres, souvent faible dans l'alimentation. Une portion de 25 g de dattes (fruits) fournit 2 g de fibres, ce qui représente 5 à 8 % de la quantité de fibres recommandée par jour, soit 38 g pour les hommes et 25 g

pour les femmes. Les fibres des dattes sont constituées à 57 % de fibres insolubles et à 43 % de fibres solubles.

- **Les composés phénoliques**

Mansouri et ses collaborateurs ont mené une étude sur des variétés de dattes mures récoltés sur des palmeraies de Ghardaia. Les différentes variétés analysées ont présenté un contenu phénolique dans la gamme 2,49 - 8,36 mg/100 g du poids à l'état frais. Ces résultats ont prouvé que la datte a un contenu phénolique bas comparée à d'autres fruits. La quasi-totalité des dattes est marquée par une astringence plus ou moins prononcée due au dépôt d'une couche de tanins en dessous de la peau au cours du stade loulou. Les teneurs en tanins insolubles pour les dattes vertes, mûres stockées sont respectivement de l'ordre de 55.39 et 219 mg/100 g de M.S.

- **Les enzymes**

Les enzymes jouent un rôle important dans les processus de la conversion qui ont lieu pendant la formation et la maturation du fruit. Parmi ces enzymes, on peut citer l'invertase, les polygalacturonases et pectinesterases, les polyphénoloxydases et les peroxydases.

**a) Invertase**

Responsable de l'inversion de saccharose en glucose et fructose et apparenter la texture et la flexibilité.

**b) Polygalacturonases et pectinesterases**

Leur activité pectinolytique ne leur permet pas d'être présentes dans les derniers stades de maturation.

**c) Les polyphénoloxydases et les peroxydases**

Les cellules végétales renferment souvent en abondance des composés phénoliques qui s'oxydent facilement en quinones en présence d'oxygène sous l'action d'enzymes dont les principales sont les polyphénoloxydases et les peroxydases. Les quinones formées s'oxydent à leur tour, et se polymérisent en donnant des composés bruns qui sont responsables du brunissement.

- **Valeur nutritionnelle des dattes**

La datte est un aliment énergétique qui renferme beaucoup de sucre, où 100g de pulpe de Deglet Nour donnent 306 Kilo calories. Néanmoins, Patron cité par Munier (1973), affirme que 100 g de pulpe de variétés communes donnent 260 Kilo calories.

- **Composition en acides aminés**

Dans le tableau suivant, les besoins journaliers sont exprimés en mg pour un homme de 65-70 kg par 24h, en activité moyenne [48].

**Tableau 8.** Teneurs en acides aminés essentiels des dattes et les besoins humains [49].

Acides aminés essentiels	Teneurs (mg/100g de MF-DN*)	Besoins journaliers (mg)
Isoleucine	41,95	700
Leucine	86,25	1100
Lysine	64,5	800
Méthionine	39,35	1100
Cystine	31,85	1100
Phenyl-alanine	55,10	1100
Tyrosine	46,35	1100
Tryptophane	19,5	250
Thréonine	76,35	250
Valine	91,10	80

\*MF-DN: matière fraîche de Dglet Nour

La datte ne peut à elle seule satisfaire tous les besoins de l'organisme en acides aminés essentiels. D'après le tableau 09, un homme d'une activité moyenne doit consommer quotidiennement une quantité élevée de dattes, soit 1,3 à 1,6 kg. Des résultats similaires sur les variétés des dattes irakiennes, Halawi et Zahdi. Ces résultats montrent que malgré leurs faibles quantités, les protéines des dattes sont assez équilibrées qualitativement.

- **Les acides gras**

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais. Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. La teneur en lipides passe de 1,25 % au stade Bser à 6,33 % au stade Bleh (tableau 10). Cette teneur diminue progressivement au stade Routab pour atteindre une valeur de 1.97 % de matière sèche au stade Tamar [49].

**Tableau 9.** Composition en acides gras de la datte Deglet-Nour, en % de matière grasse

<b>Acides gras</b>	<b>Teneur en % de matière grasses</b>
Acide linoléique	12.30
Acide linoléique	11.47
Acide oléique	10.74
Acide stéarique	10.47
Acide palmitique	7.89
Acide myristique	8.66

### 1.11.2. Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un albumen blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique [50]. Le tableau ci-dessous montre la composition biochimique des noyaux de datte de Deglet Nour.

**Tableau 10.** Composition biochimique des noyaux des dattes

Constituants	Teneur en %
Eau	6.46
Glucides	62.51
Protides	5.22
Lipides	8.49
Cellulose	16.20
Cendre	1.12

### 1.12. Utilisations des dattes en médecine traditionnelle

Energétique, le fruit permet de lutter contre l'anémie et les déminéralisations. Il est donc recommandé aux femmes qui allaitent. Régulatrices de la fonction intestinale, les dattes pilées dans de l'eau soignent les hémorroïdes, les constipations, mais aussi les dattes vertes traitent les troubles intestinaux comme les diarrhées. Calmantes sous forme de sirop très concentré, le robb, cette préparation apaise et endort les enfants. Elle est aussi utilisée pour les maladies nerveuses et dans les affections broncho-pulmonaires. En décoction ou en infusion, les dattes traitent les rhumes. En gargarisme, elles soignent les maux de gorge. Le père de Foucauld, dans son célèbre dictionnaire, cite l'usage des cataplasmes composés de dattes, de mil et du fruit d'une Asclépiadacée, *Solenostemma argel*, pour calmer les douleurs rhumatismales. D'un point de vue symbolique aussi, la datte joue un rôle important. L'ethnologue Saskia Walentowitz rapporte que chez les Touareg Kel Ewey de l'Air, la coutume veut qu'une vieille femme frotte le palais du nouveau-né avec la pulpe, cette substance douce, mais aussi avec le fruit amer d'un acacia, pour qu'il ait un avant-goût de la vie, parfois douce et parfois amère.

**Chapitre II**

**Etude phytochimique et  
pharmacologique des  
métabolites secondaires**



## II. 1. Présentation générale sur les polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH). Les représentants les plus nombreux (plus de 5 000 molécules isolées) et les plus connus en sont les « flavonoïdes ». Sous cette qualification un peu abusive se cachent en fait trois familles de molécules de structures voisines : les flavonoïdes *stricto sensu*, pigments végétaux jaune-orangé (leur nom venant du mot latin *flavus* : jaune), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet et un groupe de tanins, les proanthocyanidines, molécules incolores et très hydrosolubles [51,52]. Néanmoins, de nombreuses autres structures existent, tels que les acides phénols (dérivés de l'acide cinnamique, par exemple), tanins hydrolysables, coumarines, lignanes, quinones et autres phloroglucinols. Il est à noter que certains composés appartenant à ces groupes chimiques ne comportent en fait aucun hydroxyle libre, de même qu'on peut signaler la présence de fonctions phénoliques chez des composés naturels appartenant à d'autres groupes phytochimiques (terpènes, alcaloïdes..) [52]. Cette grande variété structurale annonce une certaine difficulté à connaître l'intérêt des polyphénols en tant que tels : quelles propriétés viennent de la nature polyphénolique d'une molécule et que doit-on aux particularités structurales de chaque molécule.

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière.

### II.1.1. Principales sources et utilisations actuelles des polyphénols

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter à la santé humaine les polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie – puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes et l'hygiène alimentaire, de plus en plus d'études indiquant que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) [53,52]. En

phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques [54]. Ainsi les flavonoïdes les plus utilisés sont, d'une part ceux provenant du ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), qui participent à la lutte contre la sénescence cérébrale et ses conséquences (altération de la mémoire, confusion...) et, d'autre part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et le rutoside (extrait de *Sophora japonica* L.), qui sont utilisés dans le traitement des troubles liés à la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire). Mais on attribue également aux polyphénols des propriétés neurosédatives (passiflore, *Passiflora incarnata* L.), antispasmodiques (thym, *Thymus vulgaris* L., *Thymus zygis* L.), anti-inflammatoires (camomille romaine, *Chamaemelum nobile* (L.) All. ; achillée millefeuille, *Achillea millefolium* L.) et diurétiques (bouleau, *Betula* spp. ; genêt à balai, *Cytisus scoparius* (L.) Link.). Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques (sureau, *Sambucus nigra* L.), voire même antiseptiques urinaires (canneberge à gros fruits, *Vaccinium macrocarpon* Aiton.). Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.). Les tanins (proanthocyanidines et tanins hydrolysables) sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices (ratanhia du Pérou, *Krameria lappacea* (Dombey) Burdet & Simpson), cicatrisantes (hamamélis, *Hamamelis virginiana* L.) et antidiarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques. Les acides-phénols sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut, *Cynara scolymus* L. On connaît bien sûr les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (spirée ulmaire, *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. ; saule, *Salix* spp.). Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices (mélilot, *Melilotus officinalis* (L.) Pallas ; marronnier d'Inde, *Aesculus hippocastanum* L.), neurosédatives (aspérule odorante, *Galium odoratum* (L.) Scop.), diurétiques (piloselle, *Hieracium pilosella* L.), stomachiques et carminatives (angélique, *Angelica archangelica* L.). Certaines quinones, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula*

L.), le cascara (*Rhamnus purshianus* DC.), les sénéés (*Cassia* spp.), les aloès (*Aloe* spp.), la rhubarbe de Chine (*Rheum* spp.). Ces dérivés seraient irritants et leur utilisation prolongée pourrait être dangereuse à long terme. Les propriétés antispasmodiques des phloroglucinols sont très largement exploitées, notamment par le biais d'une spécialité bien connue en France. Et si l'action antidépressive du millepertuis (*Hypericum perforatum* L.) a longtemps été attribuée à une quinone, l'hypericine, il semble de plus en plus clairement que ce soit un dérivé prénylé de phloroglucinol, l'hyperforine, qui en soit le principal responsable. Si certains des effets qu'on prête aux dérivés phénoliques semblent indiscutables, il n'en convient pas moins de rester prudent : les polyphénols étant présents de façon ubiquitaire dans le règne végétal, leur responsabilité dans une action donnée semble souvent avoir été établie sur le fait qu'aucune autre molécule susceptible de justifier l'activité n'était présente dans telle ou telle plante réputée

efficace ou par simple référence à un résultat obtenu *in vitro*, sans confirmation sur un modèle biologique pertinent. Et si des études pharmacologiques ont parfois permis d'apporter une réelle justification à leur utilisation ou une élucidation partielle de leur mécanisme d'action, il convient bien de reconnaître que les preuves cliniques de leur supériorité vis-à-vis d'un placebo font souvent défaut [52]. L'étude des polyphénols dans l'alimentation vise, quant à elle, plutôt à déterminer l'intérêt d'une alimentation plus riche en végétaux, qu'il s'agisse des « fruits et légumes » en général ou de certaines plantes en particulier. Le type d'avantage attendu est la prévention de pathologies inhérentes au mode de vie sédentaire favorisé par nos sociétés : lutte contre le cholestérol (isoflavones du soja) et la morbidité cardiovasculaire (vin rouge) [55], le stress et la dépression (cacao, chocolat) et les cancers (thés vert et noir, café). D'une manière générale, on peut dire qu'on cherche, à travers une alimentation plus saine, à vivre plus vieux et en meilleure santé. De fait, des questions se posent : les polyphénols étant présents dans tous les végétaux, certains sont-ils plus intéressants que d'autres ? Quelle importance faudra-t-il accorder aux polyphénols dans l'effet positif que peut avoir une alimentation végétarienne ? De plus, les personnes soucieuses de leur hygiène de vie et de son impact sur leur santé, n'ont-elles pas tendance à cumuler tous les facteurs favorables à une plus longue espérance de vie, tels qu'une consommation importante de fruits et de légumes, la pratique d'un exercice physique régulier ou l'absence de comportements à risque (tabagisme, alcoolisme) ? Autant de

problèmes qui complexifient énormément l'analyse des résultats des études cliniques entreprises. C'est pourquoi il convient de continuer à réfléchir sur les mécanismes d'actions potentiels de ces composés.

## **II.2. Classification des polyphénols**

Une classification de ces substances a été proposée par Harbone en 1980 (Figure 1). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Deux principales classes sont largement répandues :

- ✓ Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques),
- ✓ Les flavonoïdes.
- ✓ Les tanins et lignines

### **II.2.1. Polyphénols monomériques**

#### **a. Acides phénoliques**

Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués (Figure 1) :

- Les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique,
- Les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique.

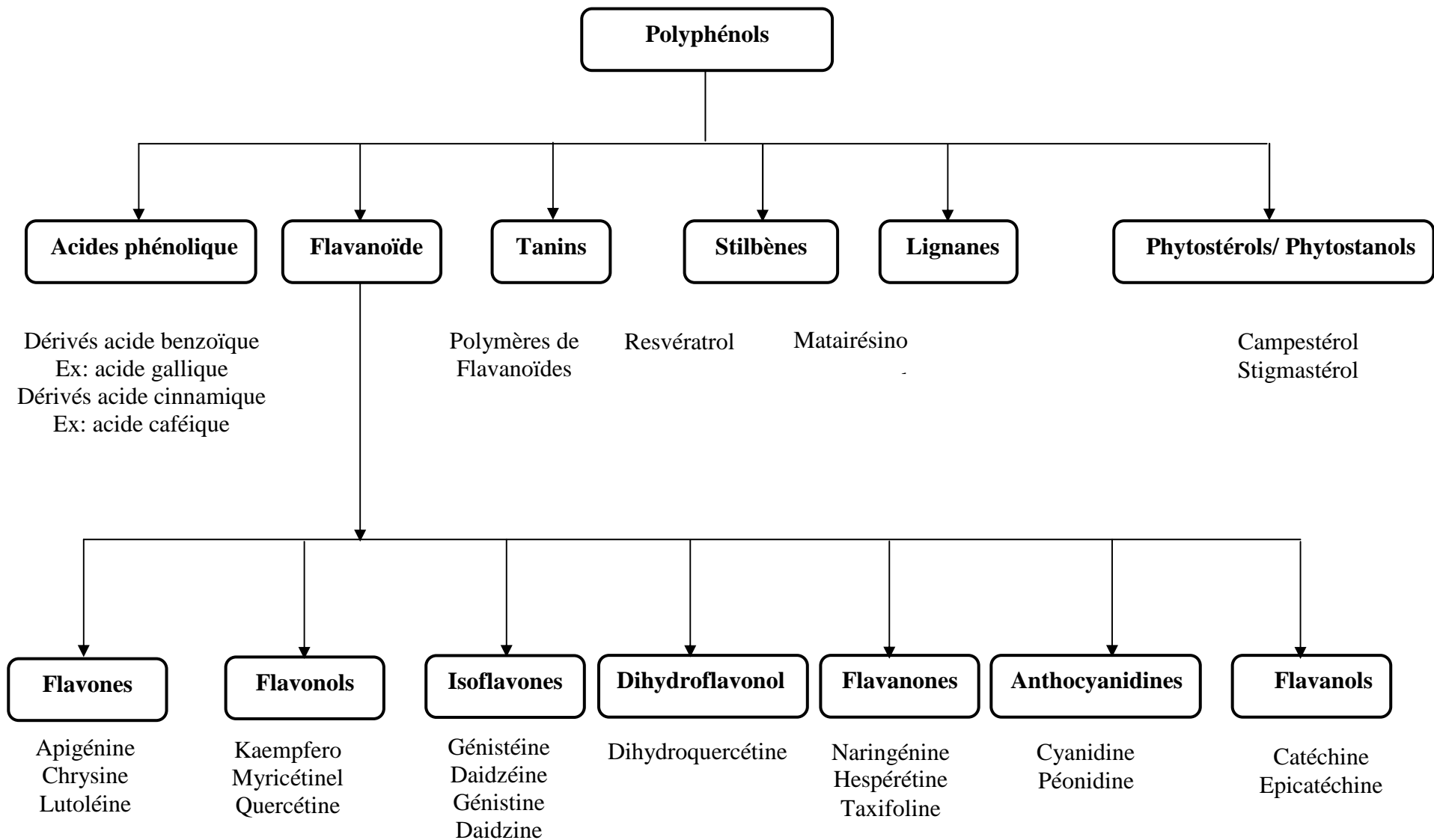


Figure 11. Classification des polyphénols

## II.2.2. Les tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux. On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

### II.2.2.1. Les tanins hydrolysables

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique [56]. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [57,58].

### II.2.2.2. Les tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevées. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi pro anthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A. Ci-dessus est représenté le modèle de structure d'un tanin de type B [59].

Si  $R = H$  ou  $OH$ , la structure représente respectivement un procyanidine ou un prodelphinidine. La liaison 4-6 en pointillés est une alternative de liaison interflavanique. On note la présence d'unité terminale dans une telle structure [60].

## II.3. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6. L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomère.

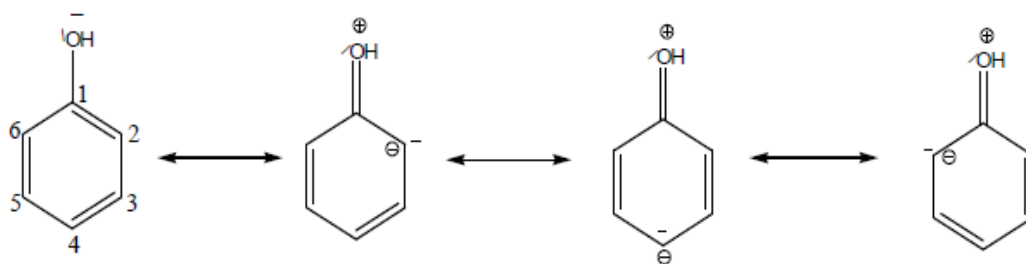


Figure 12. Formes mésomère du phénol

### II.3.1. Nucléophilie

La nucléophilie des composés phénoliques est portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone en ortho et para du groupement OH (suite à l'effet (+M)). Cette propriété est à l'origine des réactions de substituants électrophiles aromatique (alkylation, acylation, etc.) régiosélectives des positions ortho et para. Les substituants de type 1,3-dihydroxy (résorcinol) et 1,3,5-trihydroxy (phloroglucinol) permettent une accumulation de densité électronique sur les sommets C2, C4 et C6 (tous *ortho* ou *para* des groupements OH), accentuant ainsi le caractère nucléophile.

Le cycle A des flavanols possède deux centres C6 et C8 fortement nucléophiles car en *ortho* et en *para* de trois groupements OH ou OR à effet (+M). Le noyau A est également activé par le groupement carboné saturé en C4. Cette nucléophilie permet des réactions de substitutions électrophiles aromatiques qui peuvent par exemple intervenir lors de la production du thé noir [61].

### II.3.2. Propriétés réductrices

Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. Dans le cas d'un phénol ArOH, le radical-cation formé est un acide fort qui perdu un protone aussitôt pour conduire à un radical phénoxy ou aryloxy ArO.

Le radical aryloxy (ArO.) peut être formé directement par transfert d'hydrogène phénolique vers un radical de haute énergie tels que les radicaux oxyl (RO.) et peroxy (ROO.) formés par exemple au cours de l'autoxydation des lipides.

Ces réactions de transfert d'atome H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en radical aryloxy stabilisé par résonance sont l'un des principaux mécanismes

d'action antioxydantes des phénols. La capacité du phénol à céder un atome H peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy, BDE*). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'hydrogène.

### II.3.3. Polarisabilité

La polarisabilité des phénols leur permet de développer de fortes interactions moléculaires de dispersion (composante attractive des interactions de Vander Waals) avec autres composés polarisables. Ce phénomène résulte du couplage entre les fluctuations électroniques de deux molécules voisines. Ainsi, en solution aqueuse, l'interaction du noyau benzénique apolaire du phénol avec une autre entité polarisable telle qu'un second cycle aromatique est favorisée par l'effet hydrophobe .

Les molécules d'eau de solvation s'organisent de manière à maintenir entre elles autant de liaison hydrogène que possible, et de ce fait, l'empilement de deux noyaux benzéniques dans l'eau a deux conséquences avantageuses :

- Le développement de forte interaction de dispersion entre les deux noyaux ;
- Le relargage d'une partie des molécules d'eau de solvation dans le corps du solvant.

Ce dernier phénomène, appelé « Effet hydrophobe » puisqu'il minimise la surface de contact entre les deux solutés et l'eau, se traduit par une augmentation du nombre de liaison hydrogène entre noyau et molécule d'eau ( $\Delta H < 0$ ) et une relative désorganisation ( $\Delta S > 0$ ) qui tendent à stabiliser le complexe moléculaire formé entre deux molécules empilées. La combinaison des interactions de dispersion et de l'effet hydrophobe constitue la principale force motrice pour la compléxation moléculaire des phénols dans l'eau.



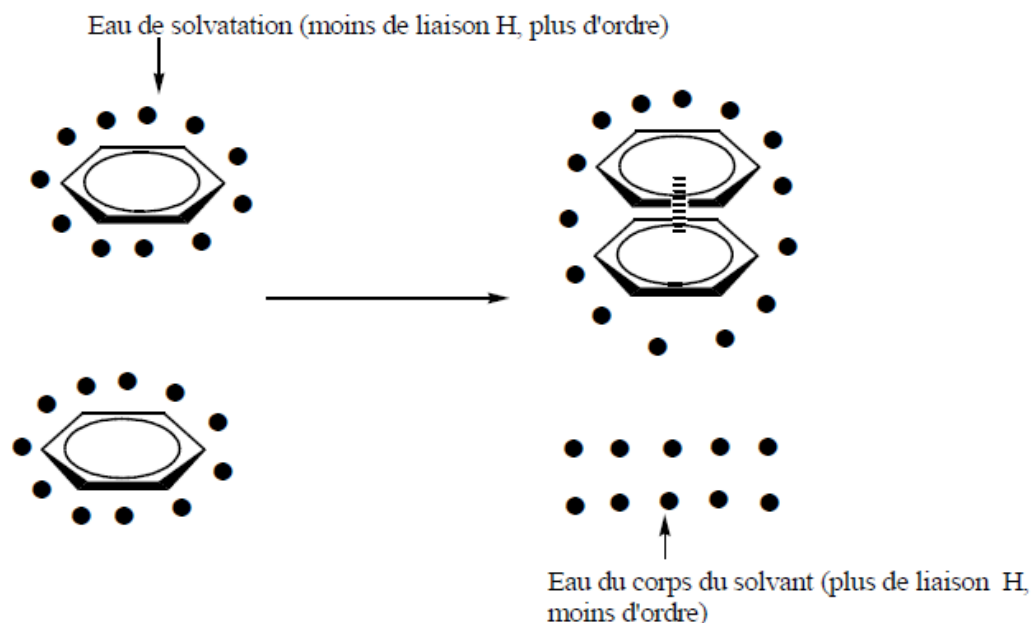


Figure 13. Effet hydrophobe

#### II.3.4. Liaison hydrogène

Les phénols sont des donneurs de liaison hydrogène (liaison H) en raison du caractère acide du proton du groupe OH. Ce sont aussi des accepteurs de liaison H. En fait, seule la paire libre de l'atome O qui n'est pas conjuguée avec le cycle est capable d'accepter une liaison H en provenance d'un donneur. Ainsi, un phénol est capable de donner une liaison H et d'en recevoir une seulement. Notons que ces liaisons H se renforcent mutuellement (coopérativité). Par exemple, en donnant une liaison H, le phénol allonge sa liaison OH. Cet état de pré dissociation accentue la densité électronique sur le centre O et donc son caractère accepteur de liaison H.

#### II.3.5. Acidité

La coupure hétéro lytique de la liaison OH (déprotonation) entraîne la formation d'un ion phénate dans lequel la délocalisation électronique de l'atome O vers le cycle (effet +M) est fortement augmentée. Ce phénomène et la forte solvation de l'anion phénate par formation de liaison H avec l'eau permettent d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols dans l'eau. Les propriétés caractéristiques des phénols (nucléophilie, caractère réducteur, polarisabilité) sont amplifiées lors de la formation des anions phénates correspondants.

Les groupements OH en position para et ortho des noyaux phénoliques de polyphénols présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au

moins partielle à pH neutre. Cette exaltation de l'acidité est due à la stabilisation de l'ion phénate correspondant par délocalisation de la densité électronique vers le groupement à effet (-M). Elle peut être traduite en termes de formes mésomères.

### II.3.6. Stabilité des polyphénols

L'oxydation des polyphénols est susceptible d'intervenir :

- ✓ Par voie enzymatique (catalysée par la polyphénoloxydase dans des conditions d'aérobies ou par les peroxydases en présence de peroxyde d'hydrogène) au cours des procédés technologiques d'élaboration des aliments ou après ingestion (catabolisme oxydant).
- ✓ Par voie non enzymatique : autoxydation lors des traitements thermiques, oxydation conjointe à l'action antioxydante. Dans ce dernier cas, il s'agit typiquement de processus d'oxydation couplés à la peroxydation des lipides polyinsaturés et qui peuvent intervenir dans l'aliment ou chez l'homme après ingestion.

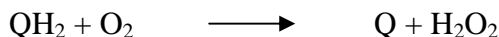
### II.3.7. Autoxydation

Si la capture des espèces oxygénées réactives (EOR) est effectivement un mécanisme d'action antioxydante, la réaction éventuelle des phénols avec le dioxygène de l'air (autoxydation) est une cause potentielle d'instabilité et de toxicité par production des EOR. Heureusement, ce phénomène est défavorable :

- ✓ d'un point de vue thermodynamique, car la réduction mono-électronique du dioxygène requiert des réducteurs forts :  $O_2 + 1 e^- \longrightarrow O_2^{\circ-}$ ,  $E_0 = -0,16 \text{ V}$  pour  $c(O_2) = 1 \text{ M}$  Seuls les polyphénols les plus réducteurs et en milieu fortement basique où ils sont sous forme de polyanions seraient susceptibles de transférer directement un électron vers  $O_2$ .
- ✓ D'un point de vue cinétique, car le dioxygène présente deux électrons célibataires ( $OM \pi^*$ ) dans l'état fondamental qui lui confèrent un spin total de 1 (biradical). La loi de conservation du spin total au cours d'une réaction chimique autorise la combinaison des radicaux organiques avec  $O_2$  mais interdit l'oxygénation directe des molécules organiques dont les électrons sont appariés.

Cependant les ions de métaux de transition, particulièrement Fe(III), contaminant par exemple les sels utilisés dans la préparation de solutions tampons, et dont la

concentration peut aisément atteindre 1µM, peuvent catalyser efficacement l'autoxydation avec production de peroxyde d'hydrogène voire de superoxyde. Pour un polyphénol à noyau catéchol (QH<sub>2</sub>), le bilan chimique de la réaction peut écrire :



La décomposition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les traces métalliques (réaction de Fenton) conduit ensuite au radical HO° très réactifs :



Ainsi, l'autoxydation de la quercétine en milieu faiblement basique s'accompagne de la consommation de O<sub>2</sub> et de la formation du radical HO° mis en évidence par résonance paramagnétique électronique (RPE) par détection du composé d'addition stable formé en présence d'un piègeur de spin (DPMO). Dans les mêmes conditions, la rutine, un b3 glycoside de la quercétine, et le kaempférol (analogue 3'-désoxy de la quercétine) ne sont pas oxydés. Même si le mécanisme de l'autoxydation des polyphénols demeure mal connu, il semble que l'étape-clé consiste en la réduction de Fe III en Fe II par le polyphénol. La production d'EOR procéderait alors par réduction du dioxygène et du peroxyde d'hydrogène par Fe II avec régénération de Fe III. Notons que le phénomène semble très dépendant de la nature des ligands du fer. Ainsi, à pH neutre, les flavonoïdes fortement réducteurs tels que la quercétine seraient capables de réduire le complexe Fe III-EDTA, favorisant ainsi la réaction de Fenton mais pas le complexe Fe III-citrate. L'autoxydation des polyphénols peut être responsable des effets pro-oxydants parfois observés, notamment lors de tests antioxydants impliquant des générateurs métalliques de stress oxydant.

### II.3.8. Mécanismes d'oxydation

Il semble que, pour un polyphénol donné, la distribution de produit d'oxydation soit peu dépendante de la nature du système oxydant. Selon ce dernier, l'oxydation peut procéder par succession de transfert mono-électronique avec formation d'intermédiaires radicalaires (radicaux aryloxy) ou par oxydation bi-électronique. Malgré la forte délocalisation de leur électron p, les radicaux aryloxy dérivés des polyphénols sont des intermédiaires très instables qui ne sont détectable que par méthodes cinétiques rapides. Ils évoluent rapidement par dimérisation, dismutation voire réaction avec le dioxygène.

Il semble que la plupart des radicaux dérivés de polyphénols suivent une cinétique de second ordre, ce qui suggère que la dimérisation, dismutation sont les voies privilégiées.

Cette dernière voie requiert en générale un noyau catéchol, (voire pyrogallol ou 1,2,3-trihydroxybenzène) tels que la catéchine, la quercétine, l'acide gallique ou l'acide caféique. Elle s'accompagne alors de la formation d'une *ortho*-quinone avec régénération du polyphénol parent. La formation de radicaux semi-quinone à partir d'un polyphénol à noyau catéchol est représentée dans le cas de l'acide caféique. Le renforcement de la liaison H intramoléculaire au cours de la dissociation favorise le transfert d'atome H.

Dans le cas particulier des 3,4'-dihydroxyflavones (4'-hydroxyflavonols), la dismutation conduit à des *p*-méthylènequinones. Les *o*-quinones et *p*-méthylènequinones sont elles-mêmes des intermédiaires peu stables. Du fait de leur fort caractère électrophile, elles évoluent rapidement par diverses voies:

- ✓ Dimérisation, voire oligomérisation, cette voie semble prépondérante avec les quinones dérivées de l'acide caféique et de la catéchine. La réaction peut procéder par addition nucléophile d'une molécule de polyphénol sur l'*o*-quinone correspondante ou par recombinaison de radicaux aryloxy. L'oxydation de la catéchine par la polyphénoloxydase conduit à une variété de dimères de types biaryle et biaryléther et dont la liaison entre deux unités catéchine implique le cycle A de l'une et le cycle B de l'autre. D'après ces structures, il semble que les deux mécanismes soient

en compétition ;

- ✓ Addition de solvant (eau, alcool). Dans le cas de la quercétine, l'addition de solvant a lieu sur le centre C2 de la *p*-méthylènequinone, ce qui entraîne une déconjugaison du cycle central. Dans le cas des anthocyanes, l'addition d'eau peut être suivie par l'élimination du cycle B avec formation de coumarines ;
- ✓ Addition d'un bon nucléophile présent dans le milieu tel que le résidu du tripeptide glutathion voire un autre polyphénol. Notons que le couplage des quinones à des résidus nucléophiles de protéines et d'acide nucléiques est un phénomène à répercussion biologique potentielle.

En outre, le caractère oxydant des *o*-quinones et des radicaux aryloxy permet la cooxydation de substrats réducteurs tels que l'ion ascorbate, le glutathion et d'autres phénols.

## II.4. Rôle des polyphénols dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne. Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme [63].

### II.4.1. Importance nutritionnelle des polyphénols

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle.

L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent par ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydants sont remarquables [64].

### II.4.2. Stress oxydant- Espèces oxygénées réactives

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont

dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...). Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires, il est actuellement admis que les EOR sont de véritables messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives ou vasculaires telles que l'athérosclérose ou l'hypertension. Les cellules génèrent divers types d'EOR de réactivités différentes [65,66,67].

### II.5. Les polyphénols comme antioxydants

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante sont :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

Les polyphénols peuvent agir selon ces divers mécanismes.

#### A. Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes : inhibition d'une grande variété d'enzymes modulation du fonctionnement de divers récepteurs ainsi que du processus de transcription de certains gènes (par interaction du cytosol avec les facteurs de transcription ou certains précurseurs). Outre les effets antioxydants, ces interactions, qui sont encore à valider *in vivo*, sont vraisemblablement à la base des effets bénéfiques des flavonoïdes. Par exemples, les acides hydroxycinnamiques sont des inhibiteurs de protéines de coagulation, et jouent ainsi un rôle d'anticoagulant [68].

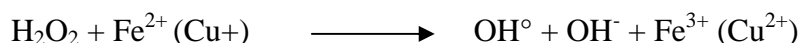
L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR [69,70]. Ce double action est bien illustré par le cas de la xanthine oxydase, cet enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Hansaki et ses collaborateurs, dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et

par conséquent, peuvent prévenir cette maladie en réduisant à la fois les concentrations de l'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains [71].

- Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols (cycle C non plan) ne sont pas inhibiteurs de la xanthine oxydase ;
- Les flavonols et les flavones (cycle C plan et conjugué avec les cycles A et B) ont la capacité d'inhiber l'enzyme.

### B. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer ou du cuivre sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour le superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :

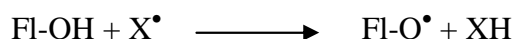


En outre, l'autoxydation des ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$  est une source de superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante.

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques [74]. La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leurs bande d'absorption dans le domaine UV-Visible. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques [75].

### C. Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes ( $\text{ROO}^\bullet$ ), alkoxydes ( $\text{RO}^\bullet$ ) et hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où X' représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus. Le radical aryloxy (Fl-O<sup>•</sup>) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.

Eventuellement, le radical aryloxy peut réduire le dioxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple Fl-O<sup>•</sup>/Fl-OOH mais aussi de la réactivité du radical Fl-O<sup>•</sup>.

Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres [76,77,78].

## II.6. Propriétés thérapeutiques des polyphénols

### II.6.1. Etudes épidémiologiques et propriétés biologiques *in vitro*

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro* et découlent de leur activité réductrice (effets anti- voire pro-oxydants) et de leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

L'une des premières propriétés reconnue aux flavonoïdes est d'être «veino-actifs» c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les catéchines du thé sont des inhibiteurs de l'angiogénèse *in vitro*.

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture. Les propriétés biologiques des métabolites conjugués majoritairement présents dans le sang et les tissus ont en revanche été très peu étudiées, faute de disposer des standards commerciaux.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après absorption



éventuelle au travers de la paroi intestinale) et une combinaison d'études cliniques pertinentes est indispensable. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir. C'est notamment le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

### **II.6.2. Effet antiallergique**

Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranescellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [80].

### **II.6.3. Effet anti-inflammatoire**

Sous l'action de la cycloxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude de Landolfi et son groupe a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [81]. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cycloxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cycloxygénase.

De nombreux travaux démontrent que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires [82,83,84] et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [85]. Les polyphénols sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T [86,87]. Cet effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable. En effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) (Figure 1.4) inhibent la prolifération des

lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B mais l'explication reste encore inconnue.

L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine kinase C ou protéine tyrosine kinase) [88,89]. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes [90].

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives (ROS) par les neutrophiles qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose [91]. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables d'inhiber et/ou de réduire cette production de ROS par les neutrophiles [92].

#### **II.6.4. Effet anti-ulcère**

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production leucotriènes [93].

#### **II.6.5. Propriétés anti-cancérigènes**

Les effets anti-carcinogènes des polyphénols chez les animaux ont été bien documentés. En effet, lorsqu'ils sont administrés aux rats ou aux souris, avant ou après l'administration d'un agent cancérigène ou l'implantation d'une lignée de cellules cancérigènes humaines, les polyphénols peuvent protéger ou réduire le nombre de tumeurs et/ou leur croissance [94,95,96].

L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par son interaction avec le complexe calcium-calmoduline [97], qui jouerait un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeurs.

D'autres polyphénols, tels que la catéchine, les isoflavones, les lignanes, les flavanones, l'acide ellagique et le resvératrol ont aussi montré leurs effets protecteurs dans quelques modèles. Plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer ces effets anti-cancérigènes. D'abord, les polyphénols peuvent agir comme des agents de blocage dans

l'étape de déclenchement du processus cancérigène. Ils influencent le métabolisme des pro-cancérogènes en inhibant les enzymes intervenant dans l'activation des pro-cancérogènes en intermédiaires mutagènes et cancérogènes [98]. En plus, ils peuvent faciliter leur excrétion en augmentant l'expression des enzymes de conjugaison de la phase II [99]. La prise des polyphénols pourrait alors activer ces enzymes dans le but de leur propre désintoxication et, de cette façon, induire la stimulation générale de nos défenses contre le xénobiotiques [100]. Les polyphénols peuvent également limiter la formation des cellules initiales en stimulant la réparation de l'ADN [101,102].

### **II.6.6. Polyphénols et maladies cardio-vasculaires**

Un certain nombre d'études effectuées sur des animaux ont démontré que la consommation de polyphénols limiterait le développement de lésions athéromateuses [103]. C'est ainsi que les ajouts de vin sans alcool, de la catéchine ou de la quercétine à l'eau potable ont réduit la taille de ces lésions chez les souris [104,105]. Ces effets sont associés à une réduction de la prise de lipoprotéines de faible densité (LFD) par les macrophages ; une oxydation plus faible de ces protéines et une diminution de leur aptitude à l'agrégation. Des résultats semblables ont été obtenus chez les lapins en utilisant des régimes enrichis avec du cholestérol dans un extrait de graines de raisin riche en proanthocyanidines [106, 107,108,109]. En effet, plusieurs études ont prouvé que les polyphénols peuvent empêcher l'oxydation de LFD *in vitro*. Ce type d'oxydation est considéré comme le mécanisme principal de l'athérosclérose.

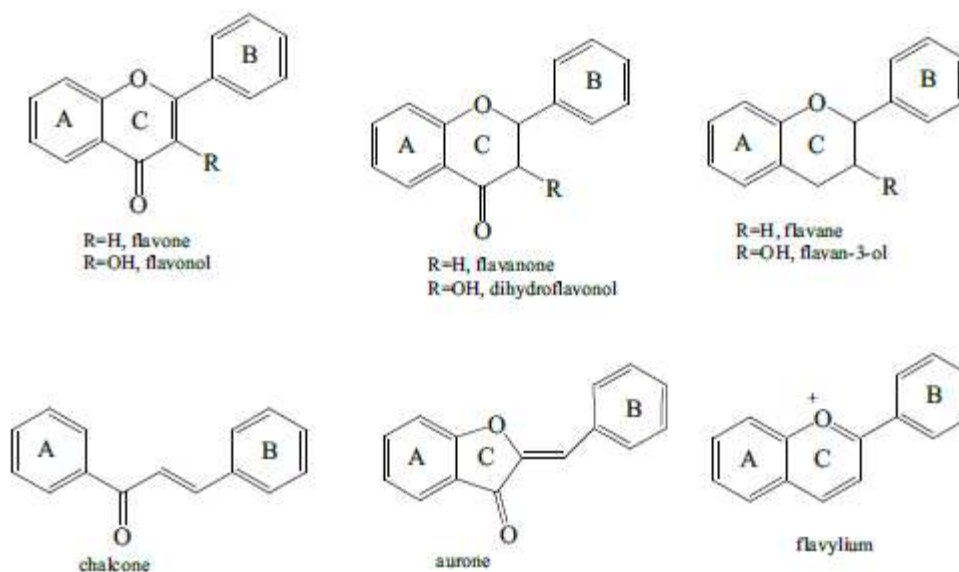
### **II.7 les flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments

#### **II.7.1. Généralités sur les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont fréquemment décrits chez les Fabaceae. Ce sont des métabolites secondaires des plantes [110]. Contrairement aux flavonoïdes présents dans les fleurs, qui leur confèrent leurs couleurs, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont masqués par la présence de chlorophylle. Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune. Ce groupe de composés est en effet défini par une structure générale en C15, caractérisée par un enchaînement Ar-C3-Ar. Les flavonoïdes "*lato sensu*", comprennent les flavonoïdes "*stricto sensu*" (flavones, flavonols, flavanones,

flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes (Figure 33) [111].



**Figure 14** : Structures de base des flavonoïdes *stricto sensu*

## II.7.2. Distribution et biosynthèse

### II.7.2.1. Les flavonoïdes stricto sensu

- **Distribution**

Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones, notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux [112].

- **Biosynthèse**

Les flavonoïdes "*stricto sensu*" dérivent d'une structure de type 1,3- diphénylpropane. La première étape intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes est une étape commune à beaucoup d'autres métabolites, elle est désignée sous le nom générique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Elle permet la synthèse d'acide *p* coumarique et d'acide cinnamique. L'enzyme, permettant la désamination non-oxydative de la phénylalanine et donc la formation de l'acide cinnamique, est nommée PAL pour phenylalanine ammonia lyase [113,114,115].

### II.7.2.2. Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase sous forme de 2*S*-flavanones, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin. Il semblerait que seuls les stéréoisomères 2*S* sont biologiquement actifs [116]. Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont décrites dans de nombreuses familles, en particulier les Asteraceae, les Leguminosae et les Rutaceae. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines, les écorces de racine, en particulier chez les Leguminosae. La majorité des flavanones glycosylés sont des *O*glycosides .

### II.7.2.3. Les isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane. Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (Figure 37), classés notamment en fonction du degré d'oxydation, l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires, les plus communs étant les isoflavones, alors que les isoflavanols et les coumaranochromones sont peu rencontrés. Les dérivés glycosylés sont très communs chez les isoflavones, alors qu'ils sont très rares dans les autres sous-classes d'isoflavonoïdes. Les *C*-glycosides sont essentiellement présents dans le genre *Dalbergia* (Leguminosae).

- **Distribution**

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, quelquefois dans les feuilles et les fleurs [114]. Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont quasi-uniquement présents chez les Légumineuses, puisque 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille. Il apparaît néanmoins qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes n'appartenant pas aux Légumineuses, mais à 59 autres familles [116]. Comme chez les Légumineuses, la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones.

- **Biosynthèse**

La quasi-exclusivité de la présence d'isoflavonoïdes chez les Légumineuses peut s'expliquer. Il semblerait en effet, que l'on retrouve uniquement dans cette famille l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoïdes. Le terme IFS est utilisé pour décrire la réaction de migration du groupement aryle, couplée à une 2-hydroxylation catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS), ainsi que la réaction de déshydratation qui est soit spontanée, soit catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone déhydratase (2HID) [118,119]. Néanmoins, le gène codant pour IFS a été également identifié chez la canne à sucre.

La 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) catalyse uniquement les réactions à partir des 2S-flavanones. La migration du groupement aryle commence par l'attraction de l'hydrogène en position 3, suivie de la migration du cycle B de C-2 à C-3 et de l'hydroxylation du radical en 2, qui aboutit à la formation d'une 2-hydroxyflavanone [120,121]. Les ADNc codant pour la 2HIS ont été clonés à partir de différentes légumineuses. Ces 2HIS appartiennent à la famille des cytochromes CYP93C, et sont dépendantes de NADPH et d'O<sub>2</sub> comme co-facteurs [122,123].

Cette classe d'enzyme comprend aussi la flavone synthase II (FSII, CYP93B1) qui catalyse la 2-hydroxylation sans migration du groupement aryle, pour former après déshydratation une flavone à partir d'une flavanone .

#### **II.7.2.4. Les roténoïdes**

Les roténoïdes constituent une classe d'isoflavonoïdes possédant un cycle supplémentaire. Ils sont présents principalement chez les Fabaceae mais aussi de façon sporadique dans d'autres familles et notamment dans les genres : *Boerhaavia* et *Mirabilis* (Nyctaginaceae) [124,125,126], *Iris* (Iridaceae) *Macaranga* (Euphorbiaceae) [127] et *Sarcolobus* (Asclepiadaceae) [128]. Les roténoïdes sont connus essentiellement pour leur activité insecticide. Les plantes des genres *Derris*, *Lonchocarpus* et *Tephrosia*, connues pour contenir de la roténone, ont longtemps été utilisées comme insecticides.

Les roténoïdes proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone. Néanmoins, aucune enzyme n'a été mise en évidence pour cette étape [129].

#### **II.7.2.4. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés**

Les métabolites prénylés sont présents chez les plantes, les champignons et les bactéries. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes [130]. Ils sont le plus fréquemment rencontrés dans les racines et les écorces, mais on en retrouve aussi dans les parties aériennes, les bourgeons floraux et les graines [131]. Même s'il existe une grande diversité de flavonoïdes prénylés, ces composés ont été isolés d'un nombre limité de familles, essentiellement chez les Leguminosae, Moraceae, Cannabaceae, Clusiaceae, Umbelliferae, Rutaceae, Euphorbiaceae et Asteraceae [131,132].

Environ 1 000 composés aromatiques prénylés ont été décrits [133,134], que ce soient des chalcones, des flavones, des flavanols ou encore des isoflavonoïdes.

Donc leur perméabilité aux membranes, leur biodisponibilité, ce qui expliquerait l'activité biologiques de ces molécules [136,137].

#### **II.7.3. Fonctions des flavonoïdes pour les plantes**

##### **II.7.3.1. Rôle de protection contre le stress environnemental**

Les plantes étant immobiles, elles ont du mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles. Les flavonoïdes sont de puissants piègeurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et préviennent ainsi la peroxydation des lipides [138,139,140].

##### **II.7.3.2. Rôles comme composés de défense**

Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, ou sont uniquement biosynthétisés après une agression et dans ce cas on parle de phytoalexines [141,142].

- **Interactions plantes-microorganismes**

La plupart des plantes vivent en symbiose ou de manière commensale avec des microorganismes. Les racines de beaucoup de Légumineuses sont colonisées par des bactéries fixatrices d'azote. Beaucoup de flavonoïdes sont sécrétés par les racines des plantes et agissent comme des signaux d'induction de la transcription de gènes bactériens, nommés *nodD*, pour nodulation. Ceci représente une action significative des flavonoïdes dans la croissance et le maintien des plantes. Les flavonoïdes jouant le rôle de molécules de signalisation, sont variés : chalcones, flavones (lutéoline), dihydroxyflavones, flavanones (naringénine), isoflavonoïdes, flavonols, anthocyanidines [108].

Les flavonoïdes, comme molécules de signalisation, interviennent à d'autres niveaux comme dans les interactions symbiotiques avec les champignons. La colonisation des plantes par des champignons mycorrhiziens apparait comme un phénomène universel, permettant de transférer les minéraux, en particulier le phosphore, aux plantes et detransférer les carbohydrates aux champignons [108]. La colonisation des racines de *Medicago truncatula* (alfalfa) par le champignon mycorrhizien *Glomus versiforme* entraîne des changements dans la composition en flavonoïdes et en isoflavonoïdes, ainsi qu'un changement de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés [108,120,142].

- **Interactions plantes-plantes**

Des activités antimicrobiennes des flavonoïdes ont été décrites comme participant dans les interactions allélopathiques plante-plante. Les rôles et les modes d'action ne sont pas encore élucidés complètement. Par exemple, la réduction de croissance de certaines graminées (maïs, riz...) peut être causée par la naringénine, entraînant une inhibition de la 4-coumarate CoA ligase et donc de la lignification. D'autre part, *Centaurea maculosa* sécrète au niveau de ses racines de la catéchine (flavanol) qui inhibe la croissance et la germination des graines de *Centaurea diffusa* et d'*Arabidopsis thaliana*. [142].

- **Interactions plantes-pathogènes**

Beaucoup de flavonoïdes possèdent des propriétés antifongiques : inhibition de cellulases microbiennes, de xylanases, pectinases, chélation de métaux nécessaires aux enzymes, formation d'une structure dure et cristalline agissant comme une barrière physique aux pathogènes.



Les flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la résistance fongique, après la récolte, des fruits et des légumes. De fortes concentrations en flavonoïdes dans les fruits sont, en effet, très souvent corrélées avec une faible incidence de pathogènes. Cette constatation est d'ailleurs mise à profit pour mieux conserver les fruits. Par exemple, l'irradiation UV de *Citrus aurantium* entraîne une augmentation de la concentration en flavonoïdes et réduit la contamination par *Penicillium digitatum* [142].

- **Interactions plantes-insectes et animaux**

Le rôle des flavonoïdes dans les interactions plantes-insectes est très largement accepté. Certains insectes peuvent séquestrer des flavonoïdes synthétisés par les plantes dans leur cuticule pour s'en servir comme défense contre les prédateurs, ou dans leurs ailes pour attirer leurs congénères. Les flavonoïdes peuvent aussi avoir un effet négatif comme substances antiappétantes, comme réducteurs de la digestion et comme toxines.

De plus, les flavonoïdes possèderaient des effets sur les herbivores. Il semble que des exsudats de *Cistus ladanifer* contenant de l'apigénine et du 3,7-diméthylkaempférol, inhibe le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique, entraînant ainsi une relaxation du muscle squelettique de la bouche de l'herbivore [142].

### II.7.3.3. Activités biologiques des flavonoïdes

Seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être réabsorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés [143]. La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Une fois réabsorbés, les flavonoïdes vont influencer plusieurs fonctions biologiques dont la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, apportant des effets bénéfiques dans différentes pathologies chez l'Homme.

Toutefois certaines considérations concernant le métabolisme et la biodisponibilité des flavonoïdes sont à prendre en compte. Les flavonoïdes sous leur forme glycosylée (b-glycosides) ne sont pas absorbables. Néanmoins, il existe des enzymes au niveau intestinal capables d'hydrolyser les hétérosides [144]. De plus, certains microorganismes présents dans l'intestin sont capables d'hydrolyser les b-glycosides en aglycones et ainsi leur permettre de franchir la barrière intestinale [145].

## II.7.4. Activités antimicrobiennes

### II.7.4.1. Activité antibactérienne

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes [146]. Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules. Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétrine chez le cochon d'inde infectés par *Shigella*, sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium*).

De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + [147]. Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité antibactérienne [147].

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité [145]. Certains pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne. La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-methylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH-cytochrome c réductase.

- anti SAMR (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants)

Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des MRSA [148]. Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve des meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' (sur le cycle B) et en 6 (cycle A). De plus, une hydroxylation en position 5 augmenterait l'activité. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait être mis en relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes. De plus une dihydroxylation en méta, soit sur le cycle A soit sur le cycle B, augmente l'activité [149,150].

### II.7.4.2. Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes [151]. Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus*.

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que l'activité des ptérocarpanes soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la présence de substituants oxygénés en position 3 et 9 apparaît comme essentielle à l'activité antifongique [145].

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique [143,152]. De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité antifongique..

#### **II.7.4.3. Activité antivirale**

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7-triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés [153]. La génistéine pourrait être active en inhibant la PTK (inhibition de l'entrée du virus), en inhibant la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de l'assemblage du virus), en inhibant la sécrétion du facteur TNF- $\alpha$ , ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (inhibition de la réplication virale).

#### **II.7.4.4. Activités antiparasitaires**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antiparasitaires. Les plantes contenant des roténoïdes, dont en particulier la roténone, ont longtemps été utilisées pour lutter contre les ecto et les endo-parasites. D'ailleurs des formulations vétérinaires existent. La roténone représente ainsi le principe actif (0,1 à 10%) de quelques formulations acaricides à usage externe pour les chats, les chiens, les ruminants et les porcs.

#### II.7.4.5. Activités estrogéniques et anti-estrogéniques

Ces activités sont dues essentiellement aux isoflavonoïdes qui font partie des phytoestrogènes. Un phytoestrogène peut être défini comme toute substance issue de plante qui est capable d'induire ou de moduler une réponse estrogénique chez les vertébrés en se liant à des récepteurs estrogéniques. Les phytoestrogènes regroupent des flavanones, des lignanes, des coumestanes et beaucoup d'isoflavonoïdes [155,156].

- **Principales sources de phytoestrogènes**

Les principales isoflavones : biochanine A, daidzéine, formononétine, glycitéine, génistéine, sont présentes dans le soja, les trèfles, les pois chiches, l'orge, le seigle, les arachides. On retrouve dans la réglisse, la glabrène et la glabridine, isoflavanes estrogéniques. Le houblon est également une source de nombreuses flavanones estrogéniques : naringénine, 8- et 6-prénylnaringénine, iso- et xanthohumol [157].

- **Activités des phytoestrogènes**

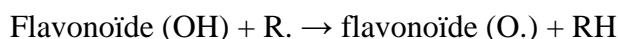
Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré que dans les pays asiatiques, la prévalence de certains cancers est plus faible (consommateurs d'aliments à base de soja) que dans les pays occidentaux. Il apparaît que la consommation d'isoflavones de soja réduit le risque de cancer du sein. Les phytoestrogènes posséderaient une action bénéfique sur plusieurs autres types de cancers : de l'endomètre, de la prostate [158], du testicule, du colon, de la thyroïde, de la vessie. Dans le même sens, les cellules impliquées dans le remodelage osseux étant étroitement régulées par de nombreux facteurs hormonaux, les phytoestrogènes pourraient donc avoir un effet contre l'ostéoporose [159]. Néanmoins, ces effets bénéfiques sont à confirmer par d'autres études. Les phytoestrogènes peuvent également se lier aux récepteurs nucléaires stéroïdiens comme ceux des androgènes et de la progestérone, ou agir sur d'autres fonctions nucléaires notamment sur l'inhibition des topoisomères II, ce qui expliquerait leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques, et sur l'inhibition de la néo-angiogénèse. De plus, les phytoestrogènes peuvent agir sur le métabolisme des estrogènes, en bloquant par exemple certaines enzymes comme l'aromatase qui intervient dans la conversion des androgènes en estrogènes [160,162,163,143]. Ils peuvent également réduire la production d'hormones thyroïdiennes par inhibition de la peroxydase thyroïdienne.

#### II.7.4.6. Effets protecteurs vasculaires

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P ». Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale. Ils sont, de ce fait, utilisés dans certains états pathologiques caractérisés par un défaut affectant la perméabilité vasculaire. Les effets de l'O-β-hydroxyéthyl rutoside (HR) ont été étudiés chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique : un traitement à base de HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine . [164]

#### II.7.4.7. Potentiel antioxydant

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH·), anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les radicaux libres apparaissent dans plusieurs situations, telles que :

- l'anoxie : qui engendre la production de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- l'inflammation : qui correspond à la production d'anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- Par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes activés, et, par dismutation, à celle du très réactif radical hydroxyle (OH·),
- et l'auto-oxydation des lipides : c'est au cours du stress oxydant que les espèces radicalaires, libres de tout contrôle, vont attaquer des cibles bioactives telles que les protéines, altérant ainsi les récepteurs cellulaires et les enzymes, les acides nucléiques (favorisant la survenue des mutations délétères à l'origine de divers cancers) et les lipides, notamment les particules de LDL de l'intima vasculaire, une phase qui constitue le *primum movens* dans la cascade athérogène.

#### II.7.4.8. Propriétés antihépatotoxiques

Des flavonoïdes issus de *Silybum marianum* (chardon marie) ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. Testée sur un modèle expérimental animal, la silymarine a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et

sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement, agissant sur la membrane cellulaire, prévenant l'entrée des substances toxiques, et qu'elle stimule la capacité régénérative des cellules hépatiques après hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, principale flavolignane rencontrée dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est révélé hépatoprotecteur, mais le mécanisme d'action de cette protection n'est pas encore bien élucidé [164].

#### **II.7.4.9 Propriétés inhibitrices d'enzymes**

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase [165], de la phospholipase A2 et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase [166,167].

#### **II.7.4.10. Propriétés antiallergiques**

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPc phosphodiesterase et la Ca<sup>++</sup> ATPase [168]. En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes.

#### **II.7.4.11. Activité anti-ulcérogène**

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. L'hypolaetine-8-glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, présente une activité anti-ulcérogène significative. La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes *via* la production de mucus et ses propriétés antioxydantes [169]. Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylorii* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique.

#### **II.7.4.12. Activité anti-inflammatoire**

In vitro, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire. C'est ainsi que la myricétine et la quercétine bloquent l'action des cyclo-oxygénase et lipoxygénase à des concentrations relativement élevées. faibles

concentrations, c'est la lipoxigénase qui est inhibée préférentiellement. Certains travaux suggèrent qu'ils posséderaient une bonne activité anti-inflammatoire sans les effets indésirables de type ulcérogène [170].

L'hésperidine, administrée par voie sous-cutanée (car inactive per os), présente une activité anti-inflammatoire significative chez le rat dont l'oedème a été induit aussi bien par la carragénine que par le dextran .

#### **II.7.4.13. Activité sur les maladies neurodégénératives**

La roténone, mais aussi la déguéline sont connues pour induire des syndromes de type parkinsoniens chez le rat [157]. Certains flavonoïdes protègent les neurones vis-à-vis de la toxicité du glutamate. Le glutamate est impliqué dans la mort neuronale, en menant à une accumulation de ROS et en augmentant l'influx calcique. Dans la protection contre le glutamate, il est indispensable que les flavonoïdes possèdent une hydroxylation en 3 et un cycle C insaturé [171]. Il semblerait également que chez les femmes ménopausées, un manque en estrogènes augmenterait l'incidence de la maladie d'Alzheimer, les phytoestrogènes auraient ainsi un effet bénéfique [172,173]. La génistéine montre également un effet neuroprotecteur à doses faibles (nanomolaire) par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs ER, alors qu'à des concentrations plus élevées (micromolaires) le mécanisme intervenant est essentiellement une action antioxydante de la génistéine.

#### **II.7.4.14. Activité sur le système cardio-vasculaire**

Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation. Les flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS.

#### **II.7.4.15. Autres effets biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes préviennent la cataracte diabétique par inhibition de l'aldose réductase du cristallin [162]. En effet, la myricétine présente des effets hypoglycémiant et hypotriglycéridémiant chez les animaux diabétiques. L'effet des flavonoïdes sur le système immunitaire est complexe et demeure encore mal élucidé. Certains d'entre eux réduisent l'activation du complément, diminuant de façon générale la réponse

inflammatoire. doses élevées, ils inhibent les fonctions lymphocytaires, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés [174,175].

## II.8. Les stéroïdes

Les stéroïdes constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), majoritairement le squalène (9). Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe (cortisol (10)) partiellement ou totalement hydrogéné. Habituellement, les carbones C10, C13 sont liés à un groupe méthyle - CH<sub>3</sub> et le carbone C17 à un groupe alkyle.

Par extension, les stéroïdes incluent également les lipides dont le noyau cyclopentanophénanthrénique a été modifié par scission d'une liaison et l'ajout ou la délétion d'un carbone. En médecine le terme «stéroïde» fait référence aux hormones stéroïdiennes. Dans un contexte sportif, «stéroïde» est habituellement employé pour désigner les stéroïdes anabolisants [176].

### II.8.1. Classification

Les différentes instances scientifiques ne s'accordent pas sur leur classification. Dans la classification de l'IUPAC, les stéroïdes constituent une catégorie incluant les stérols. Dans la classification classique les stérols forment une catégorie qui inclut les stéroïdes.

Selon l'IUPAC, les stéroïdes incluent tous les lipides possédant un noyau cyclopentanophénanthrénique (10) ou dérivant de celui-ci. Toutefois, l'IUPAC précise que les «stérols sont des stéroïdes» se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyle OH sur le carbone C3 (par exemple, le cholestérol représenté ci-dessus (8)). En revanche, pour plusieurs biochimistes, les «stérols constituent une catégorie à part entière incluant les «stéroïdes», cholécalsiférol (11); les acides biliaires; les stéroïdes conjugués; les hopanoïdes [177].

## II.9. Les saponines

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène.



Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux biosynthétiquement de l'oxyde de squalène [168]. La saponine de soja (12) en est un exemple.

Ils manifestent des propriétés hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, molluscicides [178], anti-inflammatoires et antalgiques.

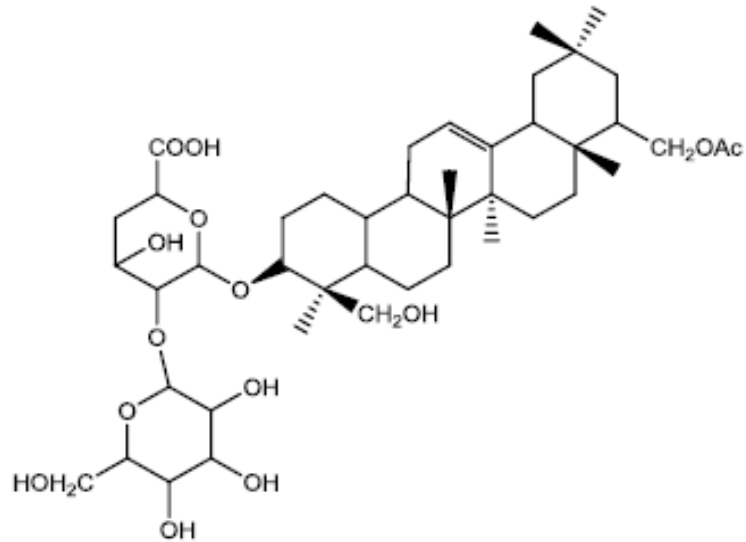


Figure 15 . Saponine de Soja

# **Chapitre III**

## **Partie Expérimental**

### III.1. Matériels et méthodes

#### III.1.1. Réactifs chimiques et appareillage

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualités analytiques. Les réactifs chimiques et solvants nous ont été fournis par les sociétés Sigma Aldrich (France), Alpha Asear (France).

Les différents appareils utilisés pour nos analyses sont les suivants:

- Un Rotavapeur de marque B.U.C.H.I modèle R-210, équipé par un refroidisseur supérieur.
- un spectrophotomètre Shimadzu UV-Vis 1800, caractérisé par une haute résolution et une erreur inférieure à 0.01 nm. Cet appareil est lié avec un microordinateur pour faciliter le traitement des résultats.
- Un chromatographe liquide haute performance HPLC (RP - HPLC) de marque Shimadzu composé par un dégazeur DGU-20 A<sub>3</sub>, deux pompes LC-20 AT couplé à un détecteur UV-Visible SPD-20 A et équipé d'une boucle d'injection de 20 µl et d'une colonne CTO-20 AC (RP C18 taille 4.6 mm x 150 mm; avec une taille de particules de 5 µm),
- Incubateur Mammert caractérisé par une haute précision de la température (Allemagne, figure 47)
- Une centrifugeuse à grande vitesse de type EBA 21 de marque Hittech (Allemagne)

#### III.1.2. Matériels végétaux

Les matériels végétaux utilisés au cours de notre étude sont d'origines de la région de Oued Souf: les feuilles de la variété de Ghars, Deglet Nour et Hamraya à récoltées en Mars 2011 dans la zone Nord-est de la wilaya d'El oued (33° 07' 00" N 7° 11' 00" E).

Ces plantes ont été authentifiées par le professeur Ouahrani Mohammed Ridha, Laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS). Un spécimen pour chaque plante y a été déposé.

### III.2. Méthodologie

#### III.2.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est d'une importance principale pour toute analyse fiable. De nombreuses méthodes de préparation des échantillons ont été développées pour déterminer les composés phénoliques. Les procédures de préparation des échantillons pour l'analyse des composés phénoliques varient beaucoup en fonction de la nature des

composés à analyser. Celles-ci doivent tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels: la polarité, l'acidité des molécules, le nombre de groupements hydroxyles et de noyaux aromatiques. Les méthodes de dosage les plus couramment décrites comprennent plusieurs étapes de préparation d'échantillons. Chacune d'elle a pour but d'augmenter la sensibilité et la sélectivité du dosage. Malheureusement, les différentes étapes peuvent parfois introduire des interférences qui créent des artefacts, ce qui n'est pas sans conséquence sur la reproductibilité du dosage et nécessite de faire la moyenne de plusieurs essais.

Il est donc important de contrôler toute la préparation et d'évaluer l'influence de ces effets sur l'analyse des résultats. En général, les échantillons solides sont soumis à un broyage et à un tamisage, souvent précédés par une étape de séchage à l'air libre du matériel végétal à analyser. Les échantillons liquides sont centrifugés et filtrés.

### **III.2.2. Extraction des composés phénoliques**

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles.

Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques, l'extraction liquide - liquide et/ou solide-liquide sont les procédures les plus couramment utilisées.

En effet, ces techniques sont faciles d'utilisation, très efficaces et peuvent être largement appliquées. Les solvants d'extractions les plus communément utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), l'acétone, l'éther éthylique et l'acétate d'éthyle. Cependant, pour les composés très polaires tel que les acides phénoliques (benzoïque, cinnamique) ne pouvant être extraits complètement avec les solvants organiques purs les mélanges d'alcool - eau ou acétone-eau sont recommandés [176]. Les solvants moins polaires (dichlorométhane (DCM), chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour éliminer les composés apolaires (cires, huiles, stérols, chlorophylle...). Les extractions sont répétées deux à trois fois et les extraits sont ensuite combinés. La technique d'extraction liquide-solide utilisée est: l'extraction par l'utilisation du montage de Soxhlet.

### III.2.3. Principe d'extraction par Soxhlet

Un extracteur Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue par solvant d'un solide (figure 48). Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placé une cartouche en papier filtre épais (5), d'un tube siphon (6/7) et d'un tube d'adduction (3). Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction. Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (9). Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits. L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques.

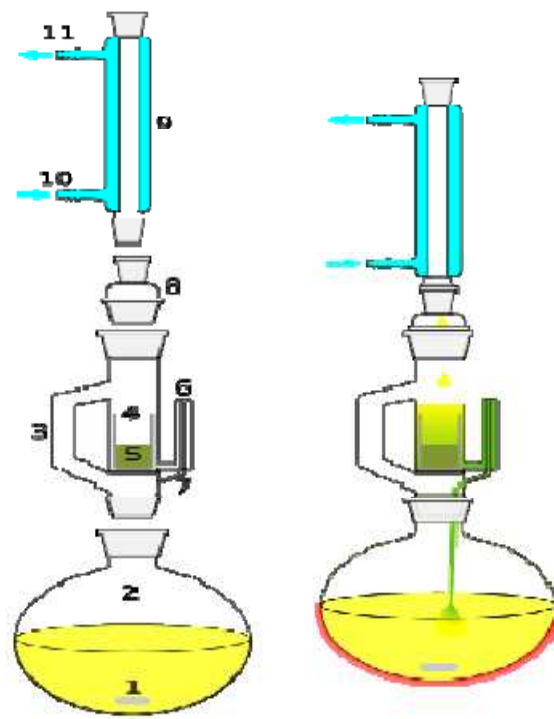


Figure 16. Le Soxhlet

### III.2.4. Préparation des extraits

La matière végétale (les feuilles) ont été cultivés pendant six mois avant d'être utilisés. Les feuilles ont été séchées dans des espaces bien ventilés et aérées à la température ambiante,

transférés en poudre et tamisé dans un tamis (0,750 um) avant utilisation. La poudre de chaque matière végétale (50 g) a été extrait trois fois avec 500 mL de 80% v / v (MeOH: eau) par Soxhlet pendant 6 h. Les extraits ont été filtrés par des filtres Whatman N ° 0,1. Le filtrat a été concentré sous vide à 40 ° C par un évaporateur rotatif (R-210 BUCHI, Suisse) pour éliminer le méthanol. Les extraits stocké à -4 ° C, dilué dans le méthanol et l'eau distillée pour les concentrations nécessaires dans ce travail.

### III.2.5. Résultats et discussions de rendement des extractions des composés phénoliques

Les rendements d'extraction des composés phénoliques de différents matériels végétaux étudiés sont reportés dans le tableau 11. Chaque essai a été répété trois fois ainsi, chaque valeur reportée dans ces tableaux est une moyenne. De ces résultats nous constatons que les feuilles de la variété Deglet Nour donne la meilleur rendement d'extractions par rapport aux d'autre variétés.

$$\% \text{ rendement} = (\text{la masse d'extrait} / \text{la masse initiale}) \times 100$$

**Tableau 11.** Rendement d'extraction des composés phénoliques dans MeOH/Eau (80%/20%)

Variété	Masse sèche d'extrait g/50 g des feuilles	Rendement (%)w/w
Gars	8.25	16.50
Deglet Nour	9.56	19.12
Hamraya	7.82	15.64

### III.3. Réaction de caractérisation (Screening phytochimique)

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une échantillon donnée. Toute fois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimique. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponines, les

stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les hétérosides cardiotoniques, les huiles essentielles, les sucres réducteurs (oses-holosides et mucilages).

Le principe est soit basé sur la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions des précipitations, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou instauration dans une molécules)

### III.3.1. Screening phytochimiques préliminaires

- **Polyphénols**

A 20 ml de chaque extrait des feuilles de variétés sélectionnées et 2 M d'hydroxyde de sodium (NaOH) solution à été mélangé dans une fiole jaugé, puis on ajoute une goutte de phénolphtaléine (1 goutte), et le mélange progressivement secoué pour mélanger et observé l'apparition d'un couleur pourpre des 30 s [179,180].

- **Flavonoïdes**

Des volumes égaux (5 ml)  $\text{NH}_3$  dilué et l'extrait des feuilles de trois variétés sélectionnées Ghars, Deglet Nour et Hamraya ont été mélangées avec 2-3 gouttes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. La formation d'une coloration jaune indique la présence de flavonoïdes [179].

- **Flavonols**

A 1 ml des d'extraits feuilles de trois variétés sélectionnées Ghars, Deglet Nour et Hamraya nous avons ajouté 1 ml d'alcool-chlorhydrique, 1 ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d flavonols [176].

- **Anthocyanines**

Un volume de 1 ml d'eau très chaude, 0.5 ml d'acide chlorhydrique (HCl 37%) et 10 mg d'extrait sec des feuilles de trois variétés sélectionnées Ghars, Deglet Nour et Hamraya ont été mélangés dans un tube à essai et le mélange chauffé à 100 °C. Puis refroidi et on ajoute 0,4 ml d'alcool amylique à la réaction précédente, observer un changement de couleur vers le bleu foncé [181].

- **Tanins condensés**

0.5 g d'extrait sèche bouillir à l'eau (20 ml) dans un tube à essai, puis filtré. On ajoute 1 ml de 0,1% de chlorure ferrique et on observe une coloration vert brunâtre ou une coloration bleu-noir.

- **Saponines**

0.1 g d'échantillons sèche d'extrait des feuilles de trois variétés ont été ajoutés à dix millilitres d'eau distillée dans des tubes à essai. Les tubes à essai bouchées et agitées vigoureusement pendant 2 min. L'apparition d'une mousse stable et persistante sur la surface du liquide pendant 15 min indiqué la présence des saponines [182].

- **Stéroïdes**

Un volume de 1ml d'extrait des feuilles est évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissous dans un mélange de 100 µl d'anhydride acétique et 100 µl de chloroforme. La solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). Ensuite nous avons ajouté 100 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stéroïdes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard.

### III.3.2. Résultats et discussions

L'évaluation préliminaire de la composition phytochimique des extraits de feuilles de trois variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L donne des résultats représentés dans le tableau 12. De ce tableau, il est constaté que les extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L Ghars, Deglet Nour et Hamraya étudiés contiennent des polyphénols, flavonoïdes, des flavonols, tanins condensés, anthocyanines, des stéroïdes et des saponines. Par ailleurs, par comparaison l'extrait des feuilles de variété Ghars est le plus riche par ces composés puis la variété Deglet Nour et en fin la variété Hamraya.

**Tableau 12:** Composition phytochimique des extraits de feuilles Phoenix dactylifera L des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya..

Composition phytochimique	L'extrait de Ghars	L'extrait Deglet Nour	L'extrait Hamraya
Polyphénols	+++	++	++
Flavonoïdes	++	++	++
Flavonols	++	++	+
Tanins condensés	++	++	+
Anthocyanines	+	+	+
Saponines	+	+	+
Stéroïdes	+	+	+

+++ : abondant; ++ : présence modérée; + faible



### III.3.4. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

#### III.3.4.1. La spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité  $I$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$ . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$$A = -\log T$$

Avec T (transmittance)  $T = \frac{I}{I_0}$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

#### **Domaine UV-visible de la spectrophotométrie**

Un soluté coloré ou chromophore absorbe la lumière visible (longueurs d'onde comprises entre 400 et 800 nm). On parle de spectrophotocolorimétrie ou plus simplement de colorimétrie. Certaines solutions absorbent dans l'ultraviolet (longueurs d'onde inférieures à 380 nm), on parle alors de spectrophotométrie UV.

Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée.

Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée ou pour produire un spectre d'absorbance (spectrophotomètre à balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies.

### III.3.4.2. Analyses quantitatives

Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

- **Dosage des composés polyphénoliques totaux (PPT)**

Le réactif utilisé est le réactif de «Folin-Ciocalteu»; c'est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdène ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 725 nm, le dosage de PPT est effectué par la comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue.

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 1 ml de l'extrait méthanolique des feuilles de trois variétés sélectionnées est introduit dans un tube Eppendorff de 3 ml, 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1N) est ajouté puis immédiatement après il est ajouté 0.2 ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  (10 %). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 40 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 700 nm contre une solution de méthanol (80%) utilisé comme blanc [183]. Notons qu'une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (E GA/g Ms). Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est:  $R^2 = 0.991$  et tous les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

- **Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)**

Les réactifs utilisés sont: les solutions incolores de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ , 5%) et de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ , 10%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs, elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de la D.O observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, dans un ballon de 10 ml sont introduits successivement 500  $\mu$ l de l'extrait des feuilles à concentration connus et 1.25 ml d'eau distillée. Après 5 minutes on ajoute 75  $\mu$ l d'une solution de  $NaNO_2$  (5%), aussi après 5 minutes 125  $\mu$ l de  $AlCl_3$  (10 %) sont ajoutés. Et à 6 minutes, 500  $\mu$ l de NaOH (1N) et 275  $\mu$ l d'eau distillée sont ajoutés successivement au mélange [184].

Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de catéchine préparées à de concentrations différentes. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine/ gr de matière sèche (EC/g Ms). Le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage est:  $R^2 = 0.988$  et tous les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées

- **Dosage des flavonols totaux (FLT)**

Un volume 25  $\mu$ l des extraits méthanolique des feuilles a été ajouté à 25  $\mu$ l HCl (0.1%) dans 95% d'éthanol. La réaction précédentes mélangée avec 500 HCl  $\mu$ l (2%) et incubée pendant 30 min à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 360 nm en utilisant spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1800, Japon). Le blanc est préparé avec le même mode opératoire décrit ci-dessus, mais on remplace l'extrait par la quercétine [185]. La teneur totale en flavonols exprimée en mg équivalent quercétine (QE) / g de poids sec à l'aide de la courbe d'étalonnage qui donne un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,997$ . les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

- **Dosage des anthocyanines totaux (ATT)**

Les composés anthocyaniques totaux ont été évalués par colorimétrie en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. La méthode utilisée est basée sur une différenciation des absorbances en utilisant deux tampons; KCl à pH 1.0 (0,025M) (1) et CH<sub>3</sub>COONa à pH 4.5 (0.4M) (2).

Pour cela 400  $\mu$ l de l'extrait sont mélangés à 3,6 ml du tampon (1) ensuite 400  $\mu$ l au tampon (2). Les solutions sont incubées pendant 30 minutes à l'abri de la lumière et les absorbances sont ensuite successivement mesurées à 510 et 700 nm. La variation des absorbance est calculée par la formule suivante:

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4.0}}$$

La concentration de pigment d'anthocyanine dans l'extrait est exprimée en mg d'équivalent cyanidine-3 glucosé par litre de solution ou en mg d'équivalent cyanidine-3 glucosé/ g de matière sèche (Cg/ g dM).

$$D'où Cg (mg/ l) = \Delta A \times Mm \times Df \times 1000 / (Ma)$$

Avec  $\Delta A$ : variation des absorbances, Mm: masse moléculaire (449,2); Df: facteur de dilution; Ma: absorptivité moléculaire (26900).

- **Dosage des tanins condensés (TC)**

La détermination de la teneur en tanins condensés a été effectuée en utilisant la méthode spectrophotométrique [186]. Un volume de 0.5 ml d'extrait méthanolique ou standard (catéchine) ajouté au mélange de 3 ml au mélange 4% vanilline et de méthanol (4%, v / v), 1.5 ml d'acide chlorhydrique puis vortexé. Le mélange résultant a été laissé au repos pendant 15 min à température ambiante, l'absorbance de chaque calculée à 500 nm en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1800, Japon). La teneur totale en tanins condensés est calculée comme étant mg équivalent de catéchine (CTE mg / g) en utilisant l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage:

$Y = 0.5617x$ ,  $R^2 = 0,985$ , où  $x$  est l'absorbance et  $Y$  est l'équivalent de la catéchine. les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

- **Dosage de l'acide ascorbique (AAS)**

La concentration totale de l'acide ascorbique dans les extraits des feuilles de Phoenix dactylifera L pour les trois variétés sélectionnées a été déterminée en utilisant la méthode de complexation du ferriin [187]. Un volume de 1 ml d'extrait (différentes concentrations) ou (acide ascorbique) standard ajouté à 100  $\mu$ l de 3.3 mM de réactif coloré fer (III)-phen et on ajuste le mélange à pH=4.5 avec de l'acétate de sodium (20%). L'absorbance est calculée à 512 nm en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu UV-1800, Japon) et la teneur en acide ascorbique a été calculée d'après l'équation de la courbe de d'étalonnage qui trouvée par l'acide ascorbique ( $R^2 = 0.98$ ). les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

- **Dosage des saponines totaux**

La teneur en saponine est déterminée sur la base de la procédure décrite par Poornima et Ravishankar [188]. 5 grammes de poudre très fine de feuilles de trois variétés sélectionnées mélangés avec 50 ml méthanol-eau à 80% et placés dans un bain d'eau à 55 ° C pendant 4 h. Le résidu recueilli après filtration extraite une deuxième fois avec encore 50 ml méthanol 80% et concentré à 20 ml sur un bain d'eau chaude à la température d'ébullition. L'extrait concentré obtenu agité vigoureusement avec 10 ml d'éther éthylique dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse recueillie pour le procédé de purification. Un volume de 20 ml de butanol-1 est ajouté au filtrat, puis lavés avec 10 ml de chlorure de sodium aqueux (5%). L'ensemble du mélange chauffé et concentré sous vide à 45 ° C. La teneur en

saponine d'échantillon mesurée en utilisant la formule.

$$\% \text{ Saponine} = (\text{masse de finale filtrat} / \text{masse d'échantillon}) \times 100$$

- **Dosage des stéroïdes**

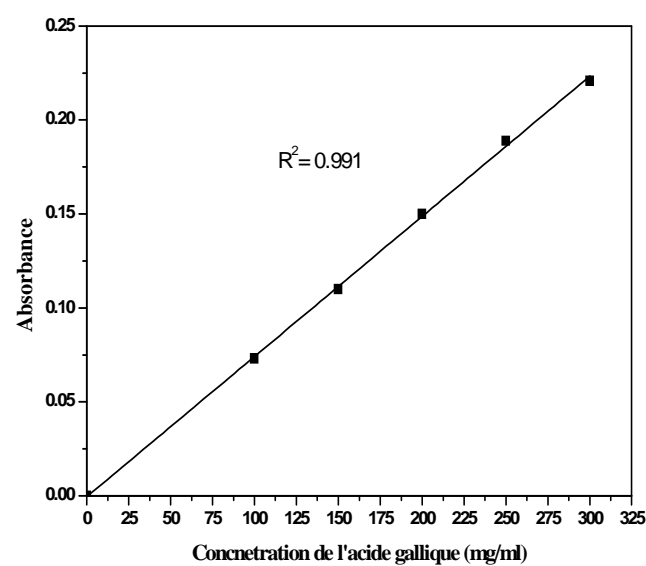
La teneur totale de stéroïdes dans les extraits des feuilles de Phoenix dactylifera L est déterminée selon la procédure rapportée par Trease et Evans [188]. 2.5 g de poudre de feuilles des variétés sélectionnées ajouté à 50 ml d'eau distillée et agité vigoureusement pendant 1 h. Un volume de 2 ml de la mélange résultante prélevé et lavée avec 3 ml d'hydroxyle de sodium 0.1 M (pH 9), puis mélangée avec 2 ml de chloroforme, 3 ml de d'anhydride acétique glacier et deux gouttes d'acide sulfurique concentré. L'absorbance est mesurée à 420 nm en utilisant un spectrophotomètre (Shimadzu UV-1800, Japon). les résultats présentés sous forme des moyennes ( $\pm$  SEM) et sont analysées avec trois expériences séparées.

### III.3.4.3. Courbes d'étalonnages des dosages des PPT, FVT, FLT, ATT, TC et AAS

- **Courbe d'étalonnage pour le dosage de polyphénols totaux (PPT)**

Cette courbe est établie en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EGa/ gMs).

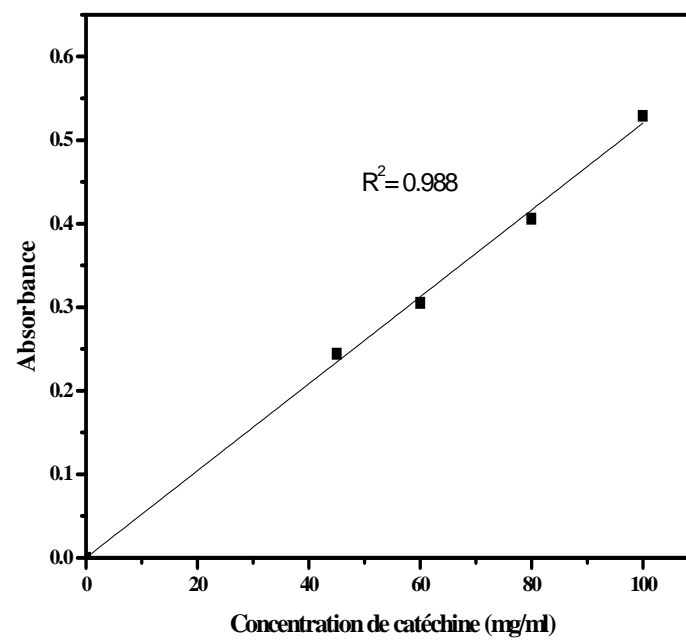
La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.991$  (figure ).



**Figure 17.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux

- **Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonoïdes totaux (FVT)**

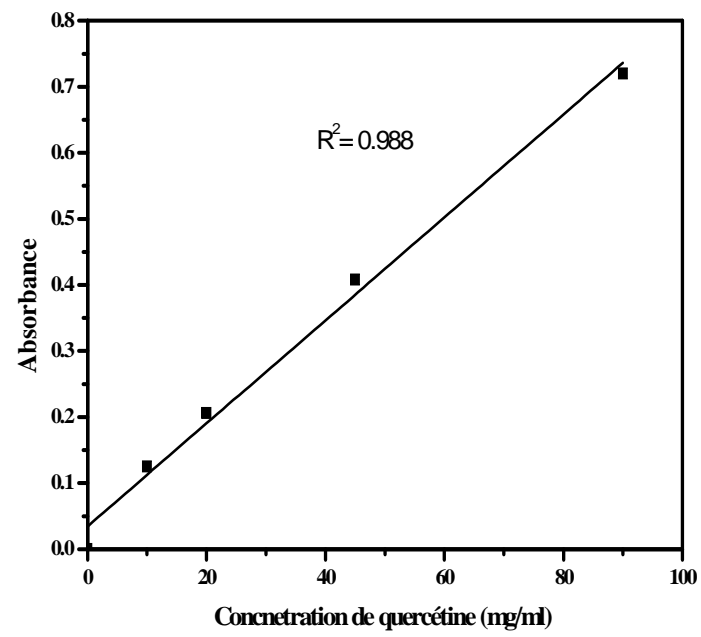
Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la catéchine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2= 0,988$  (figure 18). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg E Ct/g Ms).



**Figure 18.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux

- ***Courbe d'étalonnage pour le dosage de flavonols totaux (FLT)***

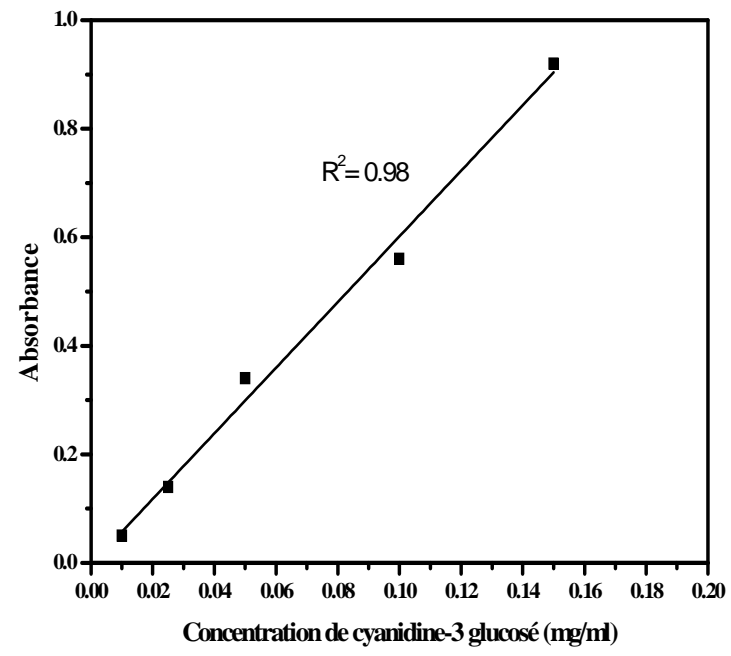
Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la quercétine. La courbe est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2= 0,997$  (figure 19). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg QE /g Ms).



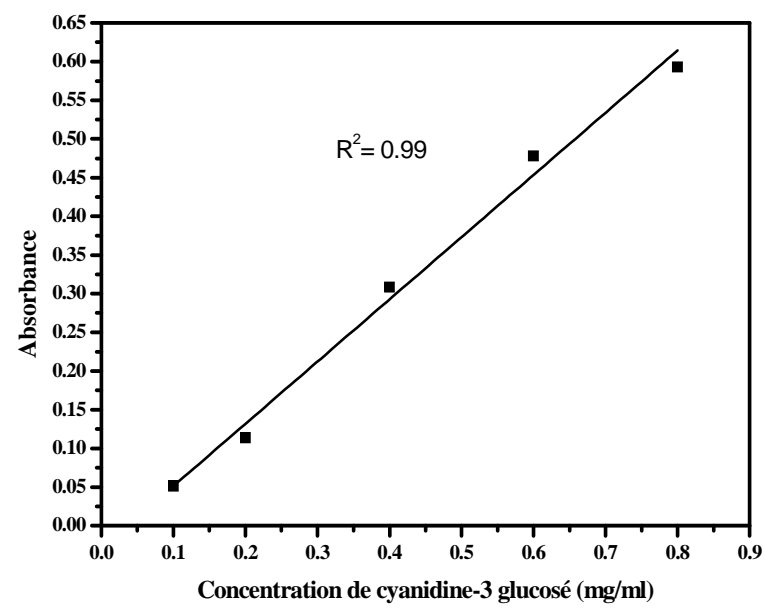
**Figure 19.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols totaux

- ***Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (ATT)***

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est le cyanidine 3-glucosé. Les courbes sont établies à 510 et 700 nm avec  $R^2 = 0.98$  et  $0.99$  respectivement (figures 20 et 21). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent cyanidine-3 glucosé par gramme de matière sèche (mg ECg/ gMs).



**Figure 20.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (510 nm)

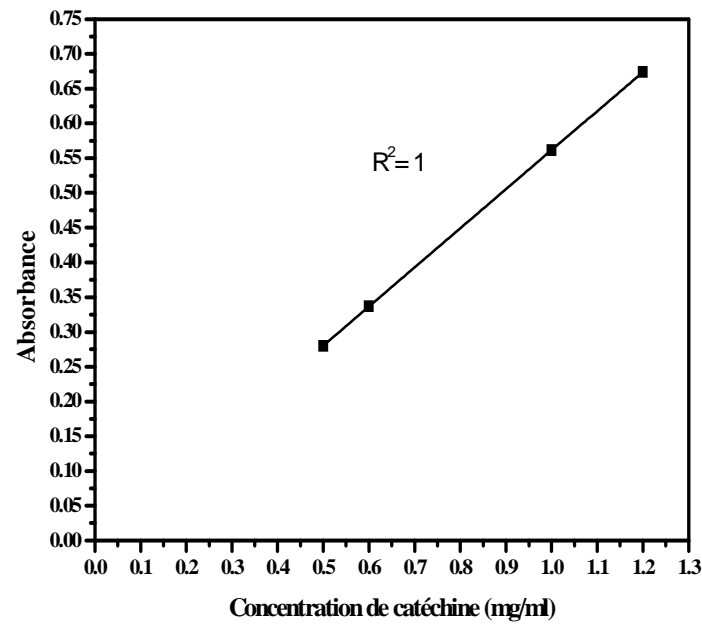


**Figure 21.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (700 nm)



- **Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés (TC)**

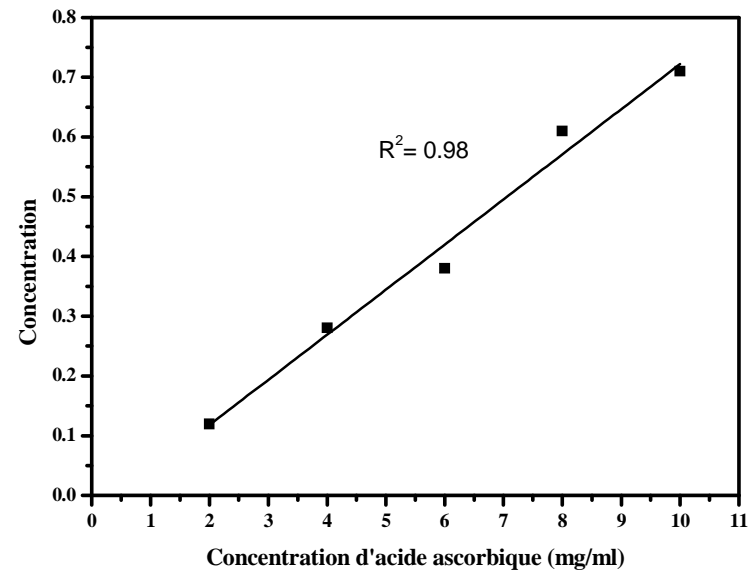
La courbe est établie en utilisant la catéchine référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg ECa/ g Ms). La courbe d'étalonnage établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 1$  (figure 22).



**Figure 22.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés

- **Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide ascorbique (AAS)**

La courbe est établie en utilisant la catéchine référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/ g Ms). La courbe d'étalonnage établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,98$  (figure 23).

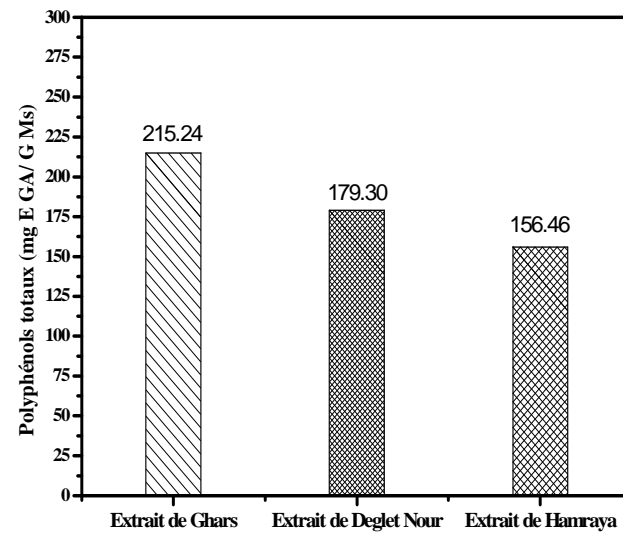


**Figure 23.** Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide ascorbique

#### III.3.4.4. Résultats et discussions de compositions phytochimiques

- *Polyphénols totaux*

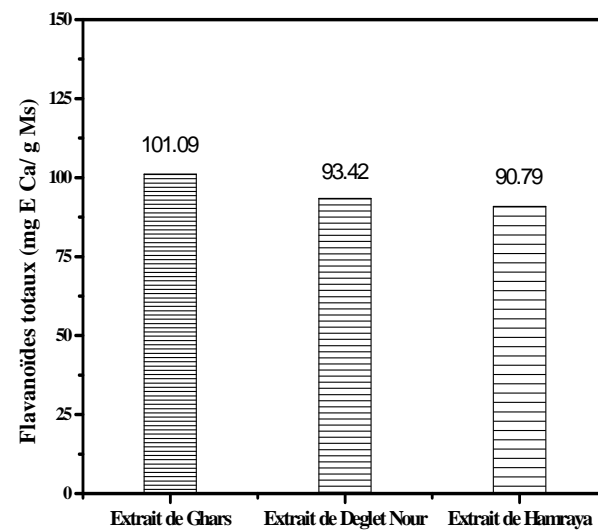
Les résultats des analyses quantitatives par spectrophotomètre UV-visible des extraits des feuilles des variétés de *Phoenix dactylifera* L étudiées sont représentés ci-dessous (figure 24). Dans cette composition nous trouvons que l'extrait des feuilles de la variété Ghars est quantitativement plus riche en composés phénoliques, puis l'extrait de Deglet Nour et en fin l'extrait de la variété Hamraya.



**Figure 24.** La teneur des polyphénols dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- **Flavonoïdes totaux**

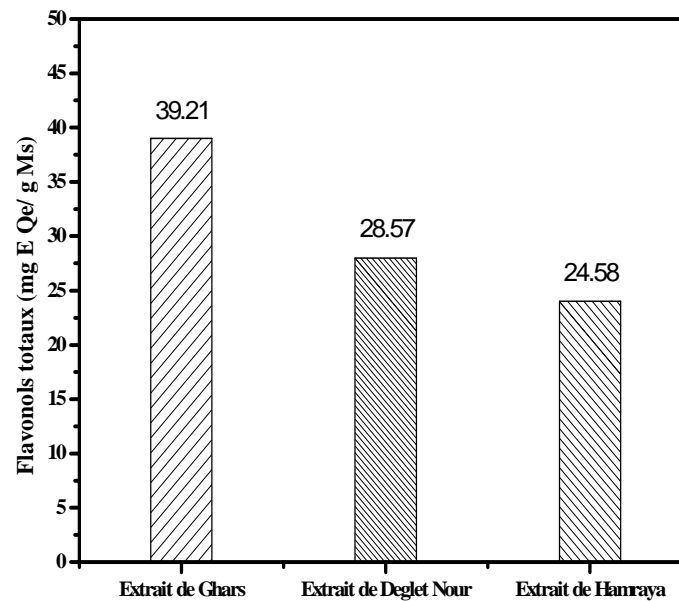
Les résultats des analyses quantitatives des flavonoïdes dans les extraits des feuilles de la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sont reportés dans la figure 25. Ces résultats nous indiquent que les extraits des feuilles de trois variétés sélectionnées étudiée sont très riche en flavonoïdes et que la variété Ghars contienne la concentration la plus élevée.



**Figure 25.** La teneur des flavonoïdes dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- **Flavonols totaux**

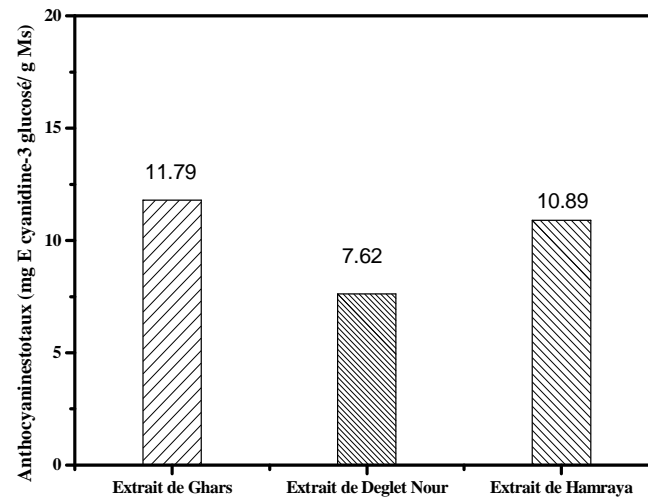
La figure 26 montre la composition quantitative des flavonols totaux des extraits trois variétés analysées. L'analyse de ces résultats montre que l'extrait de la variété Ghars est le plus riche en flavonols (39.21 mg E Qe/g Ms) . Les extraits de Deglet Nour et Hamraya contiennent aussi des teneurs considérables en flavonols (28.57 et 24.58 mg E Qe/g Ms successivement).



**Figure 26.** La teneur des flavonols dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- **Anthocyanines totaux**

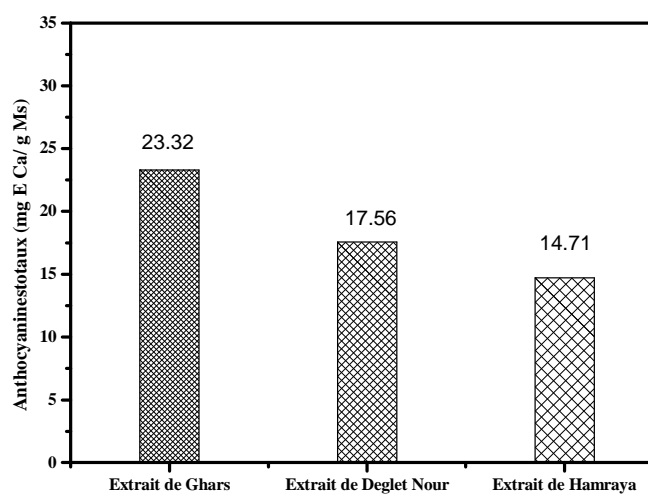
Dans la figure 27, nous avons repris la composition quantitative des anthocyanines contenus dans les extraits de trois variétés sélectionnées analysées. De cette composition, nous constatons que les extraits de trois variétés de *Phoenix dactylifera* L sont relativement pauvres vis-à-vis les composés d'anthocyanines. La teneur de ces composés est variée entre 11.79, 10.89 et 7.62 mg E cyanidine-3 glucosé/ g Ms successivement pour Ghars, Deglet Nour et Hamraya.



**Figure 27.** La teneur des anthocyanines dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

• **Tanins condensés**

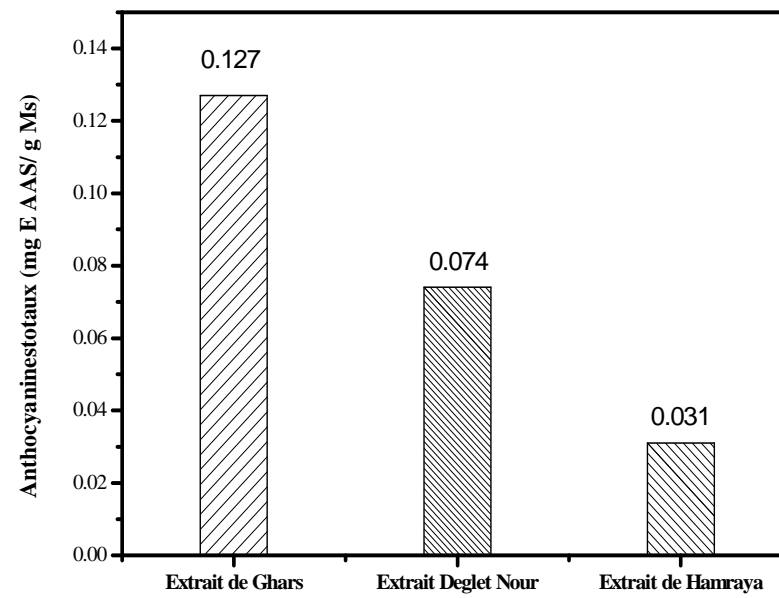
La figure 28 montre les résultats de la composition en tanins condensés totaux des extraits de feuilles des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L analysés par spectroscopie UV-visible. En analysant ces résultats, nous remarquons que l'ensemble des extraits relativement riche en tanins condensés totaux, pour 1 g de matières sèches la quantité de tanins condensés varie d'une manière décroissante d'extrait des feuilles de Ghars > extrait des feuilles de Deglet Nour > extrait des feuilles de Hamraya.



**Figure 28.** La teneur des tanins condensés dans les extraits variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- *Acide ascorbique*

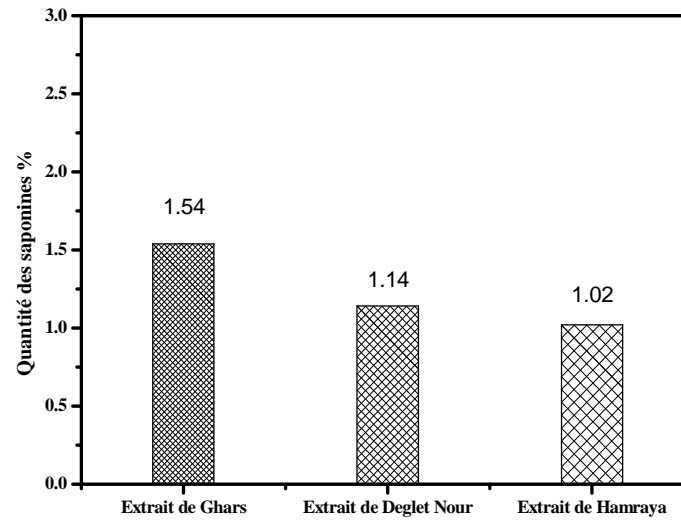
La figure 29 montre la composition quantitative d'acide ascorbique d'extrait des feuilles des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L. L'analyse de ces résultats montre que les extraits des trois variétés sont très pauvres en acide ascorbique, la teneur en acide ascorbique variée entre 0.127, 0.074 et 0.031 successivement pour la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya.



**Figure 30.** La teneur d'acide ascorbique dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- *Les saponine*

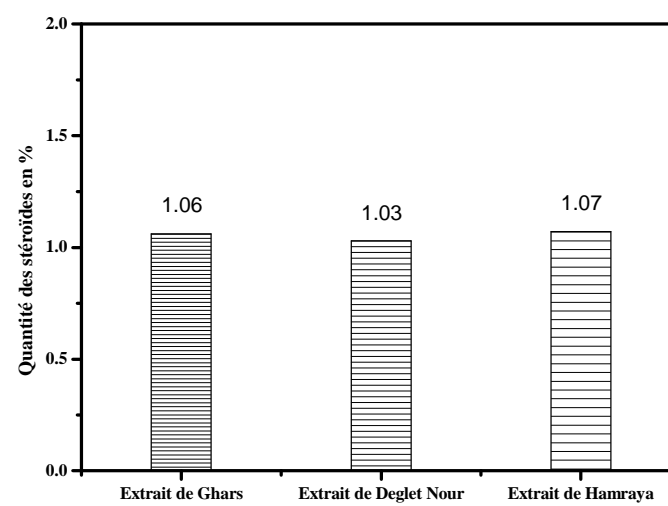
La figure 31 montre la concentration quantitative des saponines des extraits des feuilles de la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya. L'analyse de ces résultats montre que les extraits sont relativement pauvres en stéroïdes. Le pourcentage des saponines variée entre 1.54, 1.14 et 1.02 successivement pour la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya.



**Figure 31.** Le pourcentage des saponines dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

- **Les stéroïdes**

Dans la figure 32, nous avons repris le pourcentage des stéroïdes contenus dans les extraits de trois variétés sélectionnées analysées. De cette composition, nous constatons que les extraits de trois variétés de *Phoenix dactylifera* L contiennent de faibles quantités des stéroïdes. Les trois variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya présentent des valeurs presque égales pour cette composition.



**Figure 32.** Le pourcentage des stéroïdes dans les extraits des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

### III.3.5. Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange.

La HPLC peuvent être assez largement décrite par des théories commune. Un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silice greffées).

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

#### III.3.5.1. Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:

- **Pompe** : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes permet d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient.

- En mode isocratique: 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,

- En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.

- **Injecteur** : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage.

- **Colonne** : elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.

- La phase normale :

Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisé est apolaire.

- La phase inverse :

Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaînes carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), MeOH, H<sub>2</sub>O).

- **Détecteur** : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui



absorbe dans cette plage de longueur d'onde. Le principe de fonctionnement de l'HPLC est schématisé ci-dessous.

- **Les solvants**

L'équilibre en adsorption est un phénomène de compétition. Les molécules de la phase mobile entrent en compétition avec les molécules de solutés pour les sites polaires d'adsorption (séparation liquide-solide). Plus l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire est forte moins l'adsorption du produit en solution sera importante. Les solvants sont donc classés selon leur force qui va dans le même sens que leur polarité.

**Tableau 12.** Propriétés de quelques solvants utiles en chromatographie phase liquide

Solvant	UV cutoff (nm)	Viscosité (cP)	Eb (°C)	Indice de miscibilité (M)	Polarité (P)
Isooctane	215	0.50	99	29	0.1
Hexane	195	0.31	69	29	0.1
Toluène	284	0.59	111	23	2.4
Méthyl-t-butyléther	210	0.27	55	-	2.5
Dichlorométhane	233	0.44	40	20	3.1
Propanol-1	210	2.30	97	-	4.0
Tétrahydrofurane	212	0.55	66	17	4.0
Chloroforme	245	0.57	61	19	4.1
Éthanol	210	1.08	78	-	4.3
Acétate d'éthyle	256	0.45	77	19	4.4
1,4-Dioxane	215	1.37	101	17	4.8
Acétone	330	0.36	56	15	5.1
Méthanol	205	0.55	65	-	5.1
Acétonitrile	190	0.38	82	11	5.8
Acide acétique	-	1.10	118	-	6.0
Eau	190	1.00	100	-	10.2

### III.3.5. L'Analyse par HPLC des composés phénoliques

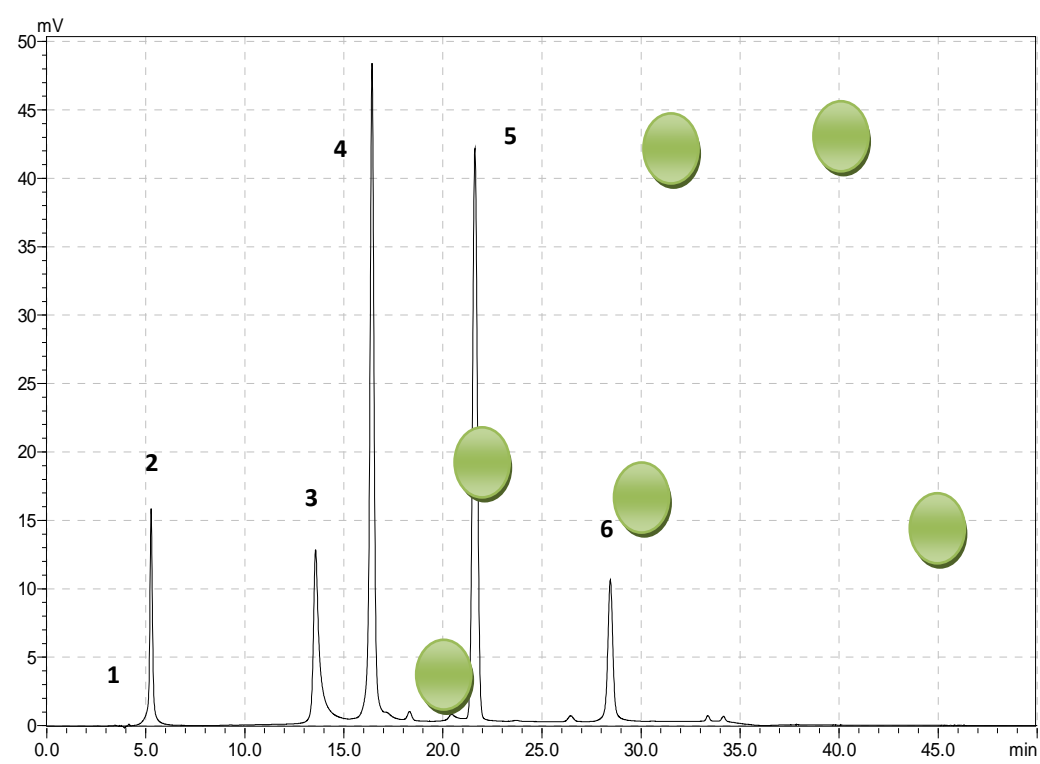
#### III.3.5. 1. Conditions opératoires d'HPLC

L'analyse des composés phénoliques individuels a été réalisée suivant la méthode proposée par Gonzalez-Gomez [174]. La séparation chromatographique effectuée avec une colonne Shimadzu C18 HPLC (250 mm X 4,6 mm, 5 ml) et chauffé à 35 °C. La phase mobile utilisée pour la séparation est composé de TFA aqueux à 0,1% (A) et d'acétonitrile (B) en mode gradient défini comme suit: conditions initiales de 10% B; 0 à 3 min 10% de B; 3 à

15 min 15% B; 15 à 20 minutes la composition a été maintenue constamment à 15% B; 20 à 25 min 18% de B et de 25 à 40 min 30% de B. La période de l'équilibre de la colonne est 5 minutes. Le débit a été fixé à 1 ml/ min pour toutes les expériences. La concentration des extraits sont 3 mg/ml et la capacité de la boucle d'injection est de 10 µl. La détection a été réalisée à 300 nm. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 20 minutes avant une nouvelle analyse.

### III.3.5. 2. Résultats des chromatogrammes d'étalons

Les figure 61 donne les chromatogrammes des mélanges des étalons utilisés, les analyses sont faites à deux longueurs d'ondes différentes 300 nm. L'identification et la quantification de composés phénoliques contenu dans les extraits se fait par comparaison du temps de rétention, des surfaces des étalons utilisés par rapport à ceux obtenus en analysant les extraits. Les analyses ont été répétées 3 fois.



**Figure 33.** Profil du chromatogramme du mélange des étalons

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorogénique; 4: Acide caféique;  
5: vanilline; 6: Rutine

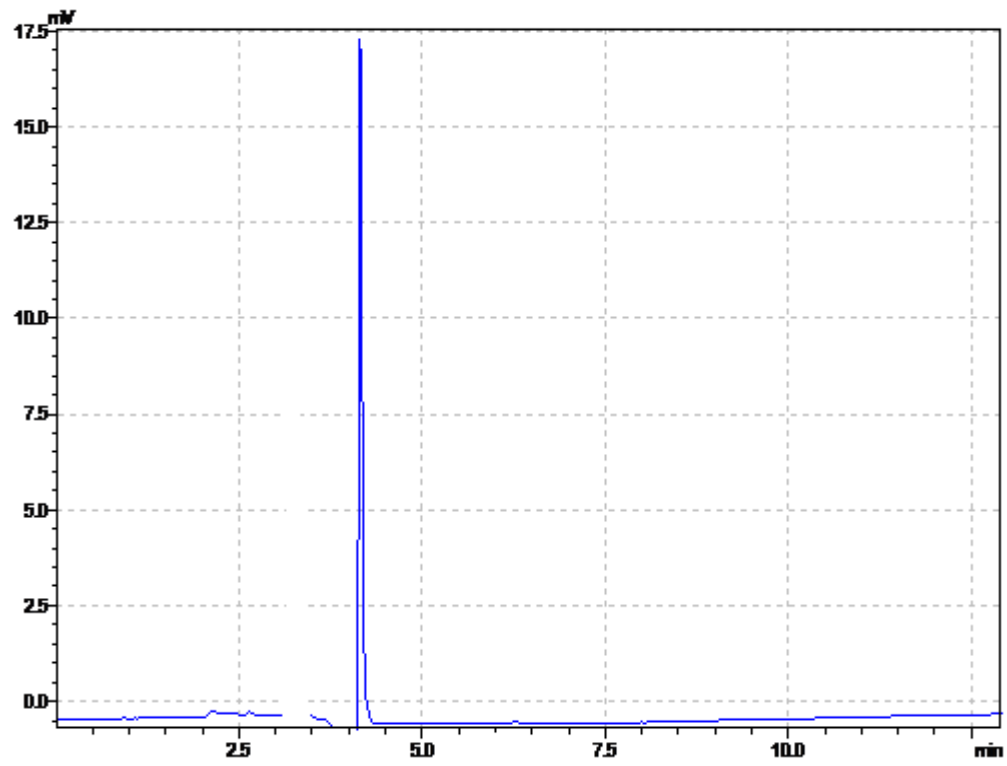


Figure 34. Chromatogramme d'acide ascorbique (solution standards)

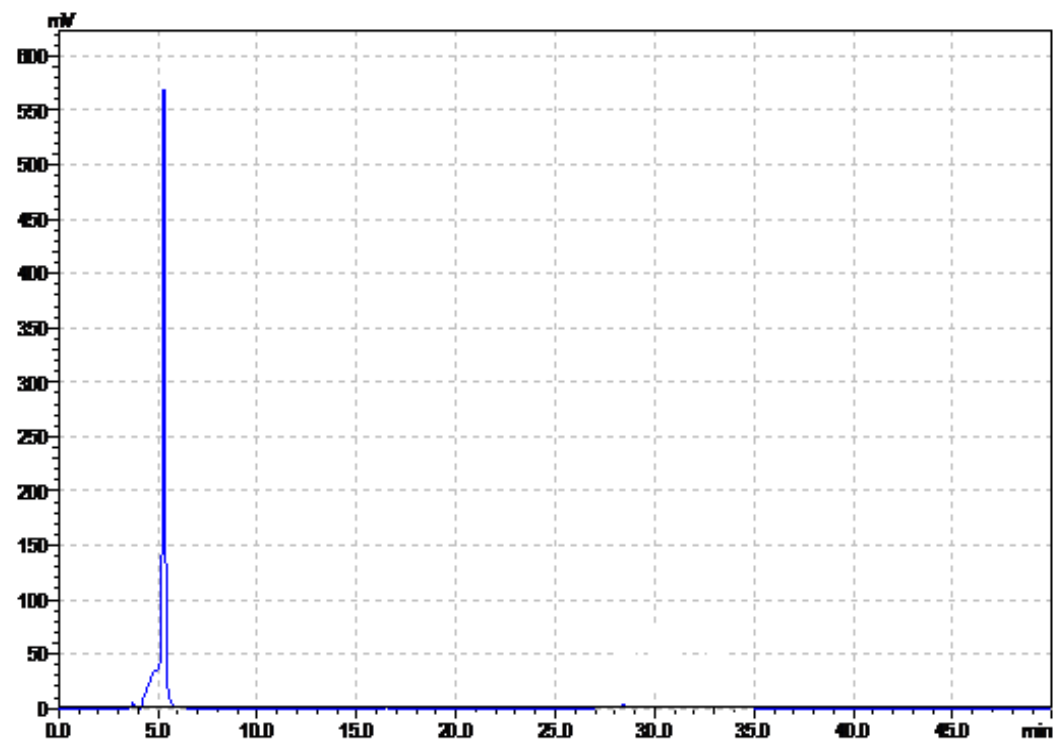


Figure 35. Chromatogramme d'acide gallique (solution standards)

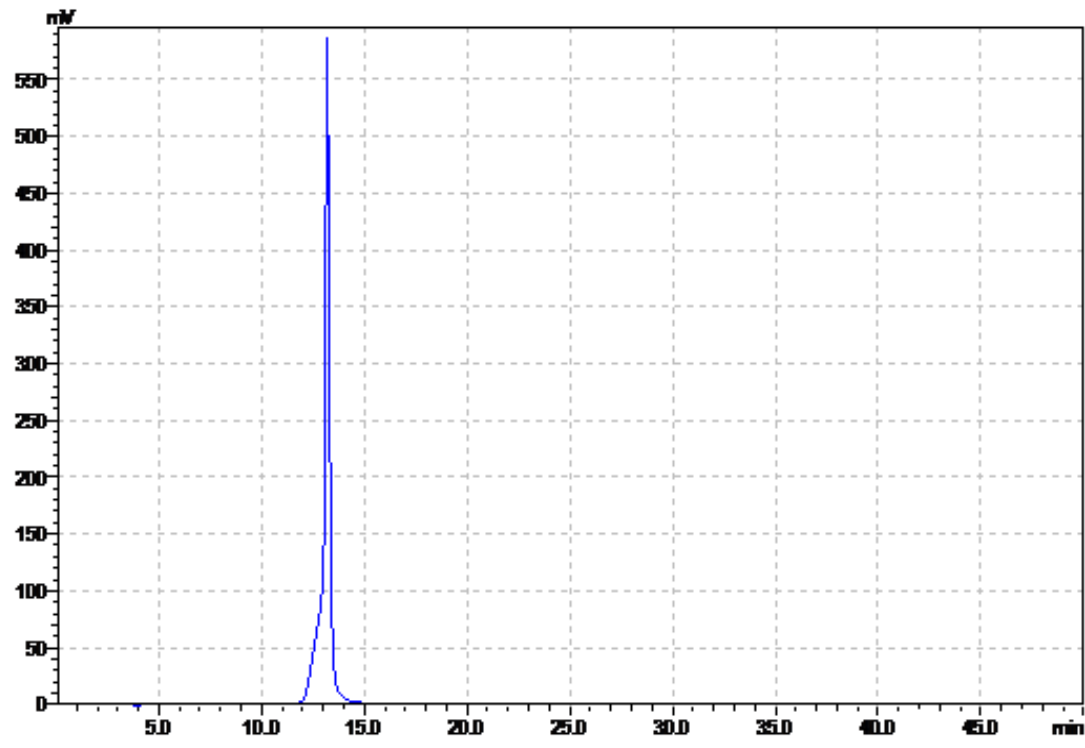


Figure 36. Chromatogramme d'acide chlorengénique (solution standards)

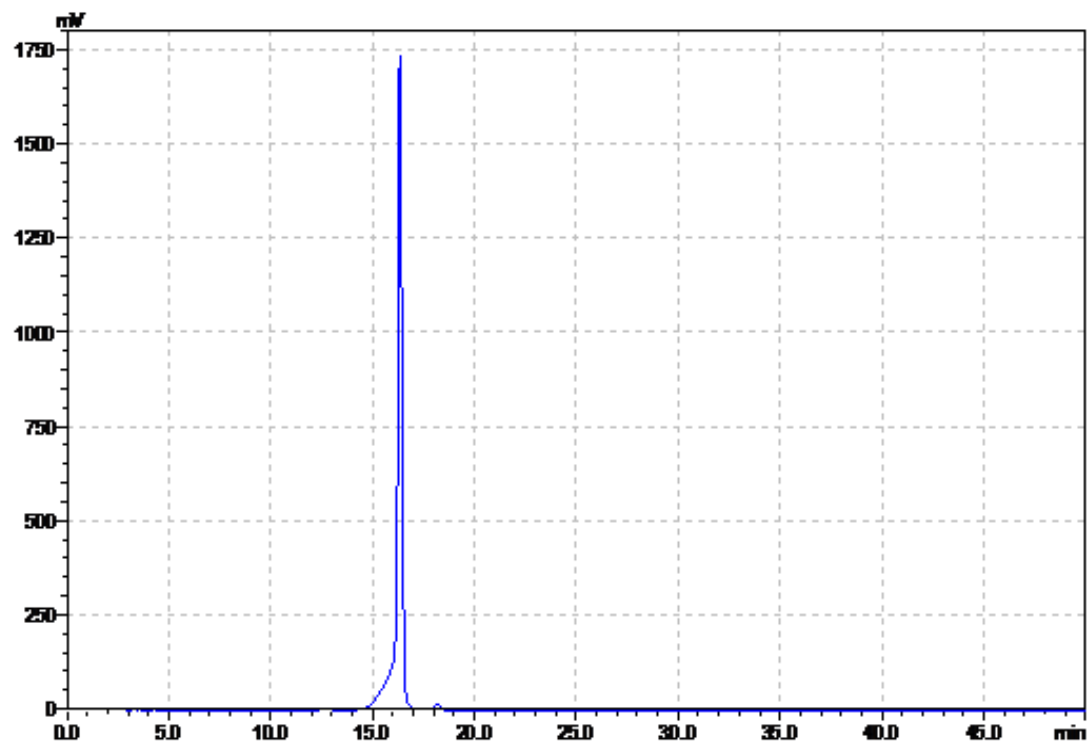


Figure 37. Chromatogramme d'acide caféique (solution standards)

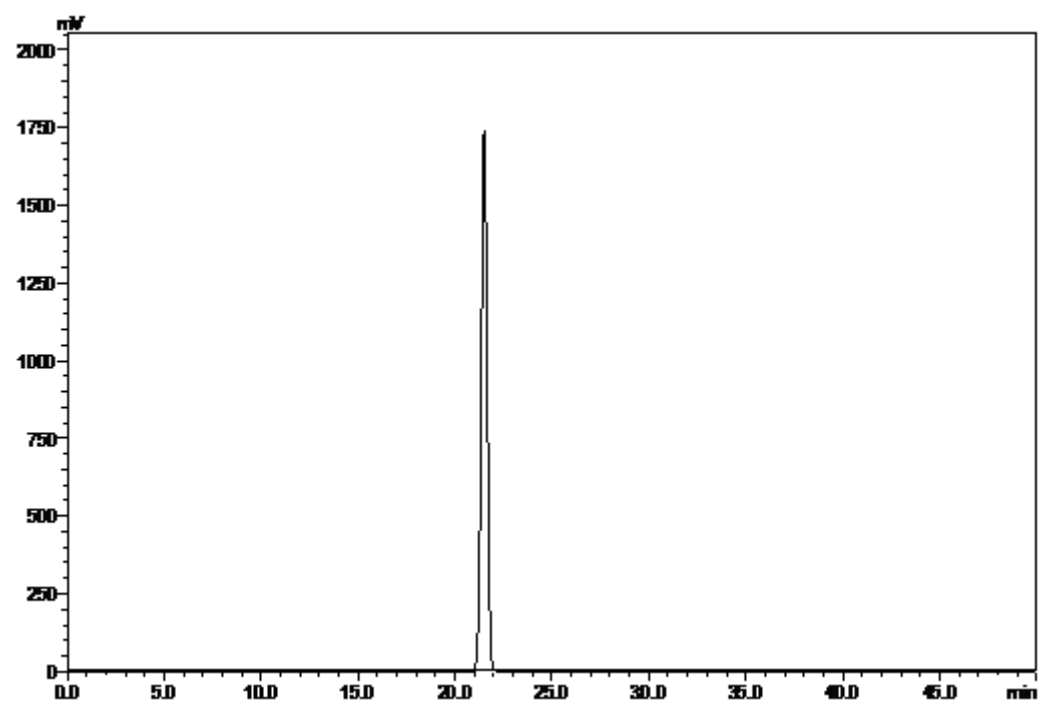


Figure 38. Chromatogramme de vanilline (solution standards)

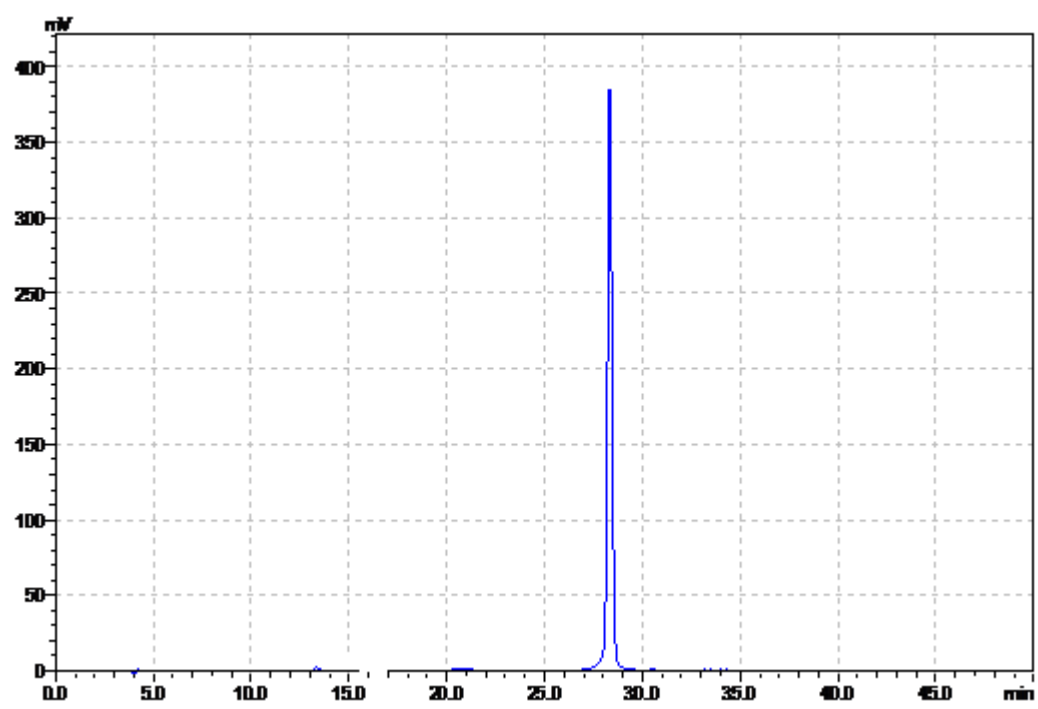


Figure 39. Chromatogramme de la rutine (solution standards)

## III.3.5. 2. Résultats des courbes d'étalonnages des polyphénols standards

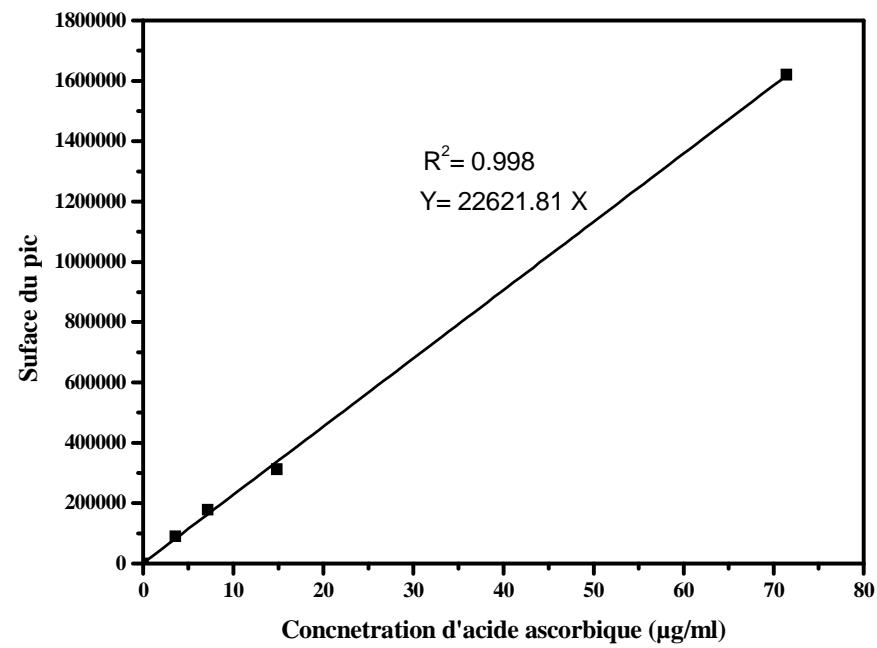
• *L'acide ascorbique*

Figure 40. Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

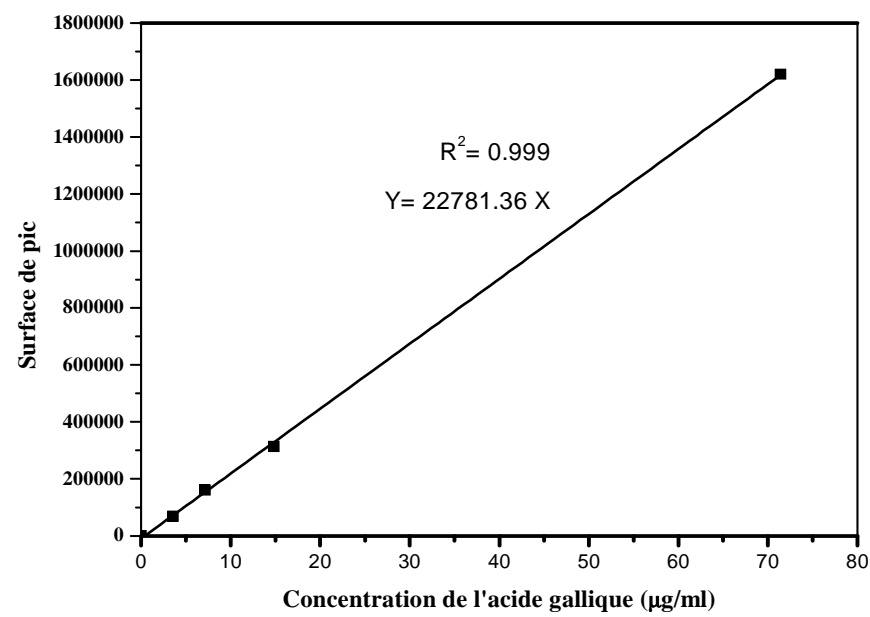
• *L'acide gallique*

Figure 41. Courbe d'étalonnage d'acide gallique

- *L'acide chlorengénique*

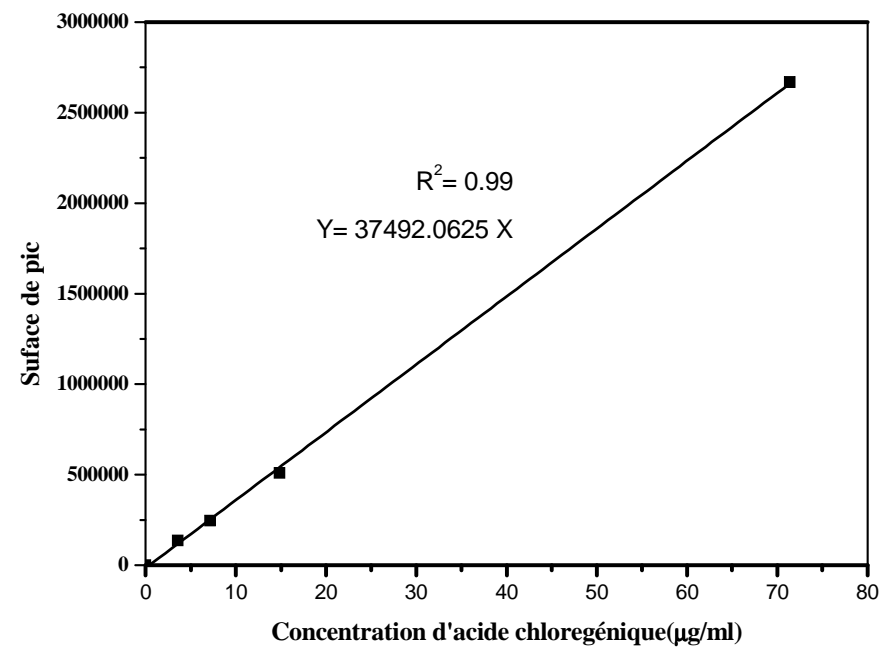


Figure 42. Courbe d'étalonnage d'acide chlorengénique

- *Acide caféique*

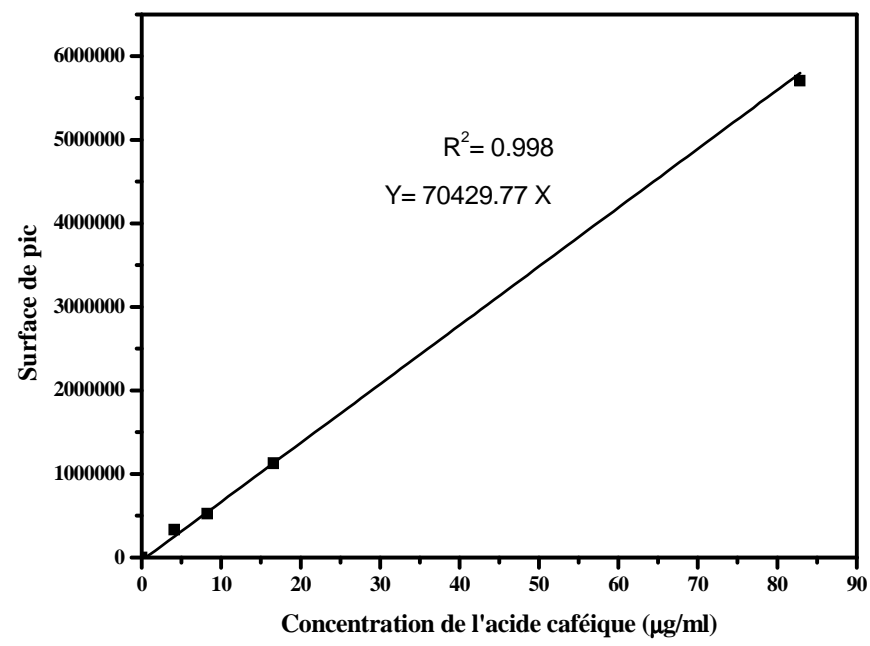


Figure 43. Courbe d'étalonnage d'acide caféique

- *La vanilline*

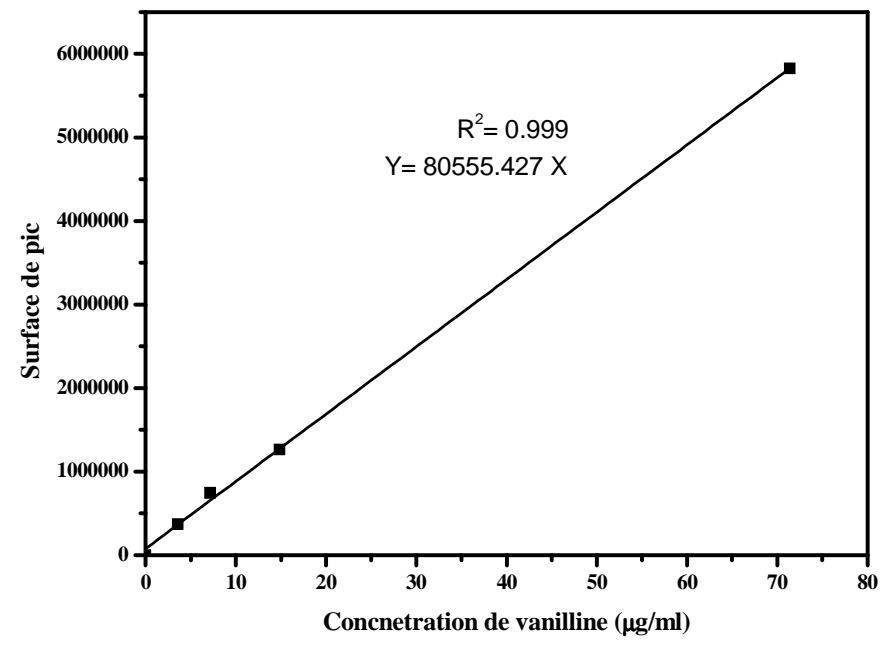


Figure 44. Courbe d'étalonnage de vanilline

- *La rutine*

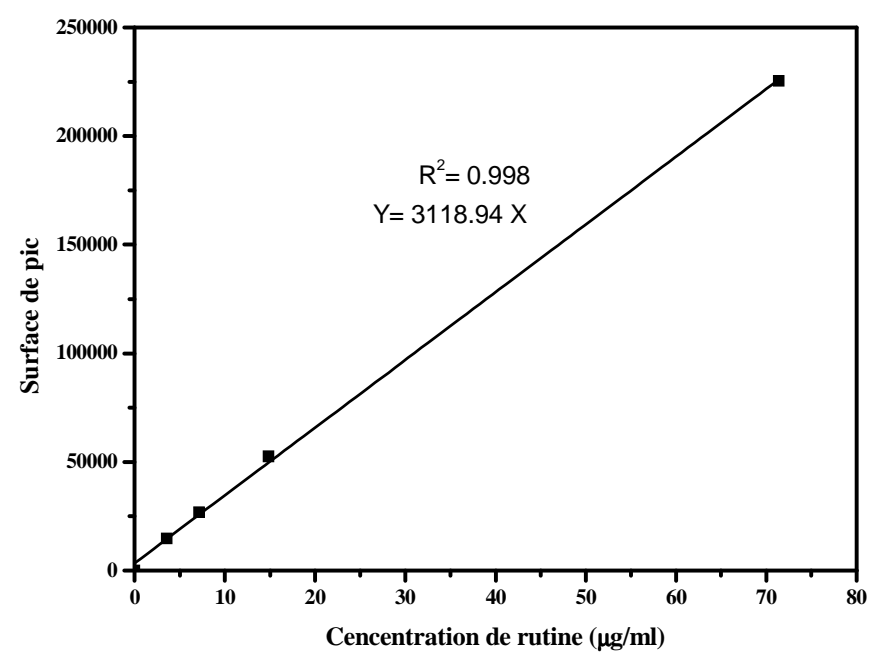


Figure 45. Courbe d'étalonnage de rutine



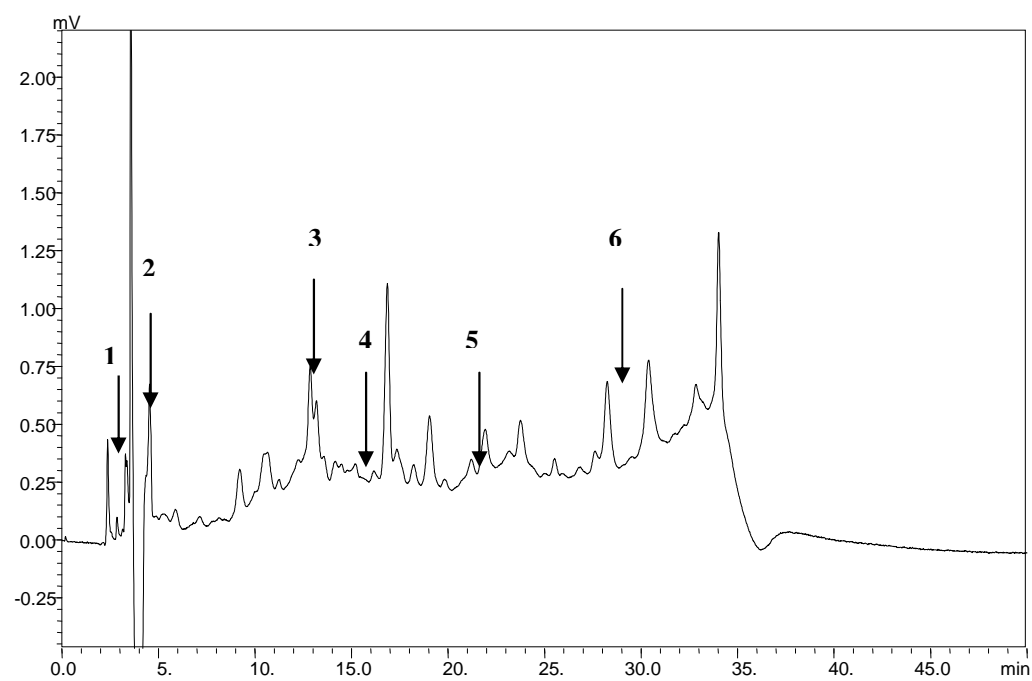
Le tableau 13 résume le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage pour chaque composés phénolique.

**Tableau 13.** Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons

composés	Temps de rétention (mn)	Equation de courbe d'étalonnage	coefficient de corrélation
Acide ascorbique	4.35	$Y=22621.81 X$	$R^2=0.998$
Acide gallique	5.61	$Y= 22781.36 X$	$R^2=0.998$
Acide chlorengénique	13.49	$Y=37492.06 X$	$R^2=0.999$
Acide caféique	16.54	$Y=70429.77 X$	$R^2=0.998$
Vanilline	21.46	$Y=80555.42 X$	$R^2=0.999$
Rutine	28.49	$Y=3118.94 X$	$R^2=0.998$

### III.3.5. 3. Chromatogrammes HPLC des extraits de *Phoenix dactylifera* L

- *L'extrait de la variété Ghars*



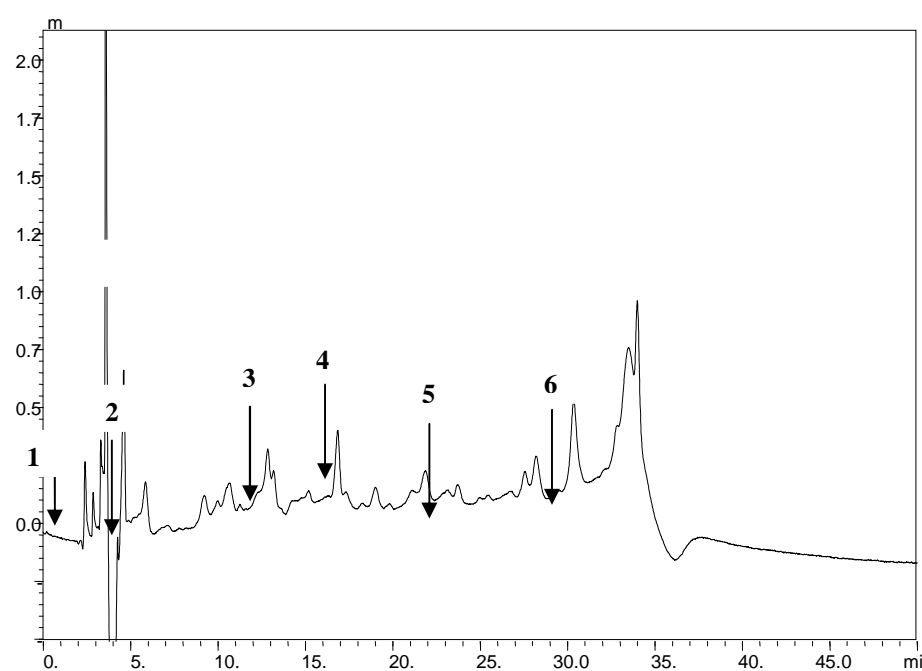
**Figure 46.** profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Ghars.

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorengénique; 4: Acide caféique;  
5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait de la variété Ghars est représenté au niveau de figures 46 tandis que le résultat des analyses quantitatives sont donnés dans le tableau 14. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait des feuilles de la variété Ghars, l'acide ascorbique caféique ( 0.131 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), l'acide gallique (0.153  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), l'acide chlorengénique (0.128  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), caféique (0.066  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), vanilline (0.014  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ) et la rutine (0.078  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ). On montre la présence de ces polyphénols avec des concentrations considérables. Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque des étalons adéquats.

• *L'extrait de la variété Deglet Nour*

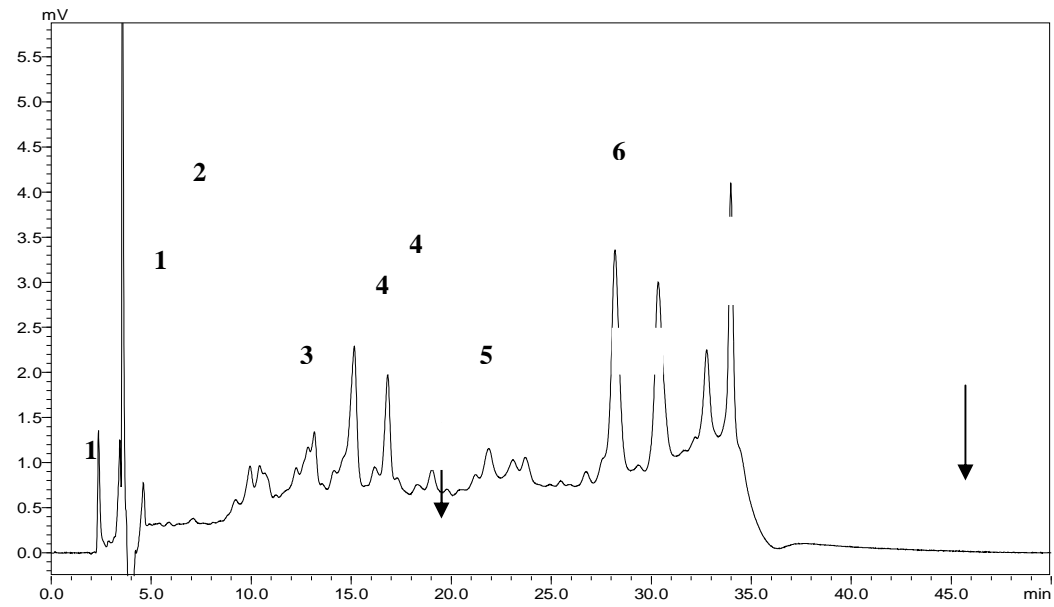
Le profil chromatographique d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour représenté au niveau de figure 47. Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau 14. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de la variété Deglet Nour, l'acide ascorbique ( 0.076 $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), l'acide gallique (0.04  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), l'acide chlorengénique (0.05  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), caféique (0.021  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), vanilline (0.0064  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ) et la rutine (0.072  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), on remarque que l'acide ascorbique est le plus représentatif. Mais du point de vu quantitatif, l'extrait des feuilles de Ghars est meilleur que l'extrait de Deglet Nour.



**Figure 47.** Profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Deglet Nour

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique; 3: Acide chlorengénique; 4: Acide caféique;  
5: vanilline; 6: Rutine

- *L'extrait de la variété Hamraya*



**Figure 48.** Profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Hamraya

1: Acide ascorbique; 2: Acide gallique (Non détecté); 3: Acide chlorengénique; 4: Acide caféique; 5: vanilline; 6: Rutine

Le profil chromatographique d'extrait des feuilles de la variété Hamraya représenté au niveau de figure 48. Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau 14. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de la variété Hamraya, l'acide ascorbique ( 0.029  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), l'acide chlorengénique (0.01  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), caféique (0.022  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), vanilline (0.0097  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ) et la rutine (0.034  $\mu\text{g}/\text{mg Ms}$ ), on remarque l'inexistence de l'acide gallique dans l'extrait et que l'acide caféique est le plus représentatif. D'après ces résultats et du point de vu quantitatif, l'extrait des feuilles de Ghars est meilleur que l'extrait de Deglet Nour et l'extrait de Hamraya.

**Tableau 14.** Concentration de polyphénols des extraits de feuilles

Composés	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )		
	Extrait de Ghars	Extrait de Deglet Nour	Extrait de Hamraya
Acide ascorbique	0.131	0.076	0.029
Acide gallique	0.153	0.04	-
Acide chlorengénique	0.128	0.05	0.01
Acide caféique	0.066	0.021	0.022
vanilline	0.014	0.0064	0.0097
Rutine	0.078	0.072	0.034

**III.3.5. 4. Analyses de Alpha-tocophérol**

La détection de Alpha-tocophérol effectuée à 295 nm pour. La phase mobile est de 100% le méthanol. Le débit était 2 ml / min et la durée de fonctionnement 15 min. La température de la colonne est 40 °C. le volume de l'échantillon à injecté est 10  $\mu\text{l}$  et de concentration 3 mg/ml pour chaque extrait. L'identification des composés sont effectuées en comparant leur temps de rétention avec le standards [189]. Toutes les données ont été collectées et traitées en utilisant la classe le logiciel VP V.6.1 chromatographie de laboratoire (Shimadzu Corporation).

Phase mobile	Méthanol
Colonne	(5 $\mu\text{m}$ , 4.6 x 250 mm)
Volume d'injection	10 $\mu\text{l}$
Débit	2.0 ml/min
Longueur d'onde	295 nm
Le temps de fonctinnement	15 min

- Chromatogramme standards de Alpha-tocophérol

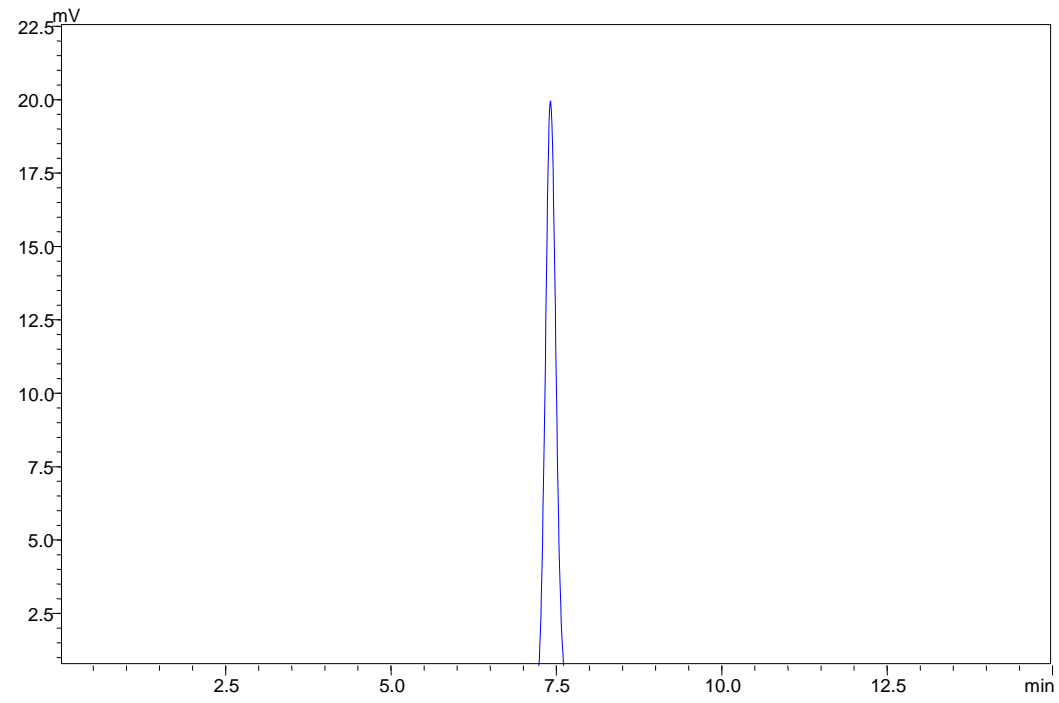


Figure 49. Chromatogramme HPLC de Alpha-tocophérol (standards)

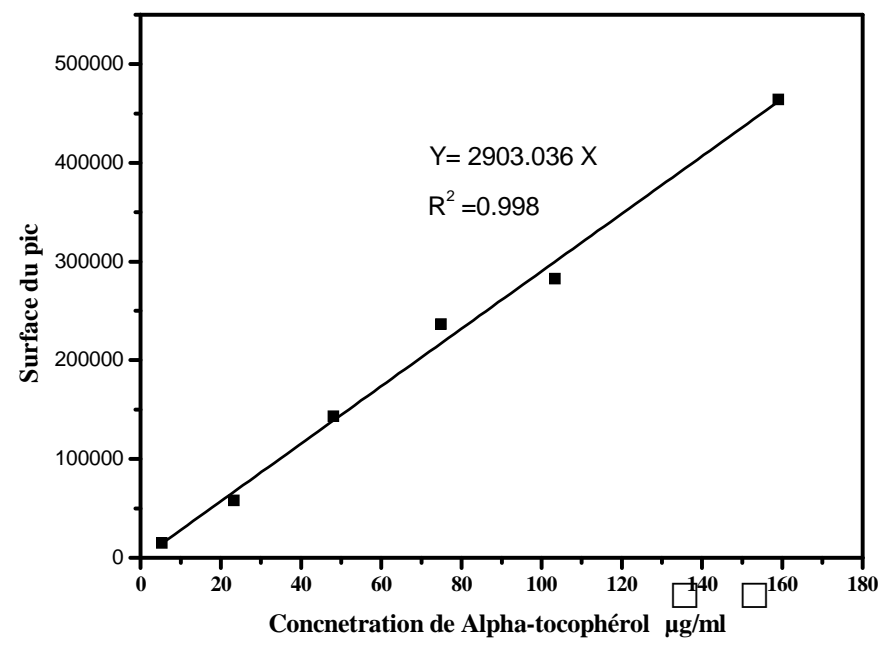


Figure 50. Courbe d'étalonnage de Alpha-tocophérol

### III.3.5. 5. Résultats et discussions d'analyses (Alpha-tocophérol)

Les analyses quantitatives sont donnés dans le tableau 15. L'analyse de ces résultats montre que dans l'extraits de la variété Hamraya présente la concentration la plus élevée de Alpha-tocophérol (0.981 µg/mg Ms), puis la variété Ghars avec la concentration de 0.248 µg/mg et finalement la variété Deglet Nour de concentration 0.112 µg/mg Ms.

**Tableau 15.** Concentration de Alpha-tocophérol dans les extraits des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya.

Extrait	Surface du pic	Concentration de Alpha-tocophérol (µg/mg Ms)
Ghars	2162±65	0.248 ±001
Deglet Nour	977±45	0.112± 0.005
Hamraya	7998±134	0.918±0.02

### III.4. Détermination de l'activité antioxydante des extraits

La mesure du potentiel antioxydant est réalisée en déterminant les produits résultant de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de modèles réactionnels.

Le premier mode, plus ancien, nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. En effet ces méthodes recherchent certains groupements fonctionnels (aldéhydes, cétones, dicarboxylés...) dans les dérivés des constituants d'origine. Le second relie la quantité de radicaux piégés à celle d'antioxydant utilisé.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ ou l'équivalence en polyphénols standards obtenu par spectroscopie UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon se calcul selon la formule suivante:

$$IC (\%) = [(A-B) / (A)] \times 100$$

Avec : a = absorbance de la solution oxydée en absence d'agents antioxydant,

b = absorbance de la solution oxydée en présence d'agents antioxydant.

L'évaluation de l'aptitude du composé (extrait) à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber la création de radicaux libres.

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en polyphénols standards, la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en des standards.

Les types de radicaux que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits des feuilles sont: pouvoir réductrice, le radical  $O_2^-$ , le test ABTS, le test FRAP, le radical  $OH^\cdot$ , le radical DPPH, le radical  $\beta$ -carotène et le radical PPM.

#### III.4.1. Pouvoir réducteur

Un volume 0.2 ml d'extraits à différentes concentrations mélangé avec 2.5 ml de phosphate de sodium tampon (0.2 mol / l, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium (1%), le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Puis, on ajoute 2.5 ml d'acide trichloracétique (10%) préparé dans l'eau (10%, m / v) et centrifugé à 1000 rpm pendant 10 min à la température ambiante. La couche supérieure de solution 5 ml mélangée avec 5 ml d'eau distillée et 1 ml de chlorure ferrique 0.1%. on utilise BHA et BHT pour la comparaison [185]. L'absorbance calculée à 700 nm à l'aide spectrophotomètre d'un UV-visible (Shimadzu UV-1800, Japon). On trace les courbes de concentration d'inhibitions des extraits et  $IC_{50}$  % calculée par l'intersection sur l'axe de concentration (X). Chaque expérience répétée trois fois et les résultats présentées sous forme ( $\pm$ SEM).

#### III.4.2. Pouvoir antioxydant total

Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines.

La méthode consiste à introduire dans un tube Eppendorff 300  $\mu$ l de l'extrait des feuilles mélangés à 2.7 ml d'un réactif composé de  $H_2SO_4$  (0.6 M), de  $NaH_2PO_4$  (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300  $\mu$ l de méthanol mélangé avec 2.7 ml du réactif mentionné ci-dessus [190].

Les étalons, les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg E AG/g Ms).

#### III.4.3. Le test DPPH

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante.

En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH• donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution à examinée.

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 0.5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (7.8 mg DPPH in 100 ml méthanol) a été mélangé 0.3 ml de l'extrait des feuilles. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 0.5 ml de la solution de DPPH et de 0.3 ml de méthanol [189].

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IC (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous

$$\% \text{ IP} = [ (A_{t_0} - A_{t_{30}}) / A_{t_0} \times 100 ]$$

Avec  $A_{t_0}$ : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 30 minutes

$A_{t_{30}}$ : absorbance des extraits mesurés après 30 minutes.

L'activité antiradicalaire exprimée en  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), la dose antiradicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition. Toutes les résultats présentées sont des moyennes ( $\pm$  SEM) et analysées avec trois répétitions.

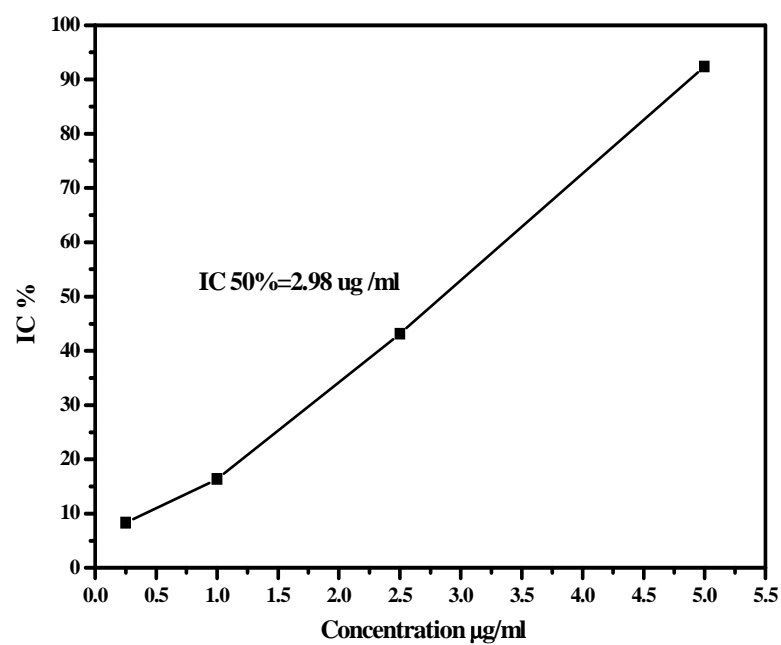


En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % IC correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les % IC.

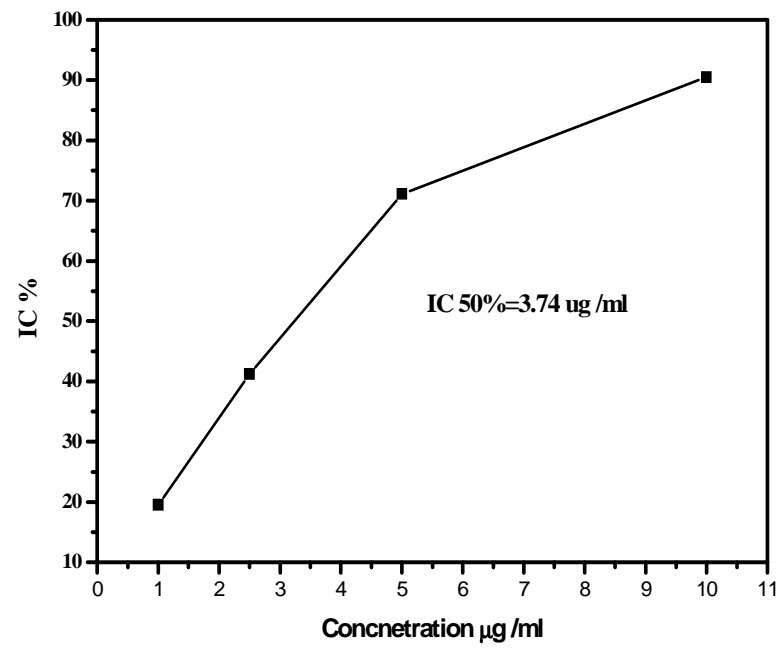
A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'IC<sub>50</sub>.

#### III.4.4. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante DPPH

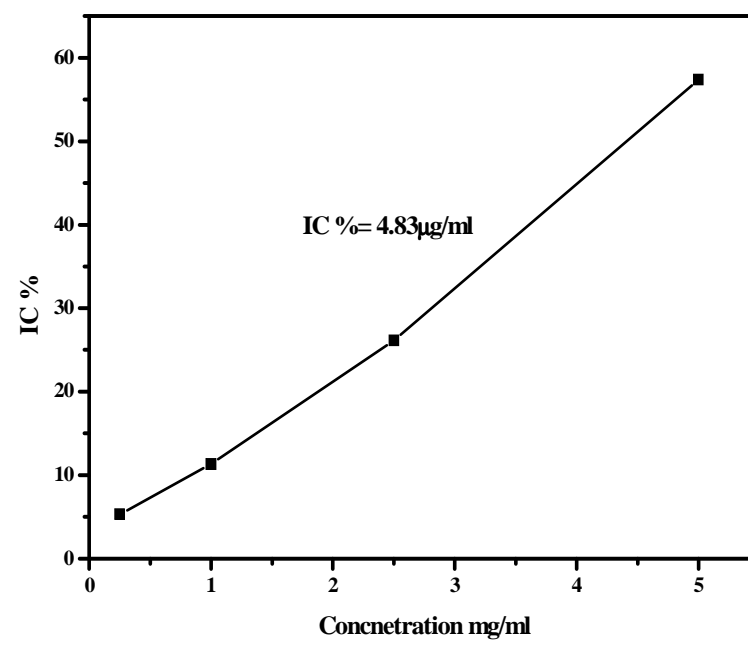
L'activité de piégeage de radical DPPH de feuilles d'extrait méthanolique des trois variétés de *Phoenix dactylifera* L est présentée dans les figures 51, 52 et 53 successivement pour l'extrait des feuilles de la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya et dans le tableau 16. Pour l'extrait de la variété Ghars on obtenus la valeur la plus élevée (IC<sub>50</sub> = 2.98 ± 0.08 µg / ml), la valeur intermédiaire trouvée dans l'extrait de Deglet Nour (IC<sub>50</sub> = 3.74 ± 0.07 µg / ml) et le plus valeur dans l'extrait de la variété Hamraya (IC<sub>50</sub> = 4.83 ± 0.10 µg / ml). La capacité antioxydante des différentes variétés de *Phoenix dactylifera* L est plus élevée que même le standards BHT (IC<sub>50</sub> = 11.7 ± 0.3 µg / ml), cette capacité antioxydante de piéger le radical DPPH liée à la quantité élevée des polyphénols dans notre extraits [191,192].



**Figure 51.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Ghars sur le radical DPPH



**Figure 52.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour sur le radical DPPH



**Figure 53.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Hamraya sur le radical DPPH

### III.4.5. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante totale

L'activité antioxydante totale d'extraits de feuilles des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya variée de  $324.45 \pm 11.43$  à  $206.21 \pm 9.14$  mg EAG / g Ms, on trouve la valeur le plus élevée dans l'extrait des feuilles de Ghars ( $324.45 \pm 11.43$  mg EAG / g Ms), la valeur intermédiaire ( $218.15 \pm 7.55$  mg EAG / g Ms) dans l'extrait des feuilles de Deglet Nour et comme le test DPPH, on trouve la troisième valeur dans l'extrait de Hamraya ( $206.21 \pm 9.14$  mg EAG / g Ms) pour l'extrait de feuilles de Hamraya. Ces résultats fortes confirmés l'activité antioxydante élevée d'extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L, les résultats sont présentés dans le tableau 16.

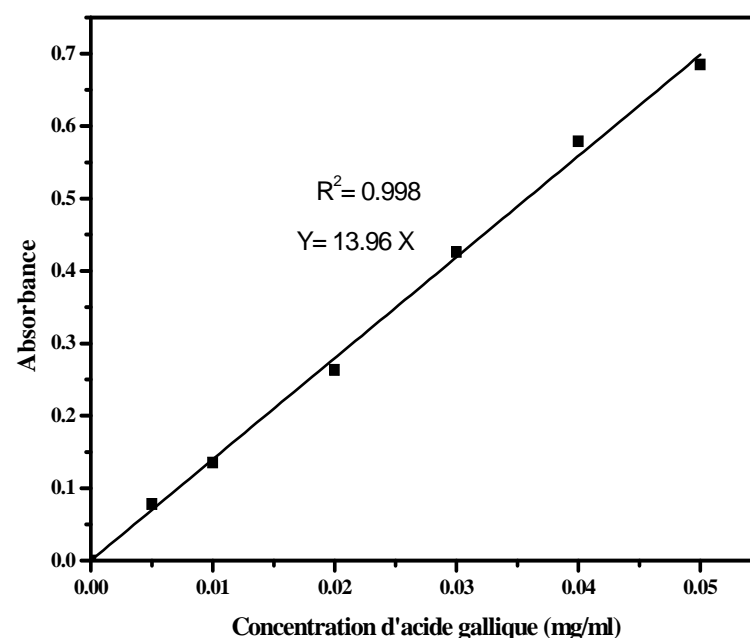
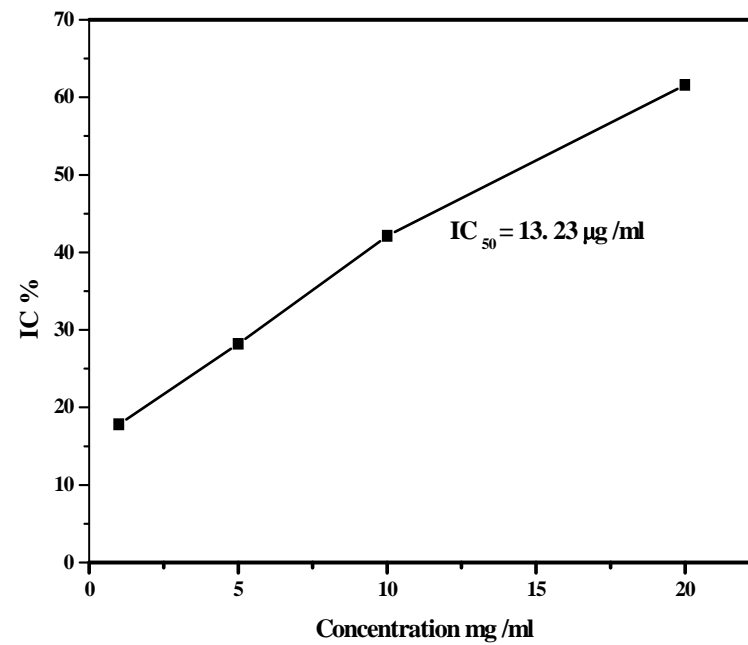


Figure 54. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour pouvoir antioxydant total

### III.4.6. Résultats de détermination de pouvoir réducteur

La réduction  $Fe^{3+}$  est utilisée comme indicateur de l'activité de donneur d'électrons, qui est un mécanisme important de l'action antioxydant des composés phénolique et fortement corrélés avec d'autres propriétés antioxydantes [193]. Le pouvoir réducteur est confirmée par le changement de couleur jaune de la solution d'essai de la couleur vert à la couleur bleu en fonction de la concentration de l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est présentée dans les figures 55, 56 et 57 successivement pour l'extrait des feuilles de la variété Ghars,

Deglet Nour et Hamraya et dans le tableau 14. L'inhibition le plus élevé obtenu dans l'extrait méthanolique de Ghars ( $IC_{50} = 13.28 \pm 0.05 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), la valeur intermédiaire obtenu dans l'extrait de Deglet Nour ( $IC_{50} = 32.73 \pm 1.35 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) et la plus faible valeur trouvée dans l'extrait des feuilles de Hamraya ( $IC_{50} = 42.26 \pm 2.04 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Le pouvoir réducteur de l'ensemble des extraits est significatif et plus élevé que les antioxydant standards BHA ( $IC_{50} = 62.43 \pm 2.55 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) et de l'acide chlorengénique ( $IC_{50} = 49.41 \pm 2.37 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), les résultats sont présentés dans le tableau 16.



**Figure 55.** Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Ghars

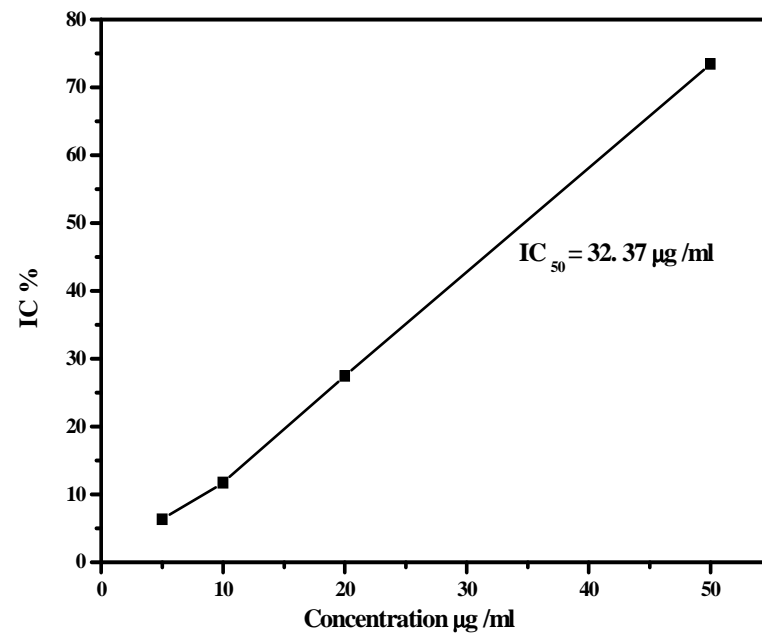


Figure 56. Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour

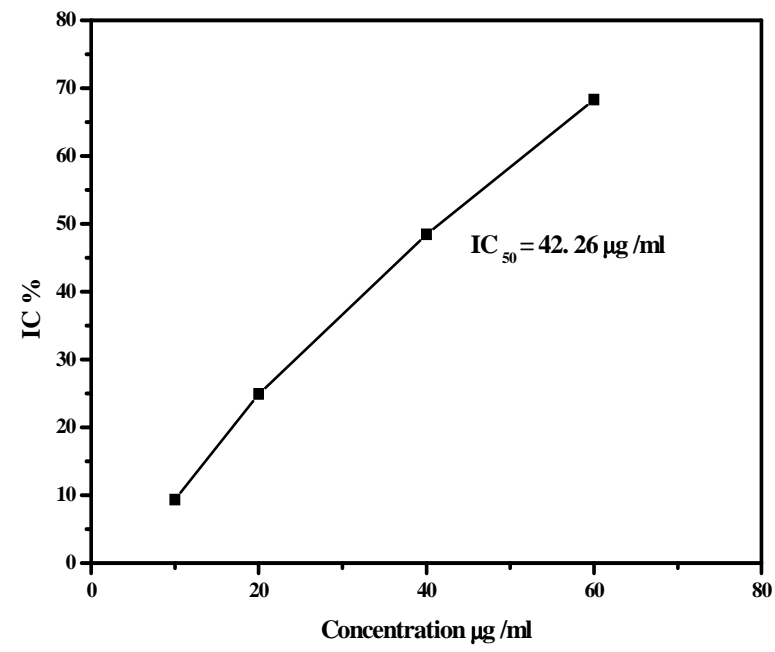


Figure 57. Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Hamraya

**Tableau 16.** Activité de piégeage de radical DPPH (IC<sub>50</sub> en µg / ml), le pouvoir réducteur (IC<sub>50</sub> en µg g / ml) et de l'activité antioxydante totale (mg GAE / g DW) des extraits des variétés de *Phoenix dactylifera* L et les standards BHT , BHA et l'acide chlorogénique.

L'extrait des feuilles et les standards	DPPH	Pouvoir réducteur	Activité antioxydante totale
Ghars	2.98 ± 0.08	13.28 ± 0.05	324.45 ± 11.43
Deglet Nour	3.74 ± 0.07	32.73 ± 1.35	218.15 ± 07.55
Hamraya	4.83 ± 0.10	42.26 ± 2.04	206.21 ± 09.14
BHT	11.7 ± 0.30	–	–
BHA	–	62.43 ± 2.55	–
Acide chlorogénique	–	49.41 ± 2.37	–

Les valeurs exprimées en (±SEM) avec trois répétitions. Les valeurs dans les colonnes sont significatives (P <0.5).

#### III.4.7. Le test β-carotène

La capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition de la production des composés organiques volatils et la formation d'hydroperoxydes diéniques conjugués par l'oxydation de l'acide linoléique [194] . Le β -carotène est préparé tout d'abord par dissolvant 2 mg de ce réactif dans 10 ml de chloroforme. Dans un ballon à fond rond on ajoute 2 ml de la solution β -carotène , de 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 80. Après cette préparation , on élimine le chloroforme à 40 ° C par l'utilisation d'un évaporateur rotatif ( BUCHI R- 210 , Suisse). En suite, compléter le mélange précédent à 100 ml d'eau aérée (riche en oxygène) dans un fiole jaugé sous agitation et protection contre la lumière . on prend 4.8 ml de la solution résultante et transféré dans des tubes contenant 0.2 ml d'extraits de feuilles avec des concentrations différentes . Un échantillon témoin est préparé de 0.2 ml de méthanol et 4.8 ml de réactif de β -carotène . Les tubes ont est incubés à 50 ° C pendant 2 h , l'absorbance mesurée à 470 en utilisant un spectrophotomètre UV-visible ( Shimadzu UV- 1800 , Japon) [194,195]. L'activité antioxydante calculée en utilisant l'équation ci-dessous . :  $IC \% = ((A_0 - A) / (A_0 - A_0)) \times 100$

Où A et A<sub>0</sub> sont respectivement l'absorbance calculée au temps zéro de l'incubation des extraits et témoin; Une A<sub>0</sub>° et A° sont l'absorbance mesurée après 2 h respectivement pour l'extrait et le témoin.

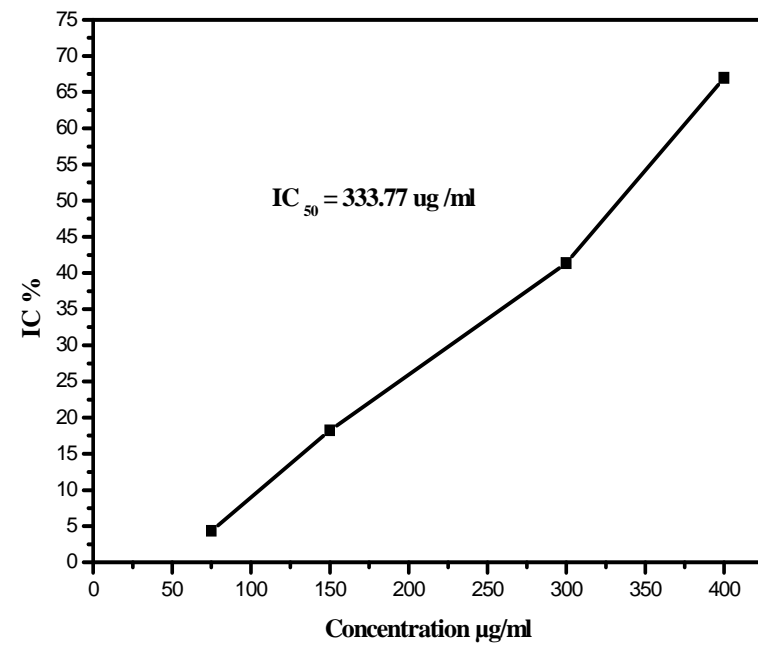
### III.4.8. Résultats de l'évaluation d'activité antioxydante de test $\beta$ -carotène

Pour le système  $\beta$ -carotène le modèle des radicaux libres découle à l'oxydation de l'acide linoléique par l'attaque des molécules  $\beta$ -carotène hautement insaturés et provoque la diminution de l'absorbance à 470 nm. La présence de différents antioxydants peuvent gêner la mesure de  $\beta$ -carotène par neutralisation des radicaux libres et d'autres [185]. Les résultats de l'activité antioxydante (50%) des extraits et les standards (BHT et BHA) sont présentées dans le Tableau 18 et les figures 94,95 et 96 successivement pour l'extrait des feuilles de la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya. L'activité la plus élevée obtenue par l'extrait de la variété Ghars ( $IC_{50} = 333.77 \pm 11.23 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), en suite Deglet Nour ( $IC_{50} = 513.10 \pm 23.03 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) et la plus faible activité dans la variété Hamraya ( $IC_{50} = 750.50 \pm 26.55 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Les résultats liées par la quantité élevée et la présence des polyphénols dans les extrait des feuilles de *Phoenix dactylifera* L, qui peut modérés la dégradation de  $\beta$ -carotène causée par des réactions radicalaires [196].

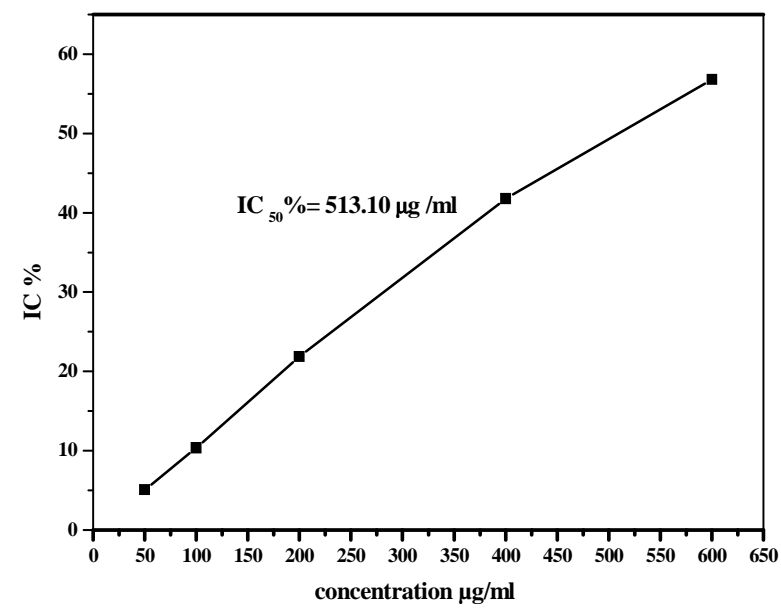
**Tableau 17.** Activité de  $\beta$ -carotène d'extraits des feuilles *Phoenix dactylifera* L et les standards (BHA et BHT). L'activité antioxydante exprimée sous forme de % d'inhibition  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ )

Extrait ou standards	concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Temps de réaction (min)		Activité antioxydante $IC_{50} =$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
		30	120	
Ghars	100	$09.56 \pm 0.08$	$4.320 \pm 0.11$	$333.77 \pm 11.23$
	300	$78.45 \pm 2.67$	$41.35 \pm 1.82$	
	450	$85.32 \pm 3.68$	$66.97 \pm 2.43$	
Deglet Nour	100	$11.32 \pm 0.04$	$05.40 \pm 0,29$	$513.10 \pm 23.03$
	400	$53.55 \pm 2.01$	$25.70 \pm 1.02$	
	550	$85.68 \pm 3.18$	$51.41 \pm 1.85$	
Hamraya	100	$04.21 \pm 0.02$	$00.92 \pm 0.06$	$750.50 \pm 26.55$
	400	$56.61 \pm 2.02$	$25.31 \pm 1.03$	
	800	$86.23 \pm 3.45$	$53.09 \pm 1.05$	
BHA	1	$4.45 \pm 0.030$	$03.34 \pm 0.05$	$76.34 \pm 2.71$
	10	$28.65 \pm 1.06$	$12.86 \pm 1.04$	
	100	$82.12 \pm 2.45$	$63.34 \pm 2.21$	
BHT	1	0	0	$91.34 \pm 3.76$
	10	$03.78 \pm 0.02$	$01.23 \pm 0.04$	
	100	$80.21 \pm 3.14$	$55.35 \pm 2.37$	

Les valeurs exprimées en ( $\pm$ SEM) avec trois répétitions. Les valeurs dans les colonnes sont significatives ( $P < 0.5$ ).

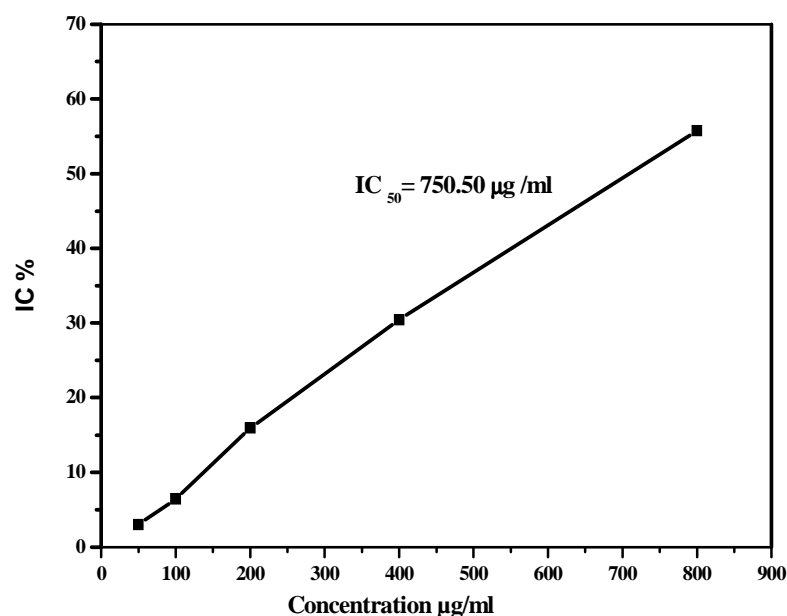


**Figure 58.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Ghars sur la radical  $\beta$ -carotène



**Figure 59.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour sur la radical  $\beta$ -carotène





**Figure 60.** Effet d'extrait des feuilles de la variété Hamraya sur la radical  $\beta$ -carotène

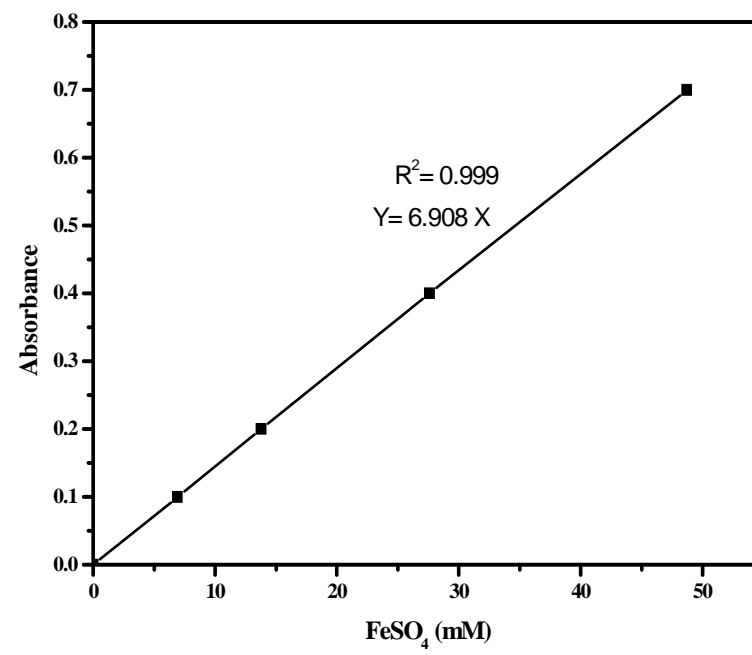
#### III.4.9. Mesure du pouvoir de réduction ferrique (le test FRAP)

Le pouvoir de réduction ferrique déterminé en utilisant un dosage de FRAP [196]. On prépare la solution de réactif de FRAP qui contient 2.5 ml de 10 mM tripyridyltriazine (TPTZ) dans HCl (40 mM), 2.5 ml de  $\text{FeCl}_3$  (20 mM) et 25 ml de tampon acétate 0.3 M (pH 3,6) fraîchement préparé. Un volume de 0.2 d'extrait des feuilles (différentes concentrations) ou standard mélangé avec 1.8 ml de la solution précédente. L'absorbance est mesurée à 595 nm. Pour la courbe d'étalonnage,  $\text{FeSO}_4$  est préparé dans le méthanol 80% pour des concentrations de 0.1 à 0.7 mM et la quercétine utilisé pour la comparaison. Les résultats sont exprimés en mg / ml de Fe (II) par l'utilisation de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de  $\text{FeSO}_4$ :  $R^2 = 0.999$   
 $Y = 6.908 X$ .

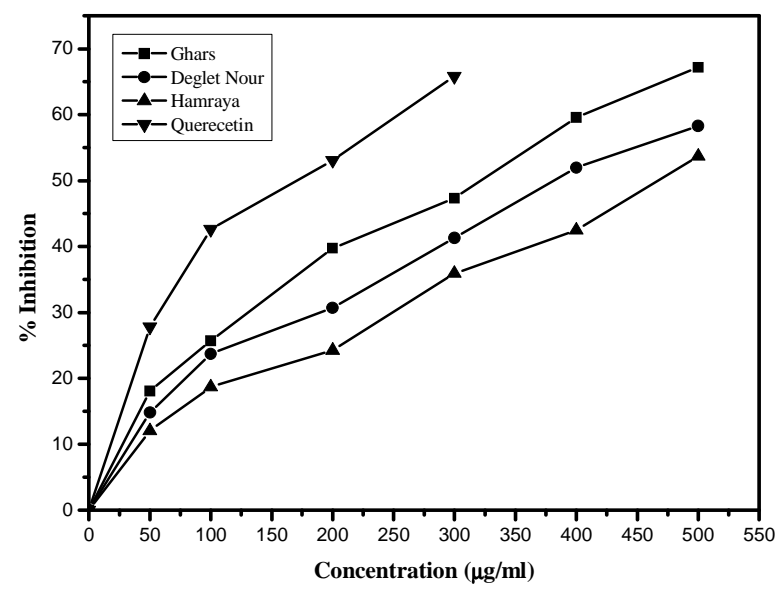
#### III.4.10. Résultats et discussions de test FRAP

Les propriétés antioxydantes d'un composé dépend non seulement de sa structure chimique mais aussi selon le type du radical généré qu'il peut neutraliser. Pour cette raison, nous avons testé le potentiel antioxydant des extraits des feuilles de la variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya de *Phoenix dactylifera* L ce type de radical. Le pourcentage d'inhibition de piégeage des extraits pour la réduction ferrique ont été montrés dans la figure 61 . Les valeurs de  $\text{IC}_{50}$  de Chars, Deglet Nour, Hamraya et le standards sont respectivement

$322.46 \pm 11.37 \mu\text{g} / \text{ml}$ ,  $382.13 \pm 2.85 \mu\text{g} / \text{ml}$ ,  $468.63 \pm 2.85 \mu\text{g}/\text{ml}$  et  $172.14 \pm 16.52 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Après ce résultat, on peut considérer que les extraits des feuilles des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya possèdent une activité de réduction ferrique très remarquable.



**Figure 61.** Courbe d'étalonnage de FeSO<sub>4</sub> de test FRAP



**Figure 62.** Activité de réduction ferrique de test FRAP des extraits des feuilles de Ghars, Deglet Nour, Hamraya et le standards quercétine

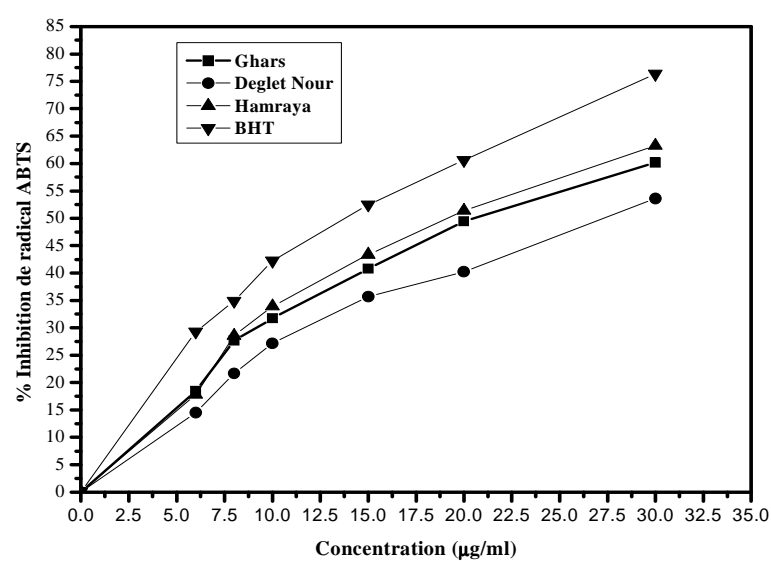
### III.4.11. Le test ABTS

Le test de balayage ABTS réalisé en trois expériences, la solution de ABTS est préparée par: 10 ml de solution ABTS (7 mM) et 178  $\mu$ l de persulfate de potassium aqueux (140 mM), le mélange est incubé à la température ambiante pendant 13 h avant d'utilisé. Après, 2  $\mu$ l d'extrait ou le standards sont ajouté à 1.588 ml de solution ABTS préparée et incubé à température ambiante pendant 10 min. l'absorbance est mesurée à 732 nm [197]. Le pourcentage d'inhibition des extraits et BHT calculé par l'équation suivante  

$$\text{ABTS \% d'inhibition} = \frac{[Ac-As]}{Ac} \times 100 .$$

### III.4.12. Résultats d'inhibition de radical ABTS

L'activité des extraits des feuilles de trois variétés sélectionnées sont mesurés et comparés avec BHT vis-à-vis le piégeage de radical libre ABTS. La figure 63 montre que tous les extraits en question dans cette étude apparait d'activité importante de piégeage de radical ABTS. Les valeurs de  $IC_{50}$  d'inhibition de radical de trois extraits variées entre  $18.88 \pm 0.65 \pm \mu\text{g} / \text{ml}$  à  $27.04 \pm 1.02 \mu\text{g} / \text{ml}$  et  $13,70 \pm 0,35 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour le BHT, l'activité la plus élevée enregistrée dans l'extrait des feuille de la variété Ghars ( $IC_{50} = 18.88 \pm 0.65 \pm \mu\text{g} / \text{ml}$ ), l'extrait de feuilles de Deglet Noue  $20.28 \pm 0.55 \pm \mu\text{g} / \text{ml}$  et la valeur la plus faible dans l'extrait de Hamraya ( $IC_{50} = 27.04 \pm 0.65 \pm \mu\text{g} / \text{ml}$ ). On note que les extraits des feuilles des variétés sélectionnées sont plus puissantes de BHT contre le radical ABTS.



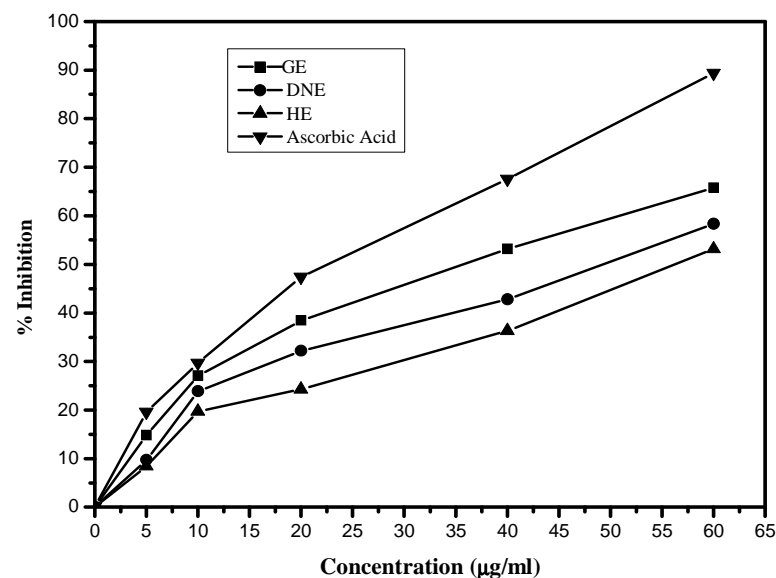
**Figure 63.** Effet des extraits des feuilles des variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical ABTS

**III.4.13. L'inhibition de radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)**

La capacité de piégeage le radical hydroxyle est déterminée par le mode opératoire décrit par Karmakar [198] . Un volume de 0.1 ml d' EDTA (1 mM) ajouté à 10 µl de FeCl<sub>3</sub> (2 mM) et 0.1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (8.8 mM). Après, on ajoute à le mélange réactionnel précédente le mélange précédent 0.36 ml désoxyribose (10 mM) et 1 ml d' extrait des feuilles (différentes concentrations ) ou l'acide ascorbique (standard). Après, on complète la réaction par l'addition de 0.33 ml de phosphate tampon (50 mM, pH 7.4 ) et 0.1 ml d'acide ascorbique avec ce l'ordre. Après incubation pour 1 h à 37 °C, 1 ml de mélange réactionnel mélangé avec 1 ml de TCA et 1 ml de TBA (0.5%) (25 mM NaOH et 0.025% de BHA) pour développer le chromogène rose et l'absorbance calculée à 532 nm. L'acide ascorbique utilisé pour la comparaison . L'activité de piégeage des radicaux hydroxyle de l'extrait est calculée de % d'inhibition de la dégradation du désoxyribose l'utilisation de l'équation suivante. % d'inhibition = [( C- T) / C] x100. Lorsque, C : L'absorbance à 532 nm du contrôle . T : absorbance à 532 nm de l'échantillon

**III.4.12. Résultats d'inhibition de radical OH<sup>•</sup> par les extraits**

Dans ce test, l'activité antioxydante est déterminée sur la base que les extraits inhibaient l'oxydation du désoxyribose par un groupe OH<sup>•</sup> générée à partir de la réaction du type Fenton. Les extraits présentent une puissante activité de piégeage des radicaux hydroxyle, par rapport à l'acide ascorbique standard (Figure 64). La valeur IC<sub>50</sub> d'extrait de feuilles de Ghars, Deglet Nour, Hamraya et l'acide ascorbique sont 35.74 ± 1.34 µg / ml, 49.27 ± 1.84 µg / ml, 56.11 ± 1.95 µg / ml et 22.70 ± 0.69 µg / ml, respectivement.



**Figure 64.** Effet des extraits des feuilles des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical hydroxyle

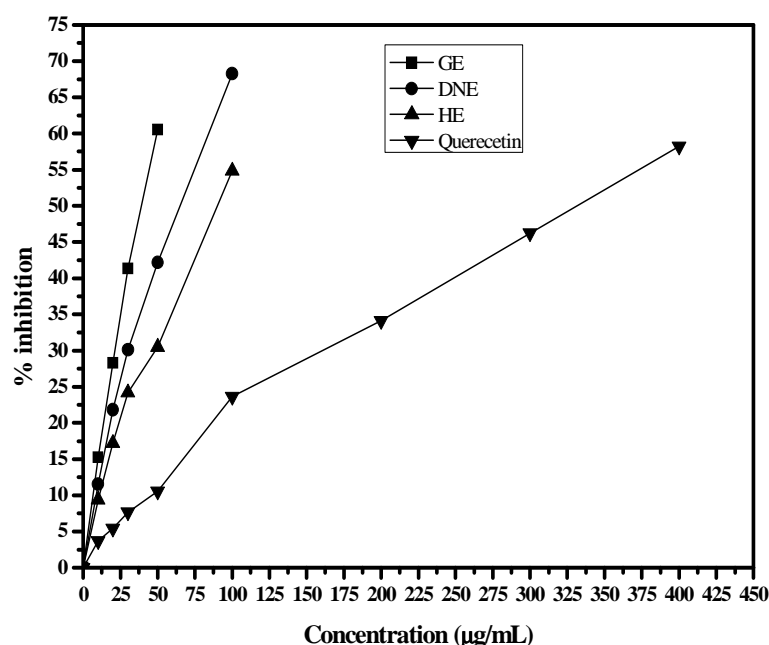
#### III.4.13. Activité de piégeage de radical superoxyde ( $O_2^-$ )

L'activité de piégeage de radical superoxyde par les extraits des feuilles est estimée en utilisant l'inhibition de la réduction du NBT par génération photochimique de  $O_2^-$ . Un mélange de dosage contient  $2 \mu\text{M}$  de riboflavine,  $6 \mu\text{M}$  d'EDTA,  $50 \mu\text{M}$  de NBT et  $3 \mu\text{g}$  cyanure de sodium dans un solution tampon de phosphate ( $67 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7.8$ ) pour un volume final de  $3 \text{ ml}$ . L'absorbance est mesurée à  $530 \text{ nm}$ , les tubes est éclairés uniformément avec une lampe d'incandescence à  $530 \text{ nm}$ . L'extrait des feuilles est ajouté au mélange réactionnel, l'inhibition obtenue par la réduction du NBT [199,200]. La quercétine utilisé comme standards positif pour la comparaison et le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit:  $\% \text{ Inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$ . La valeur  $IC_{50}$  est la concentration ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) d'extrait qui provoque une perte 50% de radical superoxyde calculée par l'analyse de régression linéaire.

#### III.4.14. Résultats d'inhibition de radical $O_2^-$ par les extraits

Le test est basé sur la capacité des différents extraits de *Phoenix dactylifera* L pour améliorer la formation de formazan par rapport au signal de référence NBT / riboflavine. Les résultats des variétés sélectionnées sont représentées sur la figure 65, l'activité de piégeage d'extrait de variété Ghars présente l'inhibition la plus élevée ( $CI_{50} = 39.11 \pm 0.92 \mu\text{g} / \text{ml}$ ),  $CI_{50} = 67.32 \pm 1.7 \mu\text{g} / \text{ml}$  pour l'extrait des feuilles de Deglet Nour et tandis que

les feuilles extrait de feuilles de la variété Hamraya donne la faible activité ( $IC_{50} = 89.73 \pm 2.12 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Ces extraits donnent une activité élevée que le quercétine ( $IC_{50} = 327.95 \pm 12.25 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Les résultats sont collectées sur la figure 65.



**Figure 65.** Effet des extraits des feuilles des variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical  $O_2^-$

#### III.4.15. Relation entre composés phénoliques et l'activité antioxydante

Dans cette partie nous avons cherché à établir une relation entre la présence des composés phénoliques et l'activité antioxydante de certains extraits. Cette relation établie une corrélation linéaire entre les composés phénoliques et la capacité antioxydante qu'ils manifestent. En effet, une très bonne corrélation a été établit entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes des extraits des feuilles des feuilles des trois variétés sélectionnées Ghars, Deglet Nour et Hamraya.

#### III. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de *Phoenix dactylifera L*

L'anti-inflammatoire, désigne une substance qui s'oppose ou combat l'inflammation. De façon générale l'inflammation correspond à un ensemble de phénomènes survenant à un point d'irritation après l'invasion par un agent pathogène (susceptible d'engendrer une maladie). A la suite d'une agression constituée par une blessure, une infection ou un traumatisme consécutif à un acte chirurgical, il se crée dans l'organisme ce que l'on appelle

une inflammation. Classiquement, une inflammation se manifeste par quatre signes principaux : rougeur, chaleur, tuméfaction (gonflement) et douleur.

Le mécanisme inflammatoire fait intervenir un grand nombre de substances présentes dans le sang, entre autres de nombreuses hormones, comme les prostaglandines, l'histamine, des compléments, les cytokines participent à l'inflammation.

- **Classification**

Les anti-inflammatoires sont classés en stéroïdiens (médicaments composés de molécules stéroïdiennes telles que les corticoïdes, les gluco-corticostéroïdes et ses dérivés), et en non stéroïdiens (pyrazolés, molécules divers comme l'aspirine, les oxycams, les dérivés carboxyliques et indoliques). A titre d'exemple, les glucocorticostéroïdes sont essentiellement utilisés comme antiallergique et immunosuppresseur (procédé provoquant une diminution ou une abolition des réactions immunitaires). Ceci permet en cas de greffe d'organes, la prévention du rejet. Ces médicaments sont également employés en cas de leucémie, parfois en association avec des produits anticancéreux.

Les analyses anti-inflammatoires sont réalisées sur les extraits des feuilles de trois variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L.

### III.5.1.Principe de la méthode

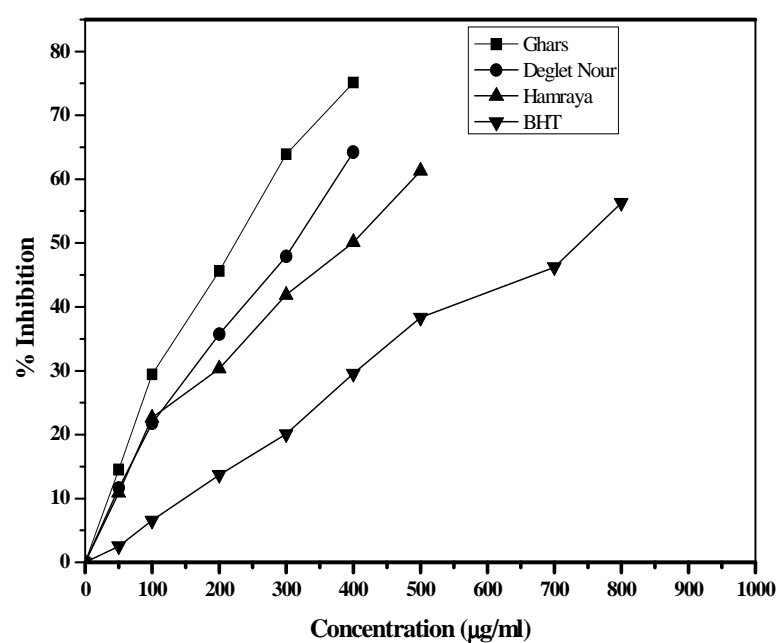
La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire est celle basée sur la réduction du nitrite. En effet, le test utilisé pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire de molécules consiste à déterminer leur capacité à inhiber la production de NO dans les macrophages activés. La production du le nitrite dans le milieu de culture a été mesuré comme un indicateur de la production de NO selon le test colorimétrique basée sur la réaction de Griess [196,197,200].

Un volume 2 ml de nitroprussiate de sodium préparé dans un solution tampon de phosphate salin (pH = 7.4) et ajouté à 0.5 ml de différentes concentrations d'extraits de des feuilles, BHT. Le mélange incubé à 25 °C pendant 150 min. Après, 0.5 ml de chaque échantillon est ajouté à 0.5 ml de réactif Griess (sulfanilamide à 1%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% et 0.1% de réactif ACS préparé dans l'eau distillée) et on laisse reposer pendant 30 min. L'absorbance du chromophore formé lors de la diazotation avec du nitrite de sulfanilamide et le couplage avec naphthyle éthylène diamine est mesurée à 546 nm. Le pourcentage d'inhibition de radical d'oxyde nitrique est calculé en utilisant l'équation: % Inhibition=100 × ([NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> control - [NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> Extrait) / [NO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> control

$[\text{NO}_2]^-_{\text{control}}$ : concentration de nitrite produit en absence d'extrait.  $[\text{NO}_2]^-_{\text{Extrait}}$ : concentration de nitrite produit en présence d'extrait

### III.5.2. Résultats de l'évaluation *in vitro* des propriétés anti-inflammatoires des extraits

L'activité de piégeage des extraits contre l'oxyde nitrique est calculée. Tous les extraits présentent une production de NO avec  $\text{IC}_{50} < 400 \mu\text{g} / \text{ml}$ . L'effet le plus important est observé pour l'extrait des feuilles de la variété Ghars avec l'inhibition  $\text{CI}_{50} = 240.28 \pm 8.42 \mu\text{g} / \text{ml}$ . Concernant les autres extraits, Deglet Nour  $\text{IC}_{50} = 307.89 \pm 11.25 \mu\text{g} / \text{ml}$  et Hamraya  $\text{IC}_{50} = 390.72 \pm 13.15 \mu\text{g} / \text{ml}$ . L'inhibition de BHT est  $\text{IC}_{50} = 711.65 \pm 19.35 \mu\text{g} / \text{ml}$ , les résultats présentés dans la figure 66. A partir de cette, on enregistre la l'activité anti-inflammatoire des extraits par rapport le standards (BHT)



**Figure 66.** Evolution de l'activité anti- inflammatoire des extraits des feuilles de variétés sélectionnées et BHT en fonction de concentration

## III.6. Evaluation de l'activité antimicrobiennes des extraits de *Phoenix dactylifera* L

### II.6.1 L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifeste aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.



En limitant la croissance bactérienne, le médicament permet aux défenses naturelles de l'organisme d'entrer en jeu sans être dépassées. L'effet bactériostatique d'un médicament est évalué par la concentration minimale inhibitrice. Pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibitrice pour la quelle il n'a plus des germes microbiens visibles.

#### **II.6.2.L'effet bactéricide**

C'est un effet qui se manifeste par une accélération de la mort des bactéries aux concentrations d'extraits ou antibiotique utilisées *in vivo* ou *in vitro*; s'il persiste moins de 0.01% de survivants après 18 h de culture en présence d'antibiotique.

#### **III.6.3.Méthode de diffusion pour l'estimation de l'activité antimicrobienne**

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'extrait ou antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (Müller Hinton), préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne ( $10^8$  CFU / ml) en phase exponentielle de croissance.

A partir du disque, l'extrait diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration). Les boîtes de Pétri (milieu de culture) sont incubation (18 h à 37 °C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe une concentration d'antibiotique supérieur ou égale à la CMI. Le schéma 21 montre une représentation théorique de cette technique [201].

Pour chaque test on mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis à vis de la souche étudiée. En effet, pour un antibiotique donné, une relation existe entre la valeur du diamètre d'inhibition de croissance et celui de la CMI, celle-ci est établie par des études comparatives préalables portant sur un grand nombre de souches appartenant à des espèces différentes.

#### **III.6.4.Méthode de dilution pour l'estimation de l'activité antimicrobienne**

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu solide et liquide.

La mesure de la CMI en milieu liquide est effectuée de la manière suivante, on distribue dans un premier temps dans une série de tubes à hémolyse stériles (ou dans les capsules d'une plaque), un même volume des concentrations décroissantes d'antibiotiques ou l'extrait (habituellement en progression géométrique de raison 2). Puis on ajoute dans chacun de tubes, un même volume de culture bactérienne en phase exponentielle de

croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ  $10^6$  bactéries/ ml (inoculum bactérien optiquement invisible).

La CMI de l'antibiotique ou l'extrait sur la souche étudiée est définie comme la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil après 18 ou 24 h de contact à 37°C [186].

Le principe de la technique en milieu solide est identique, l'antibiotique étant ici incorporé dans un milieu de culture rendu solide par la présence de gélose. L'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes.

Toutefois, ces deux techniques sont très laborieuses et ne sont pas habituellement appliquées à la détermination, en routine d'un grand nombre d'antibiotique sur une souche bactérienne .

### III.6.5. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits

#### • *Microorganismes*

Souches bactériennes utilisées dans cette étude : Deux Gram positif , *Staphylococcus aureus* ATCC et *Bacillus cereus* ATCC 14579 . 8 Gram-négatives: *Escherichia coli* ATCC 35218 , *Salmonella arizona* DM 35605 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* HM 627626 , *Pseudomonas aeruginosa* HM 627575, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* HM 627579, *Pseudomonas putida* HM 6227611 et le champignon d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 B6 . Toutes les souches sont obtenues par le Laboratoire de traitement des eaux usées , Centre de Recherche et Technologies de l'Eau ( CERTE), Technopôle Borj-Cédria.

#### • *Préparation des suspensions bactériennes*

Les suspensions bactériennes sont préparées 24 h avant l'ensemencement afin d'atteindre une concentration moyenne de 1 à  $2 \times 10^6$  CFU/ml (Colonies Forming Units par ml) ou bactéries/ ml de sorte à obtenir des colonies juste confluentes. Il est obtenu à partir d'une culture d'environ 24 heures (en phase stationnaire) sur gélose non inhibitrice. L'ajustement de la concentration de l'inoculum de 1 à  $2 \times 10^6$  CFU/ ml (bactéries/ ml) est essentiel pour la qualité de l'analyse.

Pour cela, nous avons prélevé sur une gélose nutritive quelques colonies de la bactérie à étudier et émulsionner dans un tube en verre contenant 5 ml du milieu de suspension (milieu de gélose nutritif liquide). Puis nous avons ajusté la concentration à la valeur requise par dilution en utilisant de l'eau physiologique.

**Ajustement de la concentration de l'inoculum**

Nous avons placé environ 2 ml de la suspension bactérienne dans la cuve du photomètre réglé à 550 nm. Selon les espèces bactériennes, une DO (densité optique) de 0.10-0.12 correspond à  $1-3 \times 10^8$  bactéries/ ml.

La suspension est ajustée à une DO de 0.12 comme précédemment indiquer jusqu'à avoir la concentration requise ( $10^8$  CFU/ ml) pour les bactéries et ( $10^5$ CFU/ ml) pour les champignons.

- **Préparation du milieu gélose nutritif**

Environ 26 g gélose nutritif sont pesés puis dissous dans 1l d'eau distillée, la solution obtenue est ensuite stérilisée à l'autoclave. Le milieu est refroidi, ensuite coulé (environ 20 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à la solidification), les boîtes sont séchées sous laminoir (flux à air stérile). Environ 10 billes de verres stériles sont ajoutées dans chaque boîte de Pétri.

- **Champignons**

*Candida albicans* ATCC 90026, *Pyrenophora teres* F et *Ptytophtora nicotina*

- **Conditions d'incubation**

Le gélose nutritive est utilisé comme un milieu de culture pour les bactéries, incubé pendant 24 heures à 37 ° C et les levures ont été cultivées dans de la gélose de dextrose Sabouraud (SDA ; 4 % de dextrose , 2% neopeptone et 1.7 % d'agar ) pendant 24-48 h à 30

- **Protocole**

Les extraits des feuilles de trois variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya *de dactylifera Phoenix* L et l'antibiotique (polymyxine B ) sont dissous dans un mélange méthanol- eau à 80% pour une concentration finale de 10 mg / ml et stérilisé par filtration à travers un filtre à membrane de 0.45 . L'activité antimicrobienne a été estimée par la méthode de diffusion de disque [193], 100 µl de suspension pour chaque microorganisme  $10^8$  (CFU) / ml de bactéries est mise dans des boîtes pétri de matière plastique contenant 20 ml gélose nutritive . Après, on place dans le disque stérilisé en papier ( 6 mm de diamètre) et 15 µl de 10 mg / ml de chacun des extraits des feuilles ou l'antibiotique . Le méthanol à 80% est utilisé comme témoin négatif et de la polymyxine B comme témoin positif préparés avec le même mode opératoire décrit ci-dessus , sauf que l' extrait est remplacé par 15 µl de témoin positif à 10 µg / ml , le diamètre de l' inhibition de la zone autour de chaque disque est mesuré en trois répétitions.

**III.6.6. Résultats des analyses antimicrobienne des extraits**

Les résultats de l'évaluation d'activité antimicrobienne des extraits des feuilles sont repris ci-dessous (Tableaux 19, 20 et 21). Dans ces tableaux sont inclus d'une part les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruites par l'activité antimicrobienne des extraits et l'antibiotique. Pour l'ensemble des extraits, nous remarquons que l'extrait des feuilles de la variété Ghars montre une activité plus élevée que les extraits les autres extraits. Le diamètre de la zone d'inhibition varié de 14 à 20 mm, les souches la plus sensible sont *Ptytophthora nicotina* et *Staphylococcus aureus* ATCC qui donnent un diamètre de 20 mm. On enregistre que *Agrobacterium tumefaciens* B6 C58 ne présente aucune sensibilité vis-à-vis l'extrait. Concernant l'extraits des feuilles de la variété Deglet Nour, nous avons trouvé que toutes les souches présentent des sensibilisées vis-à-vis l'extrait, et remarque que les plus sensible sont *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Ptytophthora nicotina* et comme le d'extrait des feuilles de la variété Ghars, la souche *Agrobacterium tumefaciens* B6 C58 apparait une résistance contre l'extrait. Pour l'extrait des feuilles de la variété Hamraya, on montre les sensibilités des souche par rapport l'extrait comme le cas précédent. L'activité antibactérienne élevée enregistrer contre les souches *Staphylococcus aureus* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Agrobacterium tumefaciens* B6 C58 avec diamètre d'inhibition de 19 à 20 mm.

**Tableau 18.** Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété de Ghars.

Bactéries	Zone d'inhibition (mm)	polymyxine B (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	20 ± 1	13± 1
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	19 ± 0.5	11. ± 1
<i>Escherchia coli</i> ATCC 35218	14± 0.5	08 ± 0.5
<i>Salmonella arizona</i> DM 35605	17± 1	10± 1
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> B6 C58	Na	08± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16 ± 1	11 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HM 627626	15 ± 1	11 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HM 627575	14 ± 1	10± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	16 ± 0.5	12 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> HM 627579	15± 1	12± 1
<i>Pseudomonas putida</i> HM 6227611	16 ± 1	11 ± 1
<i>Ptytophthora nicotina</i>	20 ± 2	12± 1

**Tableau 19.** Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété de Deglet Nour.

Bactéries	Zone d'inhibition (mm)	polymyxine B (mm)
Staphylococcus aureus ATCC	19± 1	13± 1
Bacillus cereus ATCC 14579	20± 1	11. ± 1
Escherchia coli ATCC 35218	14± 2	08 ± 0.5
Salmonella arizona DM 35605	17± 2	10± 1
Agrobacterium tumefaciens B6 C58	na	08± 1
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	16± 1	11 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627626	14 ± 2	11 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627575	14± 1	10± 0.5
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	16± 1	12 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627579	16± 2	12± 1
Pseudomonas putida HM 6227611	15± 1	11 ± 1
Ptytophtora nicotina	20± 1	12± 1

**Tableau 20.** Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété de Hamraya.

Bactéries	Zone d'inhibition (mm)	polymyxine B (mm)
Staphylococcus aureus ATCC	19 ± 1	13± 1
Bacillus cereus ATCC 14579	19 ± 2	11. ± 1
Escherchia coli ATCC 35218	14± 1	08 ± 0.5
Salmonella arizona DM 35605	17± 2	10± 1
Agrobacterium tumefaciens B6 C58	na	08± 1
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	16 ± 2	11 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627626	14 ± 2	11 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627575	14 ± 1	10± 0.5
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442	16 ± 1	12 ± 1
Pseudomonas aeruginosa HM 627579	16 ± 2	12± 1
Pseudomonas putida HM 6227611	15 ± 1	11 ± 1
Ptytophtora nicotina	20 ± 2	12± 1

### III.6.7. Résultats d'analyses antifongique

L'effet inhibiteur d'extraits des feuilles de variétés sélectionnées contre *Candida albicans* ATCC 90026, *Pyrenophora teres F* et *Ptytophtora nicotina* à été étudié. Les résultats montrent que l'extrait des feuilles de Ghars présente une activité remarquable par rapport l'autres extraits, la souche la plus sensible est *Ptytophtora nicotina* et l'activité d'extrait de

Hamraya plus faible que l'extrait de Deglet Nour. Aussi, que l'antibiotique influe sur les souches des champignons sauf le cas de *Candida albicans* ATCC 90026. Un résumé complet de l'ensemble des résultats des analyses antifongiques est repris dans le tableau 22.

**Tableau 21.** Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété de Hamraya.

Champignons	Diamètre de la zone d'inhibition			
	Ghars	Deglet Nour	Hamraya	polymyxine B
<i>Candida albicans</i> ATCC 90026	15 ± 1	15 ± 1	12 ± 1	na
<i>Pyrenophora teres</i> F	17 ± 1	16 ± 1	12 ± 1	11 ± 1
<i>Ptytophthora nicotina</i>	20 ± 2	17 ± 2	15 ± 1	12 ± 1

### III.7. Evaluation des propriétés antidiabétique (inhibition des enzymes $\alpha$ amylase et $\alpha$ glucosidase) des extraits

#### III.7.1. Le diabète - Généralités

Le diabète est une pathologie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique avec des perturbations du métabolisme glucidique, lipidique et protidique. Cette maladie est associée à l'incapacité de l'organisme à produire et/ou utiliser correctement l'insuline.

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. La principale fonction de l'insuline est de maintenir la concentration sanguine du glucose à des valeurs normales. Dans ce sens, elle augmente le transport du glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes en induisant la translocation du transporteur de glucose, GLUT4, vers la membrane. Au niveau du foie et du muscle strié, l'insuline inhibe la glycogénolyse et la gluconéogenèse, tout en stimulant la glycogénèse.

#### III.7.2 Classification du diabète

Le diabète peut être classifié en trois types: Diabète de type 1, Diabète de type 2 et le diabète gestationnel.

- Le diabète de type 1 (dépendant de l'insuline) est appelé aussi diabète juvénile parce qu'il survient avant l'âge de 30 ans. Il représente environ 10% de tous les cas de diabète. Le diabète de type 1 se caractérise par une production insuffisante d'insuline due à une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  pancréatiques. En absence d'insuline, le glucose ne peut pas entrer dans la cellule pour produire de l'énergie ou pour être stocké

sous forme de glycogène et il s'accumulera excessivement dans le sang. Les patients atteints dépendent de l'insuline exogène pour prévenir l'acidocétose et la mort. A l'heure actuelle, le diabète de type I peut être traité par la prise d'insuline, la transplantation du pancréas et par la greffe d'îlots de Langerhans. Le traitement traditionnel du diabète de type 1 est l'administration d'insuline. Cependant, en raison de facteurs tels que cout, restrictions touchant le mode de vie et complications mettant la vie en danger, un traitement plus efficace doit être mis au point. La transplantation pancréatique et, plus récemment, la transplantation d'îlots de Langerhans purifiés, devraient être considérée comme des alternatives thérapeutiques acceptables à l'insulinothérapie continue des patients diabétiques de type 1 [194].

Dans l'avenir, les cellules souches adultes ou cellules souches embryonnaires (CSE) seront une source prometteuse d'îlots de Langerhans pour la transplantation [194,195]. De nouvelles recherches sur la transplantation de cellules souches de la moelle osseuse ont permis d'établir que les cellules souches adultes peuvent déclencher le processus de régénération des tissus pancréatiques, ce qui a pour effet de restaurer la production normale d'insuline et de faire rétrocéder les symptômes du diabète [196]. L'utilisation de cellules souches adultes aurait l'avantage que les propres cellules du patient peuvent être utilisées, contournant ainsi le rejet immunitaire. La possibilité que de nouvelles cellules  $\beta$  puissent être produites à partir de cellules souches adultes permettrait d'éviter les problèmes éthiques potentiels associés aux CSE [197].

- Le diabète de type 2 (indépendant de l'insuline) survient généralement après l'âge de 30 ans mais l'incidence est actuellement en forte croissance chez les plus jeunes, spécialement dans les populations autochtones. Cette forme de diabète représente 90 à 95% de tous les cas de diabète. Le diabète de type 2 est caractérisé par une résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques associées à une prédisposition génétique.
- Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose qui se manifeste pour la première fois ou que l'on dépiste pendant la grossesse. Cette forme de diabète est développée par environ 4% des femmes enceintes au cours du deuxième ou du troisième trimestre. La présente étude vise principalement le diabète de type 2 qui est lié à l'inhibition enzymatique  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase, il est discuté en détail dans la section suivante.

### III.7.2. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase

L'activité antidiabétique des extraits de feuilles de trois variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya de *Phoenix dactylifera* L par rapport  $\alpha$ -amylase est réalisée par la méthode décrite par Kunyanaga [197]. Un volume de 100  $\mu$ l de solution tampon du phosphate de sodium à une concentration de 0.02 mol / l (pH = 6.9) et mélangé avec 100  $\mu$ l d'extrait des feuilles (différentes concentrations). Puis ajouté à 100  $\mu$ l d'enzyme  $\alpha$ -amylase (1 ml libère 1.9  $\mu$ g de maltose). Le mélange résultant est ajouté à 100  $\mu$ l de l'amidon (1 g/100 ml d'eau distillée) avant d'incubé à 25 °C pendant 30 min. la réaction précédente est arrêtée par 1 ml de l'acide dinitrosalicylique. Le mélange est incubé dans un bain marie d'eau pendant 5 min et on laisse reposer et refroidir à température ambiante avant l'addition de 5.4 ml d'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 540 nm et comparée avec le témoin (solution tampon sans extrait) par l'utilisation de UV-Visible. Le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase par de l'extrait est calculée en utilisant l'équation suivante.

% Inhibition =  $[(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ . La valeur  $CI_{50}$  est la concentration ( $\mu$ g / ml) d'extrait qui provoque une perte des radicaux superoxydes calculée par l'analyse de régression linéaire à 50%.

### III.7.3. Effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-glucosidase

L'inhibition  $\alpha$ -glucosidase est effectuée selon la méthode de Suresh [198]. En utilisant  $p$ -nitrophényl- $\alpha$ -D-glocopyranoside ( $p$ NPG) comme abstraite, qui est hydrolysé par  $\alpha$ -glucosidase pour libérer  $p$ -nitrophényl (un agent coloré qui peut être surveillée à 405 nm). Un volume de 200  $\mu$ l de l'extrait des feuilles pour chaque variété est ajouté à 700  $\mu$ l de solution de  $\alpha$ -glucosidase (1 unité / ml) préparée dans 0.1 mole / l de phosphate tampon (pH = 6.8). Le mélange résultant agité au vortex et incubé à 37 °C pendant 6 minutes, suivi par l'addition de 1 ml de  $p$ NPG (4 mmol / l). L'absorbance est calculée à 405 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible. Même mélange sans extrait des feuilles utilisé comme témoin. Le pourcentage de la capacité d'inhibition de  $\alpha$ -glucosidase des extraits des est calculé à partir de l'équation ci-dessus.

### III.7.4. Résultats d'effet des extraits sur l'inhibition de Alpha-amylase et Alpha-glucosidase

La capacité des extraits des feuilles pour inhiber l'activité  $\alpha$  -amylase et  $\alpha$  -glucosidase *in vitro* a été étudiée et les résultats sont illustrés sur la figure 67 et 68 . Le résultat a montré que les extraits de feuilles de la variété Ghars, Deglet et Hamraya inhibent l'enzymes  $\alpha$  -amylase et  $\alpha$  -glucosidase de façon dose-dépendante ( 0 à 0.6 mg / ml). Cependant, comme

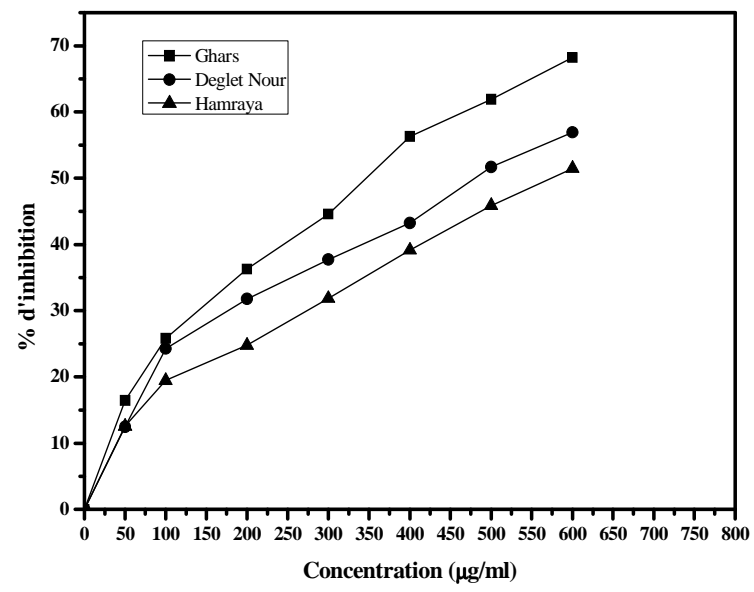


révélé par la  $IC_{50}$  ( concentration de l'extrait provoquant 50% d' inhibition enzymatique ) des valeurs successivement  $IC_{50}= 379.44 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{50}= 483.74 \mu\text{g/ml}$  et  $C_{50}= 553.94 \mu\text{g/ml}$  d'extrait de Ghars; Deglet Nour et Hamraya avait une ( $P < 0,05$  ). L'activité d'inhibition significativement plus élevée de  $\alpha$  -glucosidase pour les trois extraits ( Ghars  $IC_{50}= 53.28 \mu\text{g/ml}$ , Deglet Nour  $IC_{50}= 63.09 \mu\text{g/ml}$  et  $IC_{50}= 73.33 \mu\text{g/ml}$ ). Cette diminution significative ( $P < 0,05$  ).

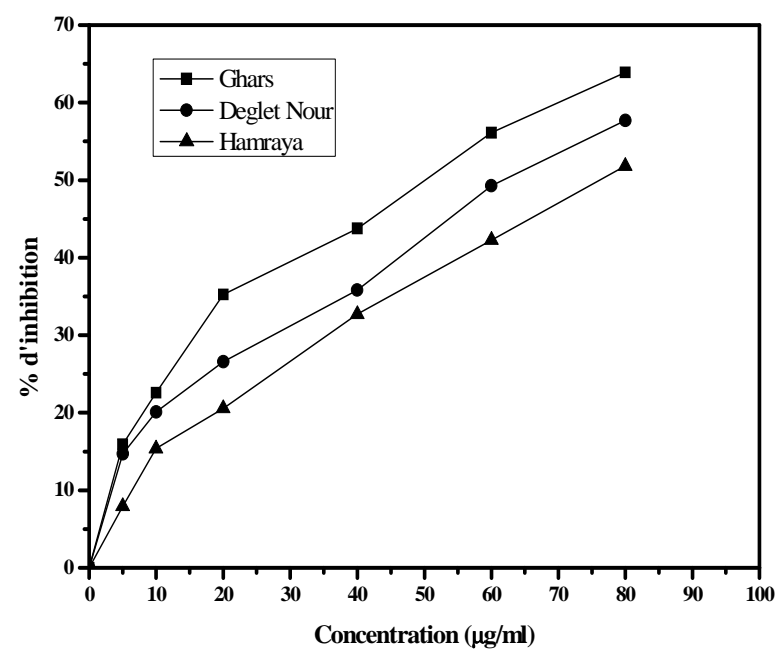
Les résultats d'inhibition enzymatique (  $\alpha$  -amylase et l'  $\alpha$  -glucosidase ) des essais d'inhibition ont montré que les extraits de la non transformés et blanchies *Phoenix dactylifera* L sont de puissants inhibiteurs de  $\alpha$  -amylase et  $\alpha$  -glucosidase , mais des inhibiteurs faibles de l'  $\alpha$  -amylase comme représenté sur le figure 98. Ce n'est cependant en accord avec les rapports qui ont montré que les composés phytochimiques des plantes sont des inhibiteurs faibles de  $\alpha$  -amylase et de puissants inhibiteurs de l'activité  $\alpha$  -glucosidase [202]. Une propriété qui confère un avantage sur les drogues synthétiques comme l'acarbose, l'utilisation par les diabétiques dans la gestion de la glycémie postprandiale, qui inhibent fortement  $\alpha$  -amylase. Inhibition plus forte de l'activité  $\alpha$  -glucosidase et une inhibition modérée de l'activité d'  $\alpha$  -amylase des extraits végétaux pourraient aborder l'inconvénient majeur de ce moment utilisé  $\alpha$  -glucosidase et  $\alpha$  -amylase médicaments inhibiteurs des effets secondaires tels que la distension abdominale , la flatulence, météorisme et, éventuellement, de la diarrhée [204]. Il a été suggéré que de tels effets indésirables peuvent être causés par l' inhibition excessive du pancréas  $\alpha$  -amylase obtenue dans la fermentation bactérienne anormal des hydrates de carbone non digérés dans le côlon [203]. Par conséquent, cette étude contrefort l'affirmation selon laquelle les inhibiteurs naturels de plantes ont un effet inhibiteur doux sur l'activité  $\alpha$  -amylase , mais l'activité inhibitrice de l'  $\alpha$  -glucosidase solide et pourrait être utilisé comme traitement efficace pour la gestion de l'hyperglycémie postprandiale.

Présente étude a également constaté antidiabétique effet des extraits de *Phoenix dactylifera* L actif contiennent des composés phénoliques et flavonoïdes haute. Plusieurs autres classes de produits chimiques ont également été trouvés dans notre extraits qui sont stéroïdes riches, les dérivés de l'acide caféique [204,205]. Parmi ces groupes phytochimiques de l'acide caféique et de composé phénolique ont été rapportés pour augmenter l'absorption du glucose. avec des effets secondaires minimales d'accord avec la conclusion sur les composés phénoliques de *Phoenix dactylifera* L.

qui ont été recommandées comme un régime de choix pour la gestion du diabète de type 2



**Figure 67.** L'inhibition de  $\alpha$ -amylase (activité antidiabétique) des extraits des feuilles des variétés de *Phoenix dactylifera* L.



**Figure 68.** L'inhibition de  $\alpha$ -glucosidase (activité antidiabétique) des extraits des feuilles des variétés de *Phoenix dactylifera* L.

### III.8. Evaluation des propriétés antimutagène des extraits

Dès 1983, Ames a rapporté le pouvoir antimutagène de composés naturels capables de réduire ou d'inhiber l'activité mutagène de certaines substances. Ainsi, depuis plusieurs années, des recherches ont été menées dans le secteur de l'antimutagènes dans le but de mettre en évidence des facteurs protecteurs contre les conséquences des mutations, et cela particulièrement dans le domaine du vieillissement cellulaire et du cancer. Les premiers travaux ont montré l'intérêt de la connaissance des mécanismes d'action des substances antimutagènes, afin de réaliser une prévention efficace et sans risque toxique. C'est pourquoi ont différencié ces substances en composés des mutagènes, agissant directement sur les substances mutagènes ou leurs précurseurs, et les composés bio-antimutagènes, agissant sur les mécanismes de mutagenèse ou sur les mécanismes de régulation et de réparation de l'ADN et aboutissant à une décroissance de la fréquence des mutations. L'objet de cette recherche est l'étude des propriétés antimutagènes de l'alphahédérine vis-à-vis de deux composés mutagènes de référence, la doxorubicine et le carbendazime, qui sont, respectivement, des références clastogénique et aneugénique. Nous essaierons tout particulièrement de déterminer le mode d'action de l'alphahédérine. C'est une saponine tri terpénique, extraite des feuilles de lierre grim pant. En raison de leurs nombreuses propriétés thérapeutiques, un intérêt particulier a été porté à l'étude de l'activité antimutagénique de ces saponines . Ainsi, déjà démontré les propriétés antimutagéniques de l'alpha-, bêta- et delta hédérine et de leurs sels sodiques. En particulier, l'activité antimutagène de l'alphahédérine vis-à-vis du benzo(a)pyrène retrouvé dans les urines de fumeurs, en utilisant le test d'Ames, est apparue remarquable.

#### III.8.1. Le test antimutagénique

Le test antimutagène est un essai pour évaluer l'effet d'un composé, de comprendre le mécanisme d'action des composés potentiellement toxiques [194] . Le dosage a été effectué en utilisant une procédure de preincubation selon la méthode décrite par Maron et Ames, (1983) en présence et en absence de diverses concentrations de chaque extrait. Utilisé pour tester l'activité antimutagène des extraits des feuilles de variétés sélectionnées sur les souches TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium* avec le benzo (a )pyrène . L'activation métabolique est fourni par le surnageant post- mitochondries . Un volume 0.5 ml de S9 obtenu à partir de phénobarbital de sodium et de  $\beta$  - naphtoflavone. Les colonies nombre de réversion formés dans chaque plaque a été compté . Les études de toxicité pour chaque souches en utilisant différentes concentrations des extraits des feuilles ont

également été menées . La plaque a été examinée au microscope pour l'amincissement ou l'absence de l'arrière-plan pelouse / présence de microcolonies , qui sont considérées comme des indicateurs de toxicité induits dans chaque expérience. Le pourcentage d'inhibition de la mutagénécité a été calculée par rapport à ceux dans le groupe de contrôle avec le mutagène par la formulation suivante : % D'inhibition = [ 1 - ( ( nombre de révertants sur les plaques - nombre de révertants spontanés ) / ( nombre de révertants sur le contrôle positif - nombre de révertants spontanés ) ] . X 100. Les échantillons ont été testés en triplicata pour chaque expérience indépendante.

### III.8.2. Résultats d'analyses d'activité antimutagène des extraits

Tableau 23 et les figure 69, 70 et 71 montrent les résultats des tests d'activité antimutagène de l'extrait de feuille des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya vis à vis benzo (a) pyrène avec activation métabolique des deux souches. L'activité antimutagène des échantillons est évaluée à différentes concentrations (1mg/ml à 8 mg / ml). Le mutagène utilisé est benzo (a) pyrène dans *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100, en utilisant le test d'Ames de preincubation. Ce mutagène est réduit par l'extrait des feuilles des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya de  $337 \pm 37$ ,  $379 \pm 41$  et  $395 \pm 38$  révertants His + respectivement pour 1mg/ml pour 5 µg de benzo (a) pyrène a été utilisé, on obtient le même effet avec 2,3,4,5,6,7 et 8 mg / ml d'extrait de feuilles de trois variétés sélectionnées.

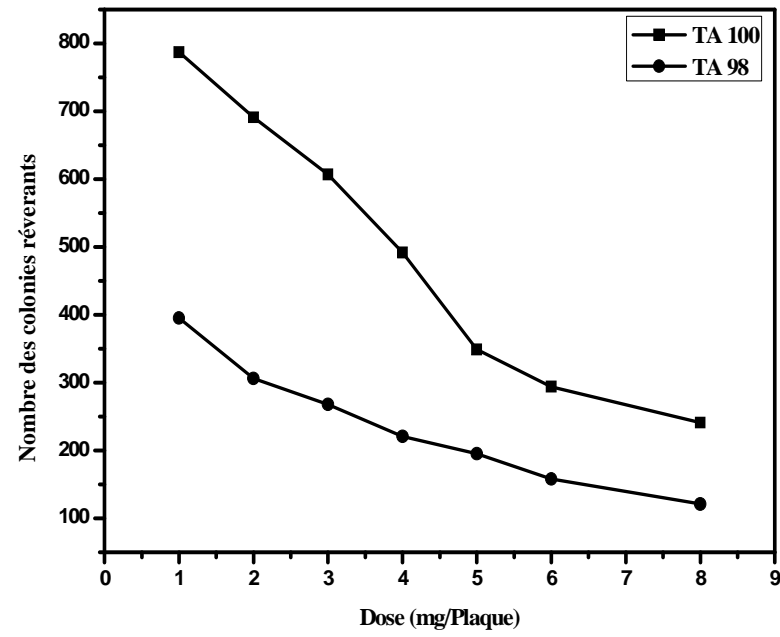
**Tableau 22.** Effet des extraits de feuille des variétés sélectionnées de *Phoenix dactylifera* L sur Benzo (a) pyrène de mutagène induite

Groupe de traitement	Dose/plaque	Mélange S9 (10%)	Nombre de <i>his+</i> revertant colonies/plaque	
			TA 98	TA 100
Spontanés revertants		-	45±4	207±24
Spontaneous revertants		+	49±5	197±13
Extrait de Ghars	9 mg	-	43±5	205±14
Extrait	9 mg	+	46±4	195±12
Extrait de Deglet Nour	9 mg	-	46±5	199±13
Extrait de Deglet Nour	9 mg	+	42±3	204±14
Extrait de Hamraya	9 mg	-	44±5	207±17
Extrait de Hamraya	9 mg	+	46±4	210±23
B(a)p+ Extrait de Ghars	0.5 mg	+	337±37	825±94
B(a)p+ Extrait Deglet Nour	0.5 mg	+	379±41	892±87

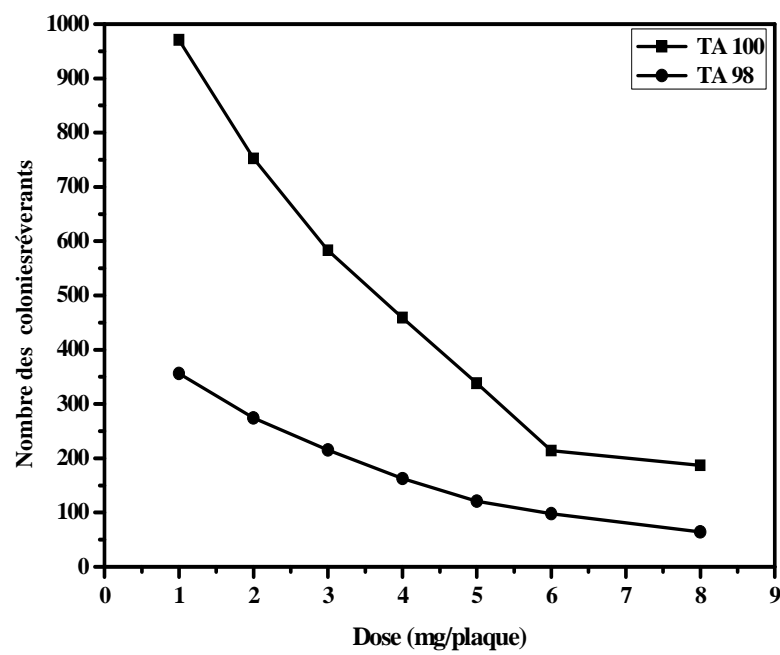
B(a)p+ Extrait de Hamraya	0.5 mg	+	395±38	946±97
---------------------------	--------	---	--------	--------

Le valeur sont des moyennes ( $\pm$  SEM) d'expériences effectuées en triple. -, S9 pas ajouté. +, S9 ajouté. B (a) P, le benzo (a) pyrène.

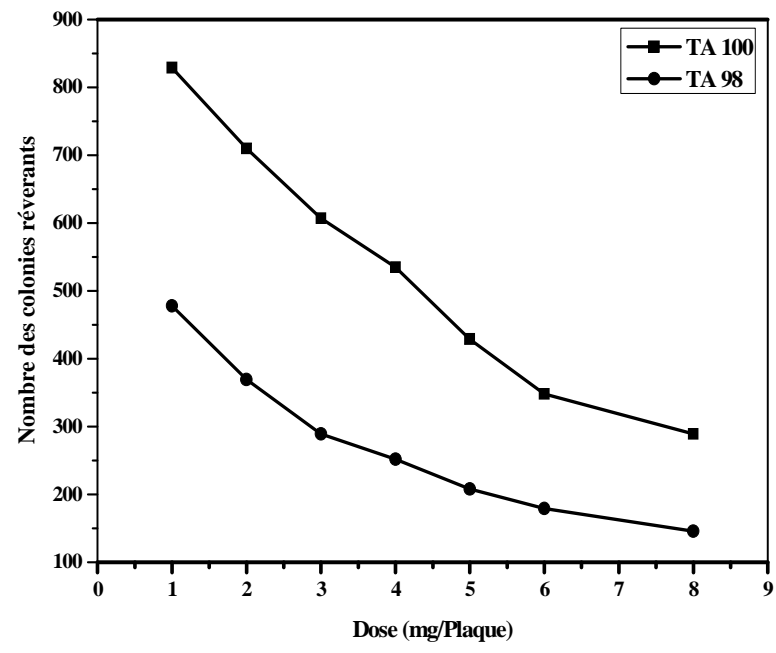
Le mécanisme possible de la protection puissante de tous les extraits testés contre mutagènes directs pourrait s'expliquer par la induction du système et / ou de l'ADN défense oxydatif enzymes de réparation , qui sont nécessaires pour se protéger contre mutations oxydatives comme . L'activité antimutagène / anticancéreux de plantes peut être en raison de l' interaction des composés avec la cible Tissus de l'ADN , ce qui , à son tour , bloque le site (s) d'ADN à attaque électropholique par fragments mutagènes réactifs . dans notre cas, nous spéculer que l'effet protecteur d'extrait contre les mutagènes testés est probablement exercées par trois manières différentes : d'une part , les extraits de plantes peuvent adsorber l' agent mutagène d'une manière similaire à l'agent cancérigène qui a été associée avec le produit chimique composant , d'autre part , des extraits pouvaient induire Glicosylase enzymes ADN qui sont capables de réparer alkylation des bases d'ADN, et finalement la capacité réductrice des échantillons évalués. Dans cette étude que les extraits est donnent des électrons aux radicaux libres , ce qui rend la radicaux stables et non réactifs. Extraits au méthanol , aqueuses et TOF réduit le mutagénéicité provoquée par le mutagène indirect B (a ) P, une génotoxine métaboliquement actif , en utilisant la S. typhimurium TA 98 souche , d'une manière dépendante de la dose (Tableau 23) . Nos résultats a été montré que l'extrait des feuilles de trois variétés considérés comme un inhibiteur plus puissant de mutations. Cet effet pourrait être en raison de la formation d'un complexe entre le mutagène l'agent ( 2 -AA) et de composants d'extrait , induire la mort cellulaire à une concentration élevée. Par conséquent , une diminution de l'extrait concentration n'influent pas sur les bactéries



**Figure 69.** Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Ghars pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.



**Figure 70.** Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Deglet Nour pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM



**Figure 71.** Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Hamraya pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM

# Conclusion générale



## CONCLUSION GENERALE

Ce travail avait pour but de caractériser la composition phytochimique des extraits des feuilles de trois variétés d'espèce *Phoenix dactylifera* L (Ghars, Deglet Nour, Hamraya) et d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante, biologique et pharmacologique des ces extraits en question.

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants,

l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bio-actifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative de ces extraits, les évaluations du capacité antioxydant, propriétés biologique et l'effets pharmacologiques des extraits des feuilles de ces extraits en question ont montrés:

En ce qui concerne la caractérisation et la quantification des polyphénols, les flavonoïdes, les flavonols, les anthocyanines, stéroïdes, saponines et les tannins de nos extraits, puis l'évaluation de leur potentiel antioxydant. Nos résultats montrent que la plus part des classes de composés phénoliques existent en concentration considérable et que la variété Ghars plus riche par rapport aux autre extraits.

L'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L a été évaluée et comparée en utilisant les méthodes suivantes :  $\beta$ -carotène, la méthode de détermination de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'activité antioxydante totale, la méthode du pouvoir réducteur, l'oxydation du radical superoxyde, pouvoir antioxydante du fer (FRAP test), oxydation de radical hydroxyle et ABTS test (2,20-azinobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate]). On a pu calculer la concentration inhibitrice à 50%, ainsi on a pu conclure que l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L diminue dans l'ordre suivant : la variété Ghars > la variété Deglet Nour > la variété Hamraya pour toutes les méthodes citées ci dessus. On a remarqué que l'activité antioxydante des trois variétés dépendait de leur concentration. Dans l'étude

comparative nous avons trouvé que l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L pour les trois variétés sélectionnées sont puissantes vis-à-vis les polyphénols standards synthétiques (BHT, BHA), et vis-à-vis des polyphénols naturels (Quercetin, Acide ascorbique, ).

L'évaluation des propriétés antioxydantes révèle que toutes ces variétés manifestent une forte capacité et plus particulièrement les extraits des feuilles de la variété Ghars. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques a été établie.

L'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de trois variétés sélectionnés de *Phoenix dactylifera* L a été évaluée *in vitro* contre onze espèces bactériennes pathogènes, deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC, *Bacillus cereus* ATCC 14579) et neuf bactéries à Gram négatif (*Escherchia coli* ATCC 35218, *Salmonella arizona* DM 35605, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* HM 627626, *Pseudomonas aeruginosa* HM 627575, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Pseudomonas aeruginosa* HM 627579, *Pseudomonas putida* HM 6227611, *Agrobacterium tumefaciens* B6 C58). Pour l'activité antifongique trois champignons a été sélectionné *Phytophthora nicotina*, *Pyrenophora teres* F, *Candida albicans* ATCC 90026. On trouve que toute les espèces bactériennes présentent une sensibilités vis-à-vis l'extraits des feuilles de trois variétés sélectionnés de *Phoenix dactylifera* L sauf un cas exceptionnel de *Agrobacterium tumefaciens* B6 C58 pour une concentration de 50 mg/ml. Dans cette étude l'extrait des feuilles de Ghars possède les activités antimicrobiennes les plus fort contre la majorité des bactéries en comparaison avec les autres extraits à la même concentration. Nous avons trouvé que l'activité antibactérienne arrive jusqu'a 19.8 mm pour le diamètre de disque. L'extrait de trois variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya s'est montrée plus active que l'antibiotique utilisé (polymyxine B).

L'activité antifongique des extraits des feuilles de trois variétés sélectionnés de *Phoenix dactylifera* L a été évalué, comme le cas d'activité antibactériennes; l'extrait de Ghars présente l'effet antifongique le plus élevé contre les trois champignons et pour atteindre: la variété Ghars > la variété Deglet Nour puis la variété Hamraya. On a trouvé aussi que le champignon le plus sensible contre les trois extraits est *Ptytophthora nicotina*.

L'effet pharmacologique de nos extraits des feuilles de trois variétés sélectionnés de *Phoenix dactylifera* L a été évaluée *in vitro* et mis en évidence par une évaluation de leurs

propriétés anti-inflammatoires, antidiabétique et antimutagène, montre que ces extraits, et plus particulièrement les feuilles de Ghars présentent des propriétés anti-inflammatoires, antidiabétique et antimutagène intéressantes. Une corrélation positive entre l'activité anti-inflammatoire et les composés polyphénoliques a été trouvé.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie. Pour la suite, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des extraits de trois variétés sélectionnés (et d'autre). Aussi, serait très souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des dérivés polyphénoliques, d'évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoires, antidiabétique et antimutagène de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits des feuilles et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés phénoliques, ce qui fera l'objet d'une autre étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Boubaker J , Sghaier MB , Skandrani I, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Isorhamnetin 3-O-robinobioside from *Nitraria retusa* leaves enhance antioxidant and antigenotoxic activity in human chronic myelogenous leukemia cell line K562. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012; 12 art 135.
- [2] Newmann D. and Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 461-477.
- [3] Oyedemi S O, Afolayan A J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific journal of tropical Medicine* 2011; 4: 952-958.
- [4] Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamzc V, Amvam Zollo PH. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmaceutical Mediterranean traditional african* 2004; 13: 11-20.
- [5] Morel S. Thèse de doctorat: Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Université d'Angers, N° 1031; 2011.
- [6] Verpoorte R, Cotin A, , Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 2002; 1 (1):13-25
- [7] Kilani-Jaziri S, Bhourri W, Skandrani I, Limem I, Chekir-Ghedira L, Ghedira K. Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. *South African Journal of Botany* 2011; 77:767-776.
- [8] Yangthong M, Hutadilok-Towatana N, Phromkunthong W. Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrition* 2009; 64:218–223.
- [9] Oyedemi S O, Afolayan A J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011;4: 952-958.
- [10] Karmakar I, Dolai N, Saha P, Sarkar N, Bala A , Kanti P. Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine* 2011;11:221–228

## Liste des figures

Numéro	Intitulé	Numéro de page
1	<i>Phoenix Dactylifera</i> L	6
2	Classification de l'espèce <i>Phoenix dactylifera</i> L	11
3	Figuration schématique du palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera</i> l)	14
4	Jeune feuille d'un plant issu de semis de graine. B: une palme (feuille) d'un palmier dattier adulte (d'après Sedra, 2003).	15
5	Spathes, inflorescences et fleurs du palmier dattier	19
6	Morphologie et anatomie du fruit et de la graine du palmier dattier	20
7	Répartition géographique du <i>Phoenix dactylifera</i> L et principaux pays producteurs dans le monde	
8	la variété sélectionnée de <i>Phoenix dactylifera</i> L Deglet Nour	25
9	la variété sélectionnée de <i>Phoenix dactylifera</i> L Ghars	26
10	la variété sélectionnée de <i>Phoenix dactylifera</i> L Hamraya	27
11	Classification des polyphénols	40
12	Formes mésomère du phenol	45
13	Effet hydrophobe	47
14	Produits d'oxydation de la catéchine par voie de dimérisation	54
15	Saponine de Soja	68
16	Le Soxhlet	71
17	Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux	79
18	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux	80
19	Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols totaux	81
20	Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (510 nm)	82
21	Courbe d'étalonnage pour le dosage des anthocyanines totaux (700 nm)	82
22	Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés	38
23	Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide ascorbique	84
24	La teneur des polyphénols dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	85
25	teneur des flavonoïdes dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	85
26	La teneur des flavonols dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	86
27	La teneur des anthocyanines dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	87
28	La teneur des tanins condensés dans les extraits variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	88
29	La teneur d'acide ascorbique dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	88
30	Le pourcentage des saponines dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	89

31	pourcentage des stéroïdes dans les extraits des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	89
32	Chromatogramme d'acide ascorbique (solution standards)	93
33	Chromatogramme d'acide gallique (solution standards)	93
34	Chromatogramme d'acide chloregénique (solution standards)	94
35	Chromatogramme d'acide caféique (solution standards)	94
36	Chromatogramme de vanilline (solution standards)	95
37	Chromatogramme de la rutine (solution standards)	95
38	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	96
39	Courbe d'étalonnage d'acide gallique	96
40	Courbe d'étalonnage d'acide chloregénique	97
41	Courbe d'étalonnage d'acide caféique	97
42	Courbe d'étalonnage de vanilline	98
43	Courbe d'étalonnage de rutine	98
44	profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Ghars.	100
45	Profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Deglet Nour	102
46	Profil chromatographique HPLC d'extrait de la variété Hamraya	103
47	Effet d'extrait des feuilles de la variété Ghars sur le radical DPPH	104
48	Effet d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour sur le radical DPPH	105
49	Effet d'extrait des feuilles de la variété Hamraya sur le radical DPPH	105
50	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour pouvoir antioxydant total	106
51	Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Ghars	106
52	Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour	107
53	Le pouvoir réducteur d'extrait des feuilles de la variété Hamraya	108
54	Effet d'extrait des feuilles de la variété Ghars sur la radical $\beta$ -carotène	108
55	Effet d'extrait des feuilles de la variété Deglet Nour sur la radical $\beta$ -carotène	109
56	Effet d'extrait des feuilles de la variété Hamraya sur la radical $\beta$ -carotène	109
57	Courbe d'étalonnage de $\text{FeSO}_4$ de test FRAP	110
58	Activité de réduction ferrique de test FRAP des extraits des feuilles de Ghars, Deglet Nour, Hamraya et le standards quercétine	112
59	Effet des extraits des feuilles des variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical ABTS	114
60	Effet des extraits des feuilles des variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical hydroxyle	115
61	Effet des extraits des feuilles des variété Ghars, Deglet Nour et Hamraya sur l'inhibition de radical $\text{O}_2^-$	117
62	Evolution de l'activité anti- inflammatoire des extraits des feuilles de variétés sélectionnées et BHT en fonction de concentration	119
63	L'inhibition de $\alpha$ -amylase (activité antidiabétique) des extraits des feuilles des variétés de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	122
64	L'inhibition de $\alpha$ -glucosidase (activité antidiabétique) des extraits des feuilles des variétés de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	125
65	Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Ghars pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SEM.	132

<b>66</b>	Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Deglet Nour pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SEM	137
<b>67</b>	Réponse antimutagène d'extrait de feuille de la variété Hamraya pour le test d'Ames. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ SEM	138

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Numéro de page
1	Stades d'évolution du fruit et ses appellations en langue locale	17
2	Répartition géographique et nombre de palmiers dattiers en Algérie	24
3	Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région en %	28
4	Modification de pH de Deglet Nour au cours de son développement	29
5	Teneur en sucres de quelques variétés de dattes algériennes de la région de Zibans, en % de matière sèche	30
6	Composition de 100 g de dattes en éléments minéraux	31
7	Composition vitaminique de la pulpe de datte	31
8	Teneurs en acides aminés essentiels des dattes et les besoins humains	33
9	Composition en acides gras de la datte Deglet-Nour, en % de matière grasse	34
10	Composition biochimique des noyaux des dattes	35
11	Rendement d'extraction des composés phénoliques dans MeOH/Eau (80%/20%)	76
12	Composition phytochimique des extraits de feuilles Phoenix dactylifera L des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya	81
13	Propriétés de quelques solvants utiles en chromatographie phase liquide	87
14	Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons	92
15	Concentration de polyphénols des extraits de feuilles Phoenix dactylifera L des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya	94
16	Concentration de Alpha-tocophérol dans les extraits des variétés Ghars, Deglet Nour et Hamraya	97
17	Activité de piégeage de radical DPPH (IC <sub>50</sub> en µg / ml), le pouvoir	103



	réducteur (IC <sub>50</sub> en µg g / ml) et de l'activité antioxydante totale (mg GAE / g DW) des extraits des variétés de <i>Phoenix dactylifera</i> L et les standards BHT , BHA et l'acide chloregénique	
<b>18</b>	Activité de β-carotène d'extraits des feuilles <i>Phoenix dactylifera</i> L et les standards (BHA et BHT). L'activité antioxydante exprimée sous forme de % d'inhibition IC <sub>50</sub> (µg / ml)	106
<b>19</b>	Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété Ghars	112
<b>20</b>	Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété Deglet Nour	113
<b>21</b>	Activité antibactérienne des extraits des feuilles de la variété Hamraya.	124
<b>22</b>	Activité antifongique des extraits des feuilles de la variétés de <i>Phoenix dactylifera</i> L	128
<b>23</b>	Effet des extraits de feuille des variétés sélectionnées de <i>Phoenix dactylifera</i> L sur Benzo (a) pyrène de mutagène induite	134