

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie et Agro écologie

**THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES
AGRONOMIQUES**

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

**ÉTUDE DE LA BIODISPONIBILITÉ DES POLYPHENOLS DE
DATTES ALGÉRIENNES (*Phoenix dactylifera L.*) AU COURS
DES DIFFÉRENTS STADES DE MATURITÉ ET LEUR
POUVOIR ANTIOXYDANT**

Par

Selma SILABDI

Devant le jury composé de :

Dr. RAMDANE Sid Ali	Université Blida 1	Président
Dr. KHALI Mustapha	CTIAA Boumerdes	Promoteur
Pr. BENBOUZA Halima	Université de Batna	Examinatrice
Pr. AOUCHE Adel	ESSAIA El Harrach	Examineur
Pr. DOUMANDJI Amel	Université Blida 1	Examinatrice
Dr. HADJADJ Naima	Université Blida 1	Examinatrice

Blida, Juillet 2023

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie et Agro écologie

**THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES
AGRONOMIQUES**

Spécialité : Nutrition et Transformation des Aliments

**ÉTUDE DE LA BIODISPONIBILITÉ DES POLYPHENOLS DE
DATTES ALGÉRIENNES (*Phoenix dactylifera L.*) AU COURS
DES DIFFÉRENTS STADES DE MATURITÉ ET LEUR
POUVOIR ANTIOXYDANT**

Par

Selma SILABDI

Devant le jury composé de :

Dr. RAMDANE Sid Ali	Université Blida 1	Président
Dr. KHALI Mustapha	CTIAA Boumerdes	Promoteur
Pr. BENBOUZA Halima	Université de Batna	Examinatrice
Pr. AOUCHE Adel	ESSAIA El Harrach	Examineur
Pr. DOUMANDJI Amel	Université Blida 1	Examinatrice
Dr. HADJADJ Naima	Université Blida 1	Examinatrice

Blida, Juillet 2023

Avant-Propos

Cette thèse vise à mieux comprendre la bioactivité des molécules antioxydantes extraites des dattes (*Phoenix dactylifera L.*) et le potentiel hypocholestérolémiant qu'elles possèdent, et constitue la suite de travaux sur ces mêmes molécules entrepris dans le cadre de notre mémoire de magistère. Ce document rassemble l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche s'échelonnant sur cinq années.

Le but général du projet de recherche faisant l'objet de cette thèse était de suivre la maturation phénolique et d'évaluer l'activité biologique des composés phénoliques que contiennent trois variétés de dattes algérienne (*Phoenix dactylifera L.*), et ce, grâce à des modèles *in vitro* et cliniques. Plus spécifiquement, ce projet visait à déterminer, après caractérisation au cours des différents stades de maturation, le pouvoir hypocholestérolémiant et antioxydant des constituants polyphénoliques de la baie de datte.

RÉSUMÉ

Les fruits du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) sont connus comme une riche source de nutriments, de fibres et de molécules bioactives. La datte et lors de sa formation, passe par des stades de maturation qui influencent directement la nature et la teneur en composés accumulés dans le fruit mûr. Le but de cette étude était le suivi de la maturation phénolique et l'exploration du potentiel antihyperlipidémique de trois variétés de dattes algériennes (*Phoenix dactylifera* L.) chez le rat et l'amélioration du stress oxydatif sur des cellules du carcinome hépatocellulaire humain (HepG2). Le profil phénolique des extraits de dattes a été déterminé par HPLC-DAD et le pouvoir antioxydant a été étudié en utilisant les tests DPPH, FRAP et TBARS. Une corrélation positive entre le TPT et l'AOA a été remarquée ($p < 0,05$). Toutes les variétés se sont avérées contenir de l'acide férulique, de l'acide gallique et de la quercétine. La présence d'acides isoféruliques, p-coumariques, cinnamiques et hydroxycinnamiques a été fortement suggérée. Nos résultats ont mis en évidence pour ces échantillons un potentiel antioxydant considérable qui a été confirmé sur les cellules HepG2 en réduisant le niveau de TBARS (DB : -70%, DN : -86%, GH : -80%) avec une génération significative de $\text{NO}\cdot$ ($0,32 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ protéine pour la variété DB) dans le milieu cellulaire. Le profilage des lipides sanguins, établi sur 21 jours de traitement, avait montré que les extraits phénoliques de dattes possédaient un effet hypolipémiant significatif chez le rat en diminuant les taux du Ch.T (DB : -51%, GH : -31% et DN : -30%), TG (DN : -61%, DB : -54% et GH : -32%) et LDL-cholestérol tout en augmentant le taux de HDL-cholestérol par rapport au témoin.

Mots clés : dattes ; composés phénoliques; stades de maturation ; activité antioxydante ; peroxydation lipidique ; hypercholestérolémie.

SUMMARY

Dates and during its formation, goes through stages of maturity which directly influence the nature and the content of compounds accumulated in the ripe fruit. The palm date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) are known as a rich source of nutrients, fibers and bioactive molecules. The aim of this study was to monitor phenolic maturation and explore the antihyperlipidemic potential of three varieties of algerian date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) in rats and the improvement of oxidative stress on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2). Phenolic profile of methanolic date extracts has been determined by HPLC-DAD and antioxidant power was investigated by using DPPH, FRAP and TBARS assays. Positive correlation between TPC and antioxidant activity was noticed ($p < 0,05$). All varieties were found to contain ferulic acid, gallic acid and quercetin. Presence of isoferulic, p-coumaric, cinnamic and hydroxycinnamic acids was strongly suggested. Our results highlighted for these samples a considerable antioxidant potential that was confirmed on HepG2 cells by reducing TBARS level (-70% for DB, -86% for DN, -80% for GH) and a significant generation of NO• in cell medium. Blood lipid profiling, drawn on 21 days of treatment, had shown that date polyphenolic extracts produced significant hypolipidemic effect in rats by decreasing TC (-51% for DB, -31% for GH and -30% for DN), TG (-61% for DN, -54% for DB and -32% for GH) and LDL-Cholesterol, while increasing HDL-Cholesterol level compared to control, indicating strong cardioprotective properties of date fruit.

Keywords: date palm fruit; phenolic compounds, ripening stages; antioxidant activity; lipid peroxidation; hypercholesterolemia.

الخلاصة

تُعرف ثمار نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) بأنها مصدر غني بالمواد المغذية والألياف والجزئيات النشطة بيولوجيًا. يمر التمر وأثناء تكوينه بمراحل النضج التي تؤثر بشكل مباشر على طبيعة ومحتوى المركبات المتراكمة في الفاكهة الناضجة. كان الهدف من هذه الدراسة هو مراقبة النضج الفينولي واستكشاف الإمكانات المضادة لفرط شحميات الدم لثلاثة أنواع من نخيل التمر الجزائري (*Phoenix dactylifera* L.) عند الفئران وتحسين الإجهاد التأكسدي على خلايا سرطان الكبد البشري (*HepG2 cells*). تم تحديد المظهر الفينولي لمستخلصات التمر الميثانولي بواسطة HPLC-DAD وتم دراسة القوة المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات DPPH و FRAP و TBARS. لوحظ وجود علاقة إيجابية بين مجموع المركبات الفينولية TPT و مضادات الأكسدة (P<0.05) AOA. تم العثور على جميع الأصناف التي تحتوي على حمض الفيروليك وحمض الغاليك وكيرسيتين. تم اقتراح وجود أحماض isoferulic و cinnamic و hydroxycinnamic. أبرزت نتائجنا لهذه العينات إمكانات كبيرة لمضادات الأكسدة والتي تم تأكيدها على خلايا *HepG2 cells* عن طريق تقليل مستوى TBARS (-70% DB, -86% DN, -80% GH) وتوليد كبير لأوكسيد النيتريك NO• في وسط الخلية. أظهر تصنيف نسبة الدهون في الدم ، الذي تم تحديده على مدار 21 يومًا من العلاج ، أن مستخلصات التمر البوليفينولية تنتج تأثيرًا كبيرًا في خفض الدهون عند الفئران عن طريق تقليل الكوليسترول الكلي TC ، و الدهون الثلاثية TG وكوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL مع زيادة كوليسترول بروتين دهني عالي الكثافة HDL مقارنة بالشاهد.

الكلمات المفتاحية: التمر، مركبات فينولية ، مراحل النضج ، النشاط المضاد للأكسدة ، فوق أكسدة الدهون، ارتفاع الكوليسترول.

REMERCIEMENTS

Mon cher PAPA mérite d'être remercié en première position aujourd'hui.

Un grand homme rempli de valeurs morales. C'est grâce à lui que j'ai pu surmonter beaucoup de difficultés et que j'ai réussi à mener ce travail à terme.

Je remercie et j'exprime mon entière reconnaissance et respect à mon directeur de thèse Pr. Mustapha KHALI, pour son accompagnement très riche et très instructif. Ses conseils ainsi que ses instructions ont beaucoup contribué à la réalisation de cette thèse. je le remercie également de la grande confiance dont il a su faire preuve en me laissant mener mes recherches d'une manière autonome, je tiens surtout à le remercier de tout mon cœur d'avoir accepté certaines difficultés et limitations liées à mes choix ces dernières années.

Mes sincères remerciements à tous les membres du jury, Dr. RAMDANE S.A., MCA à l'université Blida 1, Pr. BENBOUZA H., Professeur à l'université de Batna, Pr. AOUIICHE A., Professeur à l'ESSAIA El Harrach, Pr. DOUMANDJI A., Professeur à l'université Blida 1 et Dr. HADJADJ N., MCA à l'université Blida 1 pour leurs efforts, leur contribution et leurs commentaires précieux non seulement dans l'amélioration de ma thèse, mais également dans le savoir-faire scientifique : «Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie ».

Je remercie infiniment Mr. Sid Ali RAMDANE, un grand homme à l'esprit du parrain. Merci pour votre aide précieuse, votre présence et votre support à chaque complication de ma situation administrative, à vos interventions en mon absence. Merci pour le temps que vous avez consacré pour moi et pour tout étudiant en difficulté...

Mes remerciements vont aussi à une grande dame, qui m'a honoré par sa participation à la validation de ma thèse. Pr. Halima BENBOUZA, j'aimerais vous dire que votre passage a marqué ma carrière et ma vie. Aucun mot ne peut exprimer ma gratitude, vous m'avez appris beaucoup de choses et grâce à vous, je suis devenue la femme que je suis aujourd'hui...

Un grand merci à Mr. Malek BELGUEDJ, qui a contribué activement dans la réalisation de la première partie de notre recherche. Sans son aide et conseils avisés, ce travail n'aurait pas pu démarrer dans de bonnes conditions.

Je n'oserai conclure ce chapitre de ma vie et célébrer cette réussite sans remercier et témoigner mon entière reconnaissance à Mme. Lynda BENHADJA et son cher époux. Merci pour votre soutien durant toutes ces années, merci de m'avoir accompagné et guidé à chaque fois que ça se déboussole, votre présence a permis d'ajouter une belle touche à cette grande étape de ma vie.

Je n'oublierais jamais l'équipe de recherche du département de pharmacie à l'université de Naples, Italie. Une équipe modeste et compétente, l'appui de chacun d'entre eux était très apprécié. Pr. Ettore NOVELINO, Dr. G. Carlo TENORE, Giulia, Daniella, Emanuela, Dario, Louana, Fabrizia, merci à vous. Une remerciement particulier à Dr. Paola STIUSO et Dr. Daniella VANACORE à la faculté de médecine de Naples, merci pour votre temps et la chance que vous m'avez offerte pour apprendre à manipuler des cellules humaines !!

Je tiens à remercier mon frère et collègue Mr. Maarouf LARIBI, merci pour ton aide, merci pour ton support aux moments les plus difficiles, je te suis très reconnaissante...

Je remercie Mr. Hichem BOUCHKIOUA et Mme. Ouardia SAÏM, vous avez fait un excellent travail, je suis fière d'avoir partagé cette expérience avec vous.

Et la famille, la dernière citée mais celle qui a le plus de place dans mon cœur.

Je sais que cette thèse c'est un peu la vôtre et que sans vous elle ne serait pas terminée. Je vous remercie pour votre patience et votre soutien, pour votre compréhension (surtout vers la fin), pour m'avoir supporté, et avoir supporté mes absences à répétition au cours de ces dernières années. Merci pour tout, et c'est encore peu de le dire !!! Et à tous ceux que j'aurais oubliés bien

involontairement, merci !

*En hommage à mon papa,
Je suis très fière de ce que j'ai accompli et je te le dédie,*

*A ma plus belle source d'inspiration,
Et à qui je dois tant,
Ma maman,*

*A celui qui a partagé les pénibles moments d'achèvement de ce travail,
mon mari,*

*A cette petite guerrière qui m'appelle maman,
celle qui m'a appris d'être forte quel que soit les circonstances,
Sally*

*A ma chère famille,
Vous avez tant souffert pour m'épauler et m'accompagner,
Je ne pourrais vous exprimer ma gratitude et reconnaissance,
Ce travail et cette réussite sont les vôtres...*

A mes ami(e)s les proches ainsi que les loins...

Selma !

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS	1
RESUMÉ	2
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	12
PREMIÈRE PARTIE : La datte (<i>Phoenix dactylifera</i> L.), une baie à grande valeur ajoutée dans l'industrie agroalimentaire	12
1. Le palmier dattier	12
2. La datte : Formation et maturation	14
2.1. Description	14
2.2. Formation et maturation de la datte	14
3. Composition et valeur nutritionnelle	16
3.1. Composition biochimique de la partie comestible de la datte « la pulpe »	16
3.1.1. L'eau	17
3.1.2. Les sucres	18
3.1.3. Les acides aminés	19
3.1.4. Les acides gras	19
3.1.5. Les éléments minéraux	20
3.1.6. Les vitamines	21
3.1.7. Les fibres	21
3.1.8. Les composés phénoliques	22
3.2. Composition biochimique de la partie non comestible de la datte « le noyau »	23
4. Bienfaits de la datte	24

5. <u>Utilisations de la datte dans les industries agroalimentaires</u>	25
---	----

<u>DEUXIÈME PARTIE : Stress oxydant et peroxydation des lipides</u>	26
---	----

1. <u>Le stress oxydatif</u>	26
------------------------------	----

1.1. <u>Le stress oxydatif comme facteur de risque des maladies chroniques</u>	27
--	----

1.2. <u>Principaux dommages oxydatifs dans l'organisme</u>	28
--	----

1.2.1. <u>Dommages oxydatifs à l'ADN</u>	28
--	----

1.2.2. <u>Dommages oxydatifs aux protéines</u>	28
--	----

1.2.3. <u>Dommages oxydatifs aux lipides</u>	29
--	----

1.2.4. <u>Dommages oxydatifs aux lipoprotéines</u>	29
--	----

2. <u>La peroxydation lipidique et ses mécanismes</u>	30
---	----

3. <u>Moyens de défense contre le stress oxydatif</u>	30
---	----

3.1. <u>La superoxydodesmutase SOD</u>	31
--	----

3.2. <u>Le glutathion (GSH)</u>	31
---------------------------------	----

3.3. <u>La catalase</u>	31
-------------------------	----

3.4. <u>Les antioxydants non enzymatiques</u>	31
---	----

3.4.1. <u>La vitamine C</u>	32
-----------------------------	----

3.4.2. <u>La vitamine E</u>	32
-----------------------------	----

3.4.3. <u>Les carotènes</u>	32
-----------------------------	----

<u>TROISIÈME PARTIE : Les polyphénols</u>	33
---	----

1. <u>Caractéristiques</u>	33
----------------------------	----

2. <u>Biosynthèse des polyphénols</u>	34
---------------------------------------	----

3. <u>Métabolisme et biodisponibilité des polyphénols</u>	35
---	----

4. <u>Rôle et bienfaits des polyphénols</u>	36
---	----

<u>CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	38
--	-----------

<u>PREMIÈRE PARTIE : Caractérisation biochimique des antioxydants et étude de la maturation phénolique de trois variétés de dattes algériennes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)</u>	40
--	----

1. <u>Matériel</u>	40
--------------------	----

1.1. <u>Matériel végétal</u>	40
1.2. <u>Réactifs chimiques</u>	41
2. <u>Méthodes analytiques</u>	41
2.1. <u>Caractérisation quantitative et étude de la maturation phénolique des trois variétés de dattes algériennes</u>	41
2.1.1. <u>Extraction des polyphénols</u>	41
2.1.2. <u>Dosage des polyphénols totaux</u>	42
2.1.3. <u>Dosage des flavonoïdes</u>	43
2.1.4. <u>Dosage des caroténoïdes</u>	44
2.1.5. <u>Mesure du pouvoir antioxydant au cours des différents stades de maturité</u>	45
2.1.5.1. <u>Pouvoir réducteur par l'indice FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)</u>	45
2.1.5.2. <u>Test de piégeage des radicaux au DPPH ((2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)</u>	45
2.1.5.3. <u>Test du blanchiment de la β-Carotène</u>	46
2.2. <u>Caractérisation qualitative des composés phénoliques des extraits de dattes à maturité par HPLC-DAD</u>	47
2.2.1. <u>Extraction des polyphénols</u>	47
2.2.2. <u>Purification des extraits</u>	47
2.2.3. <u>Mesure du pouvoir antioxydant</u>	47
2.2.3.1. <u>Pouvoir réducteur par l'indice FRAP (voir section 2.1.5.1.)</u>	47
2.2.3.2. <u>Test de piégeage des radicaux au DPPH (voir section 2.1.5.2.)</u>	47
2.2.3.3. <u>Essai ABTS.</u>	48
2.2.4. <u>Analyse par HPLC-DAD</u>	48
2.2.4.1. <u>Mise en place du système chromatographique pour l'analyse des échantillons</u>	49

2.2.4.2.Établissement des gammes d'étalonnages des polyphénols de référence	49
--	----

DEUXIÈME PARTIE : Étude du pouvoir antioxydant des trois variétés de dattes algériennes
sur la peroxydation lipidique – Étude *in vitro* sur cultures cellulaires HepG2

.	50
1. <u>Matériel végétal</u>	50
2. <u>Matériel biologique</u>	50
3. <u>Réactifs chimiques et enzymes de digestion</u>	51
4. <u>Méthodes analytiques</u>	51
4.1. <u>Simulation de la digestion gastro-intestinale in vitro</u>	51
<u>La digestion salivaire</u>	51
<u>La digestion gastrique</u>	52
<u>La digestion intestinale</u>	52
4.2. <u>La culture cellulaire</u>	54
4.2.1. <u>Mise en culture des cellules hépatiques HepG2</u>	54
4.2.2. <u>Étude de la sensibilité de la culture cellulaire HepG2 aux fraction GI</u>	55
4.2.3. <u>Mesure de l'activité antioxydante des fractions GI sur les lignées cellulaires HepG2</u>	56
4.2.3.1. <u>Mesure de la peroxydation lipidique par la méthode TBARs (Thiobarbituric Acid Reactive Substances)</u>	57
4.2.3.2. <u>Production de l'oxyde nitrique NO•</u>	57

TROISIÈME PARTIE : Étude du pouvoir hypocholestérolémiant des extraits de trois variétés
de dattes algériennes - Étude *in vivo*

1. <u>Matériel végétal</u>	58
2. <u>Animaux</u>	58
3. <u>Expérimentation <i>in vivo</i></u>	58
3.1. <u>Essai de toxicité aigüe</u>	59
3.2. <u>Test de l'activité hypocholestérolémiante des extraits (Rats)</u>	59

3.2.1. <u>Traitement des rats</u>	59
3.2.2. <u>Prélèvement sanguin et mesure du poids</u>	60
3.2.2.1. <u>Dosage du cholestérol total (TC)</u>	61
3.2.2.2. <u>Dosage des triglycérides (TAG)</u>	62
3.2.2.3. <u>Dosage du HDL-c</u>	62
3.2.2.4. <u>Dosage du LDL-c</u>	62
<u>Analyses statistiques</u>	63

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION **64**

PREMIÈRE PARTIE : Caractérisation biochimique des antioxydants et étude de la maturation phénolique de trois variétés de dattes algériennes (*Phoenix dactylifera* L.) 64

I. <u>Caractérisation quantitative et étude de la maturation phénolique des trois variétés de dattes algériennes</u>	64
1. <u>Paramètres biochimiques</u>	64
1.1. <u>Teneur en eau</u>	64
1.2. <u>Teneur en matière sèche (MS)</u>	67
1.3. <u>Teneur en composés phénoliques totaux</u>	68
1.4. <u>Teneur en flavonoïdes</u>	71
1.5. <u>Teneur en caroténoïdes totaux</u>	72
1.6. <u>L'activité antioxydante des extraits des différentes variétés de dattes</u>	74
1.6.1. <u>Blanchissement du β- carotène (the bleaching test)</u>	74
1.6.2. <u>Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1- picryl- hydrazyl)</u>	76
1.6.3. <u>Pouvoir réducteur par l'indice FRAP (Ferric reducing antioxidant power)</u>	77
II. <u>Caractérisation qualitative des composés phénoliques des extraits de dattes à maturité par HPLC-DAD</u>	79

1. <u>Analyse du profil phénolique des extraits de dattes par HPLC-DAD</u>	79
2. <u>Teneur en polyphénols et pouvoir antioxydant des extraits phénoliques</u>	82
<u>DEUXIÈME PARTIE : Étude du pouvoir antioxydant des trois variétés de dattes algériennes sur la peroxydation lipidique – Étude <i>in vitro</i> sur cultures cellulaires HepG2</u>	85
1. <u>Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique</u>	85
1.1. <u>Viabilité des cellules (Test MTT)</u>	85
1.2. <u>Taux de protéines des cellules HepG2</u>	87
1.3. <u>Les mesures TBARS pour l'évaluation de la peroxydation lipidique</u>	88
1.4. <u>Production du monoxyde d'azote NO*</u>	89
<u>TROISIÈME PARTIE : Étude du pouvoir hypocholestérolémiant des extraits de trois variétés de dattes algériennes - Étude <i>in vivo</i></u>	91
1. <u>Test toxicologique</u>	91
2. <u>Étude de l'activité hypocholestérolémiante des extraits</u>	92
2.1. <u>L'indice de peroxyde de l'huile oxydée dans l'induction de l'hypercholestérolémie</u>	92
2.2. <u>Tests <i>in vivo</i></u>	92
<u>CONCLUSION</u>	96
<u>APPENDICES</u>	98
<u>LISTE DES ABRÉVIATIONS</u>	110
<u>RÉFÉRENCES</u>	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Évolution de la production de dattes en Algérie entre 2016 et 2017, par type de datte (en milliers de quintaux)	13
Figure 1.2. Morphologie de la baie de datte et de son noyau	14
Figure 1.3. Formation et maturation des dattes	16
Figure 1.4: Composition de la datte	17
Figure 1.5 : Schéma illustrant les bienfaits de la datte	24
Figure 1.6 : Métabolisme des polyphénols	35
Figure 1.7 : Principaux effets des polyphénols végétaux sur l'intestin humain	37
Figure 2.1 : Démarche expérimentale	39
Figure 2.2 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de datte	42
Figure 2.3 : Protocole de dosage des polyphénols totaux	43
Figure 2.4 : Protocole de dosage des flavonoïdes	44
Figure 2.5 : Protocole du test du blanchiment de la β -Carotène	46
Figure 2.6. Représentation schématique du modèle digestif <i>in vitro</i>	53
Figure 2.7 : Schéma de la première mise en culture avec comptage sous microscope des cellules hépatiques HepG2	55
Figure 2.8 : Manipulation des cultures cellulaires sous hotte	56
Figure 2.9 : Schéma du mode de différenciation des souris et rats (piercing)	60
Figure 2.10 : Prélèvement sanguin au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital	61

Figure 3.1 : Évolution de la teneur en eau des trois variétés de dattes au cours des différents stades de maturation	65
Figure 3.2 : Évolution de la teneur en matière sèche des trois variété de dattes au cours des différents stades de maturation	67
Figure 3.3 : Évolution de la teneur en composés phénoliques totaux (mg EAG / 100g MS) des différentes variétés au cours des différents stades de maturation	68
Figure 3.4 : Évolution de la teneur en caroténoïdes totaux pour les différentes variétés au cours du développement et maturation	73
Figure 3.5 : Évolution de l'activité antioxydante exprimée en pourcentage d'inhibition pour les différentes variétés au cours du développement et maturation	74
Figure 3.6 : Évolution de pouvoir radicalaire pour les différentes variétés au cours du développement et maturation	76
Figure 3.7 : Chromatogrammes des composés phénoliques des trois variétés de dattes	81
Figure 3.8 : Viabilité cellulaire et taux de prolifération utilisant l'essai MTT	86
Figure 3.9 : Teneur en protéines des cellules traitées avec les FGI des différentes variétés de dattes	87
Figure 3.10 : Effet des polyphénols de la FGI des différentes variétés de dattes sur le stress oxydatif cellulaires (HepG2)	88
Figure 3.11 : Effet des polyphénols de la FGI lyophilisée de différentes variétés de dattes sur le taux du monoxyde d'azote dans le milieu cellulaire	89
Figure 3.12 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J0 en g/L	93
Figure 3.13 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J7 en g/L	93
Figure 3.14 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J14 en g/L	94
Figure 3.15 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J21 en g/L	95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Composition de la datte en nutriment essentiels_____	17
Tableau 1.2 : Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région_____	18
Tableau 1.3 : Teneur moyenne de la datte en sucres_____	18
Tableau 1.4 : Composition moyenne de la datte en acides aminés (mg/100 g) _____	19
Tableau 1.5 : Composition en acides gras de la datte Deglet-Nour, en % de matière grasse ____	20
Tableau 1.6 : Composition minérale la datte en mg/100 g_____	20
Tableau 1.7 : Composition vitaminique moyenne de la datte sèche_____	21
Tableau 1.8 : Teneur de la datte en fibres_____	21
Tableau 1.9 : Teneur en composés phénoliques de quelques variétés de dattes algériennes____	22
Tableau 1.10 : Composition biochimique des noyaux de dattes Irakiennes_____	23
Tableau 1.11 : Composition en acides gras des noyaux de datte_____	23
Tableau 3.1 : Teneur en eau des trois variétés de dattes au cours des stades de maturité_____	64
Tableau 3.2 : Teneur en flavonoïdes (mg eq Q / 100g MS) de différentes variétés de datte au cours de la maturation_____	71
Tableau 3.3 : Activité antioxydante (mg eq AG / 100g MS) des différentes variétés de datte au cours de la maturation_____	78
Tableau 3.4: Profils phénoliques des extraits phénoliques des trois variétés de dattes analysées par HPLC-DAD_____	80
Tableau 3.5 : Activités antioxydantes et teneurs en polyphénols des trois variétés de datte____	83

INTRODUCTION

Dans un certain nombre de versets coraniques, l'humble datte est honorée comme l'un des bienfaits du paradis (Coran Sourate Al-Rahman, 55 : 68). Lorsqu'on examine ce fruit, on note qu'il présente un grand nombre de caractéristiques très importantes. L'une des espèces de plantes les plus anciennes, la datte, est aujourd'hui un aliment de choix, pas seulement pour sa délicieuse saveur mais aussi pour ses propriétés nutritionnelles. Chaque jour, de nouveaux bienfaits de la datte sont découverts et elle est maintenant utilisée à la fois comme médicament et comme aliment pour maintenir un bon état de santé.

On sous-entend par cancer, diabète, maladies cardiovasculaires et autres, les maladies devenant les tueurs du siècle. Au fait, il a été démontré que toute cette panoplie pathologique résulte d'une seule cause majeure, un déséquilibre sévère entre la balance agressive et celle auto-protectrice [1]. Le stress oxydant étant le seul synonyme de ce déséquilibre, devient l'ennemi principal de l'homme. Et afin de le combattre, plusieurs investigations ont eu lieu pour mettre en évidence le lien entre cet état oxydatif, l'alimentation des populations et le développement de maladie chronique [2].

Au cours de ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels, un intérêt qui croit de jour en jour, tout en doublant à chaque fois que les recherches scientifiques démasquent plus d'effets bénéfiques de ces produits. Le régime alimentaire a toujours été associé un bon état de santé. Actuellement, la recommandation standard des organismes de santé dans beaucoup de pays développés stipule la consommation d'au moins cinq fruits et légumes par jours [3]. Cette recommandation a été élaborée par des professionnels de santé et découle des conclusions obtenues grâce à un grand nombre de recherches et études épidémiologiques ayant suggéré que la teneur élevée des fruits et légumes en micronutriments ainsi que sa pauvreté en matières grasses (surtout en graisses saturées) améliorent significativement la santé des populations [4].

Les fruits et légumes ou globalement les végétaux ont tous un dénominateur commun ; ils contiennent des polyphénols. Les polyphénols sont parmi les composés naturels dont on

parle le plus aujourd'hui, raison pour laquelle un grand nombre de recherche est réalisé pour l'exploration des leurs différentes activités biologiques. Ces molécules font l'objet d'une littérature massive qui détaille leurs bienfaits sur la santé et surtout leur pouvoir qui favorise la prévention des maladies chroniques [4 ;5].

Les polyphénols sont des métabolites secondaires produits par les végétaux. Ces molécules bioactives constituent le principal système de défense des plantes, impliquées également dans plusieurs mécanismes physiologiques. Ils ont une particularité qui réside dans leur grande diversité [6]. Structurellement, ils sont rassemblés sous trois grandes familles : les composés phénoliques simples (acides phénoliques), les flavonoïdes et les tanins. Ces molécules sont principalement réputées par leur pouvoir antioxydant ; c'est un système de défense à part entière qui protège les végétaux des stress biologiques, abiotiques et des agressions extérieures. Autre que leur pouvoir bioactif, les polyphénols confèrent à certains végétaux leurs couleurs (canneberges, fraises, myrtilles), des saveurs pour d'autres (l'astringence de certains baies) [6].

Entre l'activité antioxydante globalement définie, et les activités biologiques qui en découlent, nous nous sommes intéressés à l'activité des polyphénols contre la peroxydation lipidique, mécanisme par lequel beaucoup d'aspect de vieillissements cellulaires sont induits.

Il était très simple de voir d'un angle étroit ces composés, et de dire que tout végétal peut en contenir. L'essentiel réside dans le fait de bien les isoler et les garder intactes afin de mieux les caractériser et bénéficier de leur pouvoir protecteur naturel. Enfin, le but de la présente étude était de mieux connaître les biomolécules antioxydantes que la science a permis d'identifier, et qu'on peut qualifier de « molécules miracles ».

Cette recherche vise à apprécier et mettre en évidence l'effet protecteur des polyphénols des dattes algériennes visant un marqueur biologique bien définis et qui est la peroxydation lipidique, acteur principal du déséquilibre cardiovasculaire, mais il reste aussi indispensable de réaliser des études de biodisponibilité. La proportion « bio-disponible » d'un composé actif désigne la quantité de ce composé qui est disponible pour exercer une action bénéfique dans l'organisme. Le terme « biodisponibilité » recouvre donc les étapes d'absorption, de métabolisation et de stockage de ce composé, la finalité étant la détermination de la quantité finale disponible sous forme active dans l'organisme et par la suite fixer les bonnes doses préventives et thérapeutiques. Notre choix s'est donc porté sur les dattes car ; très abondant en

Algérie, il est massivement consommé par la population et il constitue l'aliment modèle des zones arides et semi-arides du pays.

De ce fait, nous avons jugé indispensable l'étude de la maturation phénoliques des dattes et ce pour avoir une vue détaillée sur le mécanisme de production, maturation et métabolisation des composés phénoliques, et aussi de vérifier l'effet des maturations physiologique et phénolique l'une sur l'autre. Une étude détaillée de la maturation phénolique au cours des différents stades de maturation de trois variétés de dattes (molle semi molle et sèche) sera donc réalisée avec une caractérisation qualitative et quantitative des composés phénoliques de ces variétés. Cela nous permettra d'avoir une vue d'ensemble sur la teneur, la nature et le pouvoir de ces molécules chimiquement testées.

L'étude de la biodisponibilité des polyphénols de la datte via une reproduction *in vitro* du schéma digestif de ces molécules nous permettra à la fois de suivre le devenir de ces molécules dans le tractus digestif donc leur biodisponibilité juste après leur digestion ainsi que l'étude de leur pouvoir antioxydant donc leur action sur les cellules hépatique lors de leur métabolisation au niveau du foie. Finalement, une étude de la biodisponibilité des polyphénols de la datte *in vitro* sera menée pour la détermination de leur effet santé, le pouvoir hypocholestérolémiant des polyphénols de la datte sera donc brièvement exploré.

Les études *in vivo* et *in vitro*, nous permettront donc de confirmer la théorie de notre recherche. L'hypothèse du départ pour notre travail se vérifiera ainsi en évaluant la capacité de notre organisme à absorber puis métaboliser les composés phénoliques ce qui traduit leur biodisponibilité. Cette accessibilité des composés phénoliques permet aux cellules de bénéficier de tous les pouvoirs bioactifs de ces derniers. Il serait alors intéressant d'aller loin dans ce domaine naturellement vaste et d'investiguer sur ces deux aspects qui sont qualifiés très importants sur le plan nutritionnel et curatif, et même voir si, en état d'excès, ces molécules risquent de devenir pro-oxydantes.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIÈRE PARTIE

La datte (*Phoenix dactylifera* L.), une baie à grande valeur ajoutée dans l'industrie agroalimentaire

1. Le palmier dattier

Palmier dattier (*Phoenix Dactylifera* L.), est l'un des plus anciens arbres cultivés pour ses fruits « les dattes ». C'est l'espèce par excellence des zones arides et sahariennes [7], elle est connue depuis l'antiquité et son origine est située dans l'Inde et le Golfe Persique. Répandu dans les zones chaudes, on le trouve dans l'Afrique du nord, le moyen orient et en Amérique du nord [8].

Le palmier dattier est considéré comme une espèce à grande importance socioéconomique et ornementale [8]. La production mondiale de dattes a été établie entre 7 et 8 millions de tonnes (7,4 millions de tonnes en 2014) [9]. En Algérie, le palmier dattier possède une superficie supérieure à 2 millions de Km² [7] avec une production annuelle atteignant (ou dépassant parfois) le 1 million de tonnes [9].

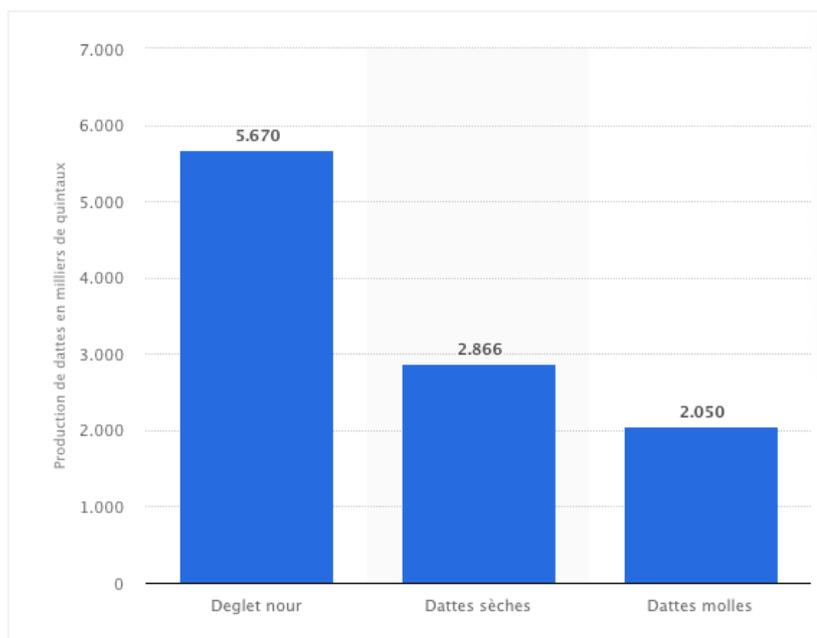


Figure 1.1 : Évolution de la production de dattes en Algérie entre 2016 et 2017, par type de datte (en milliers de quintaux). [10]

C'est une espèce des zones sahariennes par excellence grâce à sa grande résistance et sa très bonne adaptation aux conditions climatiques sévères. La palmeraie algérienne comprend plus de 11 millions de palmiers. Ces derniers sont principalement répartis sur l'ensemble de 9 wilayas du Sahara Algérien avec une présence marginale dans quelques wilayas situées dans les zones de transition entre la steppe et le Sahara [11].

La répartition géographique du palmier dattier ainsi que les variations des conditions climatiques ont joué un rôle principal dans la diversification de la composition variétale des espèces locales du fruit du palmier dattier [12]. La variété Deglet Nour prédomine dans les zones sud-est (Région des Zibans et Oued Souf), c'est la principale variété à haute valeur marchande et qui représente la majeure part des exportations nationales vers l'étranger. Outre cette variété, on trouve aussi les variétés Mech Degla, Degla Baïda et Ghars qui rentrent principalement dans la consommation locale [7].

2. La datte : Formation et maturation

2.1. Description

La datte est le fruit du palmier dattier, c'est une baie à noyau unique, est de forme allongée ou parfois arrondie pour certaines variétés. Le noyau est dur, et est entouré de la partie charnue que constituent ces trois tissus [13]:

- L'enveloppe cellulosique : elle est fine et translucide, appelée épicarpe ;
- Le mésocarpe : la partie charnue de la datte, riche en fibres qui définissent sa consistance (selon les variétés), de couleur plus ou moins soutenue à l'extérieur et plus claire au niveau de la zone interne (de texture fibreuse) ;
- L'endocarpe : représente la fine membrane enveloppant le noyau.

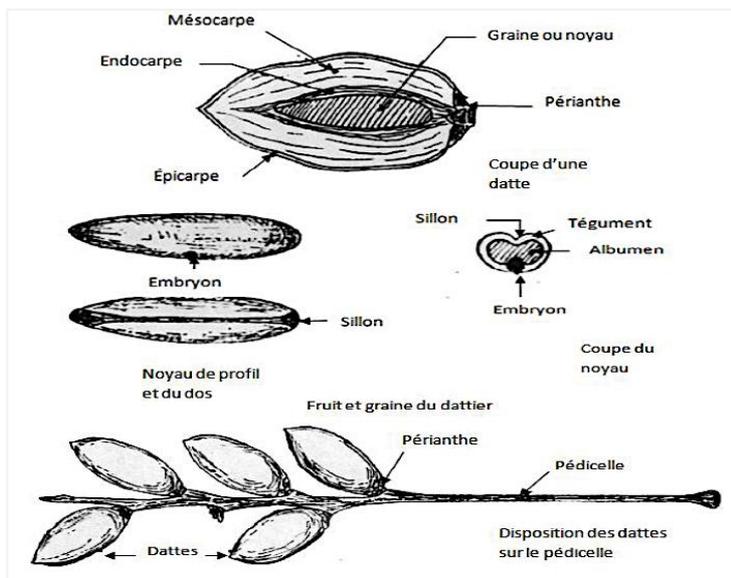


Figure 1.2. Morphologie de la baie de datte et de son noyau [14]

2.2. Formation et maturation de la datte

Le palmier dattier est une espèce dioïque nécessitant la présence de deux plants mâle et femelle pour se reproduire. La fécondation se situe au printemps et varie dans le temps selon la précocité des différentes variétés ainsi que le climat durant la saison [14].

Le fruit provient du développement d'un des trois carpelles après fécondation de l'ovule donnant naissance à une petite baie qui se développe au cours de plusieurs

stades de maturation. Cinq principaux stades de maturation ont été observés et décrits [14, 15, 16, 17], et chaque stade de maturation correspond à une appellation particulière provenant d'une terminologie irakienne bien adoptée aux États-Unis (la seule terminologie préférée à celles des autres pays producteurs de dattes) [18].

Booij *et al.* (1992) [19] ont décrit les stades de maturation de la datte comme suit :

- Stade HABABAOUK : premier stade après la fécondation, la petite baie est de forme sphérique couleur crème. Elle présente une pointe en apex. Son poids est inférieur au gramme.
- Stade KIMRI : dans un premier temps, le volume et le poids augmentent très vite ainsi que la quantité de sucres réducteurs et de sucres totaux. La datte possède une très forte acidité et une humidité élevée. Au cours d'une deuxième étape, la prise du poids et du volume est moins rapide, le taux de sucres réducteurs baisse, la formation de sucres totaux ralentit, mais le taux d'humidité reste toujours élevé. A ce stade, la datte possède une teinte vert pomme.
- Stade KHALAL : ce stade est marqué par un changement de couleur de la peau (du vert au jaune, puis au chrome et enfin au jaune tacheté de rouge), pour prendre finalement une couleur variant entre le rose et le rouge écarlate. La prise de poids est de plus en plus lente et la datte atteint son poids maximal allant de 5 à 12 g. L'accumulation des sucres réducteurs est faible, la proportion de saccharose, de sucres totaux et de matière sèche augmentent rapidement. C'est à ce stade que le taux de saccharose est à son maximum.
- Stade ROUTAB : à ce stade, la datte devient plus ou moins translucide et molle. Au cours de ce stade et grâce à l'amollissement de la datte, tout ce qui reste des tanins précipite sous la peau, le fruit perd alors toute l'astringence qu'il avait au stade Khalal.
- Stade TAMR : c'est le dernier stade de la maturation, la datte perd beaucoup d'eau et devient concentrée en sucres. Elle varie en taille selon les variétés et les conditions agro-climatiques [20]. Le fruit est de forme cylindrique ou long (3 à 11 cm) et la couleur varie entre le jaune, le rouge le marron et noir. La consistance de la datte diffère à ce stade en fonction de la variété et le type

(molle, semi-molle ou dure). La composition en glucides de la datte molle est dominée par les sucres invertis (fructose et glucose) et ne contient que peu ou pas de saccharose tandis que les variétés sèches peuvent contenir des proportions relativement élevées en saccharose.

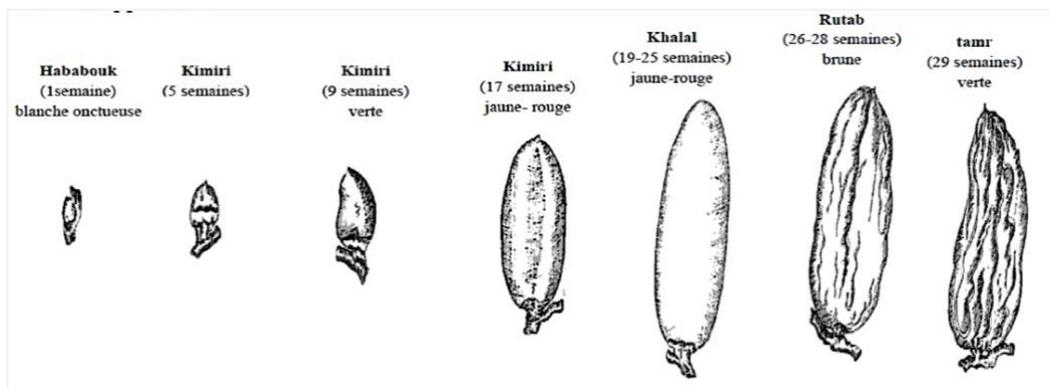


Figure 1.3. Formation et maturation des dattes [17]

3. Composition et valeur nutritionnelle

La datte est un fruit très riche en éléments nutritifs essentiels. Composée de 70 % de sucres, elle est donc une excellente source d'énergie. Elle peut fournir jusqu'à 314 kcal par 100 g de chair de datte consommée [21]. Elle est également une très bonne source de fibres et des sels minéraux. La datte contient peu de protéines mais quelques acides aminés essentiels [22, 23]. Elle contient également des lipides en traces et des métabolites secondaires ayant des activités biologiques diverses.

3.1. Composition biochimique de la partie comestible de la datte « la pulpe »

La pulpe de la datte représente une proportion de 80% à 95% du poids total du fruit, selon la variété et les conditions pédoclimatiques. Elle se distingue par son taux d'humidité et sa forte teneur en sucre. [24]

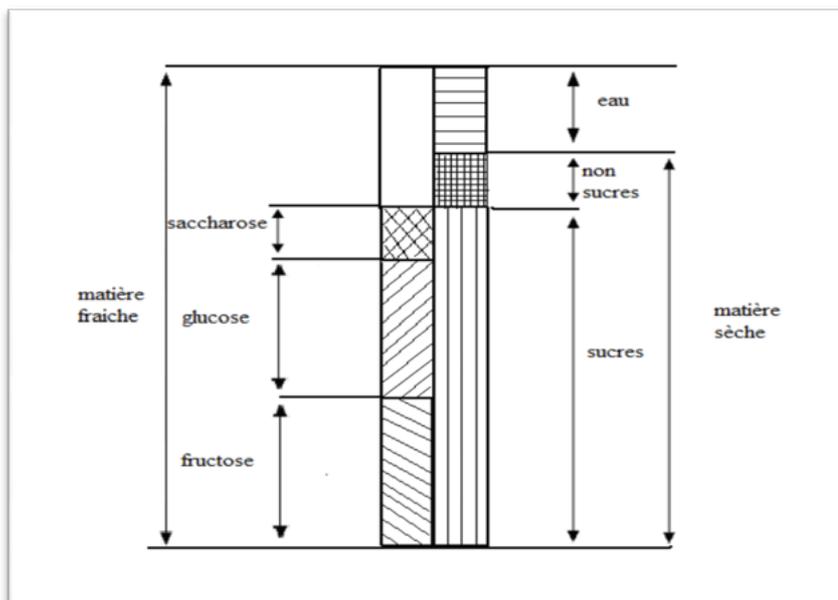


Figure 1.4: Composition de la datte [25].

Le tableau suivant démontre la composition biochimique approximative de la datte :

Tableau 1.1 : Composition de la datte en nutriment essentiels [21].

Composition	Minimum	Maximum
Eau (g/100 g)	7,2	50,4
Matière grasse (g/100 g)	0,1	1,4
Amidon (g/100 g)	1,0	1,9
Protéines (g/100 g)	1,1	2,6
Fibres (g/100 g)	3,57	10,9
Glucides (g/100 g)	52,6	88,6
Minéraux (mg/100 g)	417,37	1913,2
Vitamines (µg/100 g)	2254,61	20023,2
Polyphénols (mg/100 g)	3,91	661

3.1.1. 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 % [26].

Tableau 1.2 : Teneur en eau de quelques variétés de dattes de la région Fliache (Biskra), en % [26].

Variétés	Consistance	Teneur en eau (%)
Deglet-Nour	Demi-molle	22,60
Mech-Degla	Sèche	13,70
Ghars	Molle	25,40

3.1.2. Les sucres

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement la présence de trois types de sucres : le saccharose, le glucose et le fructose [21]. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol [27; 28].

La persistance du saccharose est manifestement liée au durcissement de la datte [29]. Les dattes molles sont à sucre inverti (fructose, glucose) alors que les dattes sèches sont à saccharose, les dattes demi-molles occupent une position intermédiaire.

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 [28].

Tableau 1.3 : Teneur moyenne de la datte en sucres [21].

Sucres (g/100g)	Minimum	Maximum
Glucose	17,6	41,4
Fructose	13,6	36,8
Saccharose	0,5	33,9

3.1.3. Les acides aminés

Parmi les constituants intéressants de la datte, on peut mentionner encore les protéines. Néanmoins, la pulpe de la datte n'en renferme qu'une faible quantité. Le taux diffère selon les variétés et surtout selon le stade de maturité, il est en général de l'ordre de 1,75% du poids de la pulpe [29].

Tableau 1.4 : Composition moyenne de la datte en acides aminés (mg/100 g). [21]

Acides aminés	Minimum	Maximum
Alanine	30	133
Arginine	34	148
Acide aspartique	59	309
Cystéine	13	67
Acide glutamique	100	382
Glycine	42	268
Histidine	0,1	46
Isoleucine	4	55
Leucine	41	242
Lysine	42	154
Methionine	4	62
Phenylalanine	25	67
Proline	36	148
Serine	29	128
Tryptophan	7	92
Tyrosine	15	156

3.1.4. Les acides gras

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais [30]. Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation.

Selon Al-Shahib et *al.* [22], la teneur en lipides passe de 1,25 % au stade Hababouk à 6,33 % au stade Kimiri (tableau 3.1). Cette teneur diminue progressivement au stade Routab pour atteindre une valeur de 1.97 % de matière sèche au stade Tamar.

Tableau 1.5 : Composition en acides gras de la datte Deglet-Nour, en % de matière grasse.

[22]

Acides gras	Teneur en % de matière grasse
Acide linoléique (C18 : 3)	12,30
Acide linoléique (C18 : 2)	11,47
Acide oléique (C18 : 1)	10,74
Acide stéarique (C18 : 0)	10,47
Acide palmitique (C16 : 0)	7,89
Acide myristique (C14 : 0)	8,66

3.1.5. Les éléments minéraux

L'étude de 58 variétés de dattes cultivées dans la région des Zibans [31], montre que le taux de cendres est compris entre 1,10 et 3,69 % du poids sec. La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium.

Le tableau ci-dessous, donne la teneur en éléments minéraux de la datte selon Al Farsi et Lee (2008) : [21]

Tableau 1.6 : Composition minérale la datte en mg/100 g. [21]

Éléments minéraux	Teneur (mg/100 g)	
	Minimum	Maximum
Magnésium (Mg)	31,0	150
Sodium (Na)	1,00	261
Calcium (Ca)	5,00	206
Phosphore (P)	35,0	74
Potassium (K)	345,0	1287
Manganèse (Mn)	0,01	0,4
Fer (Fe)	0,10	1,5
Zinc (Zn)	0,02	0,6
Cuivre (Cu)	0,01	0,8

3.1.6. Les vitamines

En général, la datte ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique de la datte se caractérise par des teneurs appréciables des vitamines du groupe B. Ce sont des précurseurs immédiats des coenzymes indispensables à presque toutes les cellules vivantes et jouent un rôle primordial [32].

Tableau 1.7 : Composition vitaminique moyenne de la datte sèche [21].

Vitamines	Teneur moyenne pour 100g
Vitamine C	2,00 mg
Thiamine (B1)	0,06 mg
Riboflavine (B2)	0,10 mg
Niacine (B3)	1,70 mg
Acide pantothénique (B5)	0,80 mg
Vitamine (B6)	0,15 mg
Folates (B9)	28,00 mg

3.1.7. Les fibres

La datte est riche en fibres, elle en apporte 8,1 à 12,7 % du poids sec [33]. Selon Ben Chabane [34], les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Tableau 1.8 : Teneur de la datte en fibres [21].

Fibres (g/100 g)	Minimum	Maximum
Solubles	0,4	13
Insolubles	3,03	7,4

Du fait de leur pouvoir hydrophile, les fibres facilitent le transit intestinal et exercent un rôle préventif des cancers colorectaux, des appendicites, de la diverticulose, des varices et des hémorroïdes. Elles ont également un effet hypocholestérolémiant [35; 36].

3.1.8. Les composés phénoliques

Les analyses physico-chimiques des dattes ont révélé la présence de substances dites phénoliques [17 ; 24].

L'étude menée par Mansouri et *al.* [37] sur sept variétés de dattes algériennes, a révélé une teneur phénolique variant de 2,49 à 8,3 mg/100g du poids frais.

Tableau 1.9 : Teneur en composés phénoliques de quelques variétés de dattes algériennes [37].

Variétés	Teneur en mg/100g du poids frais
Tazizaout	2,49
Ougherouss	2,84
Akerbouche	3,55
Tazarzait	3,91
Tafiziouine	4,59
Deglet-Nour	6,73
Tantbouchte	8,36

Au sein de cette même étude, l'analyse qualitative de ces composés phénoliques a montré la présence d'acides cinnamiques, féruliques, cinamiques et coumariques, et dont cette teneur importante en acides cinnamiques libres n'est pas fréquente dans les autres fruits, ainsi que la présence de certains flavonoïdes : les flavones, flavonols et flavanones glucosides dont l'identification était difficile et la teneur s'est révélée très faible.

Selon Henk et *al.*, [38], les polyphénols jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissant la tension artérielle et renforçant le système immunitaire.

3.2. Composition biochimique de la partie non comestible de la datte « le 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 [13]. Le tableau suivant montre la composition biochimique moyenne des noyaux de dattes Irakiennes. [14]

Tableau 1.10 : Composition biochimique des noyaux de dattes Irakiennes [14].

Constituants	Teneur en %
Eau	6,46
Glucides	62,51
Protides	5,22
Lipides	8,49
Cellulose	16,20
Cendres	1,12

D'autres données analytiques sur la composition chimique du noyau de datte montrent qu'il renferme plusieurs acides gras avec une proportion plus importante d'acide oléique et laurique [39].

Tableau 1.11 : Composition en acides gras des noyaux de datte .[39]

Acides gras	Teneur en mg/100g d'acides gras totaux
Acide caprique	0,3
Acide laurique	21,8
Acide myristique	10,9
Acide palmitique	9,6
Acide stéarique	1,5
Acide oléique	42,3
Acide linoléique	13,7

4. Bienfaits de la datte

Les bienfaits liés à la consommation des différents produits issus du palmier dattier principalement le fruit ont été connus depuis l'antiquité [17]. Ainsi, dans certaines régions, la consommation des différentes parties du palmier rentrait dans les pratiques médicinales traditionnelles. Le fruit de la datte a été principalement utilisé pour traiter l'hypertension et le diabète [40]. En Inde, le fruit séché est considéré comme antitussif, expectorant, laxatif et diurétique. [41]

Une recherche menée par Tahraoui et *al.* [40] a montré que les dattes ont été traditionnellement utilisées pour soigner l'hypertension et le diabète. Il a été prouvé aussi que la consommation de la datte fortifie le corps, prévient la chute précoce des cheveux, l'apparition des rides et donne à la peau un aspect reluisant. [40]

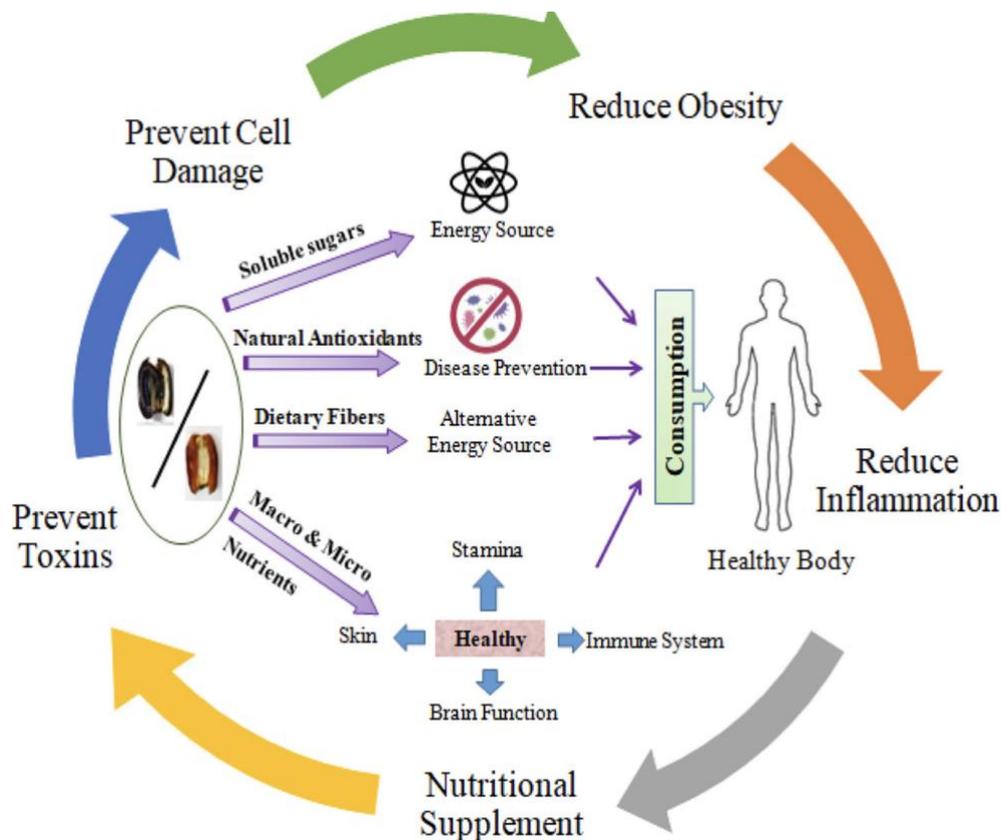


Figure 1.5 : Schéma illustrant les bienfaits de la datte [42].

5. Utilisations de la datte dans les industries agroalimentaires

La datte est un fruit qui possède beaucoup de vertus et effets bénéfiques pour la santé ; il est également un fruit à grande valeur ajoutée dans le soutien de l'économie de ses pays producteurs [43]. De nombreux produits peuvent être préparés à partir des dattes, telles les saumures, confiture, gelée, dattes en sirop, beurre de dattes, bars de dattes, bonbons et confiserie [44].

Les saumures de dattes sont principalement préparées à partir de dattes au stade Kimri et khalal [45]. Au stade Rutab, les dattes ont une teneur plus haute en sucre et un contenu phénolique moindre, et peuvent donc être utilisées en tant qu'édulcorant naturel. Et au stade Tamr, les dattes sont transformées en confiture, bars de dattes, pâte de datte ou sirop de datte [46 ; 47]

Dans l'industrie de la boulangerie ainsi qu'en tant qu'ingrédient dans la fabrication de produits céréaliers et diverses confiseries l'emploi de la pâte de dattes comme farce est fréquent, dont le taux d'humidité est de 20-23% et l'activité de l'eau est $<0,6$.

En outre, la pâte de dattes est utilisée en substitution du saccharose dans les produits précédents et cela améliore leur qualité nutritionnelle en augmentant les niveaux de minéraux, de vitamines et d'antioxydants phénoliques.

En Algérie, le sirop de datte est largement répandu dans les zones du sud. Il est utilisé comme confiture, édulcorant pour certaines recettes traditionnelles locales et même comme remède pour certaines ulcérations et infections.

La fabrication de confitures et de beurre de datte utilise les dattes avec une haute teneur en sucre (avec 65% de sucre, 1% de pectine et un pH entre 3.0-3.2).

Certaines communautés rurales utilisent le noyau de datte torréfié et en poudre comme substitut de café, tel en Arabie Saoudite et Émirats arabes unies, où des préparations café-like à partir de dattes sont disponibles. Ghnimi et *al.* [43] ont réalisé une préparation café-like à base de noyau de datte torréfié et l'ont comparé au café traditionnel arabe. Le résultat est une boisson décaféinée avec une quantité en phénols inférieure à celle du café arabe. Une évaluation de l'effet oestrogénique est requise avant d'autoriser la consommation humaine des noyaux de datte torréfiés.

DEUXIÈME PARTIE

Stress oxydant et peroxydation des lipides

Radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutes fois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la théorie dite « Free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains Mc. Cord et Fridovich isolent à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant de la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une immense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants [48].

1. Le stress oxydatif

Naturellement, le corps humain et lors de ses activités cellulaires physiologiques, génère un grand nombre de molécules hautement oxydantes, il s'agit de molécules instables appelés « radicaux libres ». Un radical libre est une molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non pairés dans ses orbitales. Il retrouvera sa stabilité en participant à des réactions chimiques dont la conséquence est l'oxydation des lipides membranaires, l'oxydation des acides aminés composant les protéines et l'oxydation des glucides composant les acides nucléiques [49].

Le stress oxydatif se définit donc comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants [50]. Il se développe lorsque les radicaux libres sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme.

Bien que les radicaux libres aient la capacité d'infliger des dommages irréversibles aux macromolécules, ils ont un rôle essentiel à jouer dans certaines fonctions biologiques telles la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques. Toutefois, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant de sérieuses altérations aux cellules pouvant mener à la mort cellulaire [51].

Les radicaux libres impliquant un ou des atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'anion superoxyde (O_2^-) est la forme primaire des ERO et est formée par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). L'anion superoxyde peut ensuite être converti en ERO secondaires telles que le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier n'étant toutefois pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non pairés. Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote, le monoxyde d'azote (NO) et le peroxyde d'azote ($ONOO$) étant deux espèces bien connues [49]. Alors que les espèces réactives de l'oxygène induisent un stress oxydatif, les espèces réactives de l'azote induisent pour leur part un stress azoté.

1.1. Le stress oxydatif comme facteur de risque des maladies chroniques

La génération d'espèces réactives de l'oxygène et d'autres radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire est un processus normal et nécessaire qui est idéalement compensé par un système antioxydant endogène élaboré. Toutefois, en raison de différentes situations environnementales et pathologiques ainsi que certaines habitudes de vie, un excès de radicaux libres peut s'accumuler, résultant à un stress oxydatif [52].

La conséquence majeure de ce dernier est le dommage qu'il cause aux bases des acides nucléiques, aux lipides et aux protéines, lequel peut sévèrement compromettre la santé et la viabilité d'une cellule ou induire une variété de réponses cellulaires par la génération d'espèces réactives secondaires et ultimement, mener à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose.

Un dommage oxydatif à une seule de ces biomolécules peut, théoriquement, contribuer au développement d'une maladie [53]. Une quantité croissante d'évidences scientifiques suggère que le stress oxydatif soit relié aux mécanismes pathophysiologiques primaires ou secondaires d'une multitude de maladies chroniques et aiguës. Cette relation est appuyée par des expérimentations qui ont démontré, *in vitro*, qu'il était possible de créer un processus dégénératif par le stress oxydatif [52]

Les ERO ont également été identifiées comme étant l'agent causal de la perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, l'ischémie cérébrale, la

commotion cérébrale, la maladie de Parkinson, la sclérose amyotrophique latérale et dans le processus de vieillissement du cerveau en soi [54]. Bien que certaines maladies puissent être causées par des dommages oxydatifs aux protéines, à l'ADN ou aux lipides, le stress oxydatif peut parfois être une conséquence et non la cause du processus primaire du développement de la maladie. Toutefois, en tant qu'évènement secondaire, le stress oxydatif joue un rôle important dans la progression de nombreux problèmes de santé [52]. Il a été reconnu que plus d'une centaine de maladies sont associées aux radicaux libres, ces derniers contribuant au vieillissement cellulaire, à la mutagenèse, à la carcinogenèse, aux maladies coronariennes et autres pathologies cardio-vasculaires, au diabète type I et II, à la dystrophie musculaire et à la neurodégénérescence [51].

1.2. Principaux dommages oxydatifs dans l'organisme

1.2.1. Dommmages oxydatifs à l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures de brins, des pontages (*cross-links*) inter et intra brin et des pontages protéine-ADN [55].

1.2.2. Dommmages oxydatifs aux protéines

Lorsque des radicaux libres réagissent avec des protéines saines, plus précisément avec le groupement radical (chaîne latérale) des acides aminés, il en résulte la formation de groupement carbonyles. Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, pour mesurer les dommages oxydatifs effectués aux protéines [53 ; 56]. La grande stabilité chimique des protéines carbonylées en fait une cible intéressante pour les mesures en laboratoire. La quantification des protéines carbonylées est aussi un test sensible et spécifique [57]. Parmi les marqueurs plasmatiques, on retrouve également la sulfoxydation de la méthionine et les produits de la tyrosine [58].

1.2.3. Domages oxydatifs aux lipides

Alors que l'oxydation des lipides représente l'utilisation du substrat énergétique, la peroxydation des lipides est la dégradation des acides gras membranaires. Elle constitue par conséquent un indice de dommages oxydatifs effectués aux lipides. La peroxydation lipidique génère une variété de produits de décomposition relativement stables, principalement des aldéhydes α , β -insaturés tels le malondialdéhyde, le 4-hydroxy-2-nonéanal, le 2-propéanal et les isoprostanes qui peuvent être mesurés dans le plasma et l'urine comme marqueurs indirects de stress oxydatif. Le dosage des F2-isoprostanes est actuellement considéré comme l'approche la plus rigoureuse pour évaluer les niveaux de peroxydation lipidique causée par les radicaux libres *in vivo*. Les données disponibles indiquent que la quantification des F2-isoprostanes dans le plasma ou dans l'urine donne un indice de stress oxydatif hautement précis et approprié [53].

1.2.4. Domages oxydatifs aux lipoprotéines

« Les lipoprotéines sont de grands complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, qui transportent massivement les lipides dans tout l'organisme ». La coque externe est une mono couche de phospholipides contenant du cholestérol et une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines (Apo-A, Apo-B, etc.) ; la partie centrale contient des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles. Les lipoprotéines de basse densité (ou LDL pour Low density-lipoprotein) sont un groupe de lipoprotéines de types et de tailles variables (18 à 25 nm de diamètre), qui transportent le cholestérol, libre ou estérifié, dans le sang et à travers le corps pour les apporter aux cellules. Les LDL sont produites par le foie à partir des lipoprotéines de très basse densité (ou VLDL). Elles portent des apolipoprotéines *B-100* et des vitamines antioxydantes (vitamine E et caroténoïdes) [59].

La mesure de l'oxydation des LDL peut s'effectuer de deux façons, soit par la mesure directe du nombre de molécules LDL oxydées, soit par la mesure de la susceptibilité des LDL à l'oxydation. Cette dernière est

réalisée in vitro dans des conditions oxydantes dans le but de déterminer un temps de latence qui représente le temps nécessaire pour que toutes les LDL présentes soient oxydées. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses méthodes ayant recours à un anticorps monoclonal ont été élaborées pour la mesure directe du nombre de LDL oxydées [59].

2. La peroxydation lipidique et ses mécanismes

La peroxydation lipidique est l'une des conséquences du stress oxydatif et aussi un relais pour sa propagation. C'est un phénomène qui conduit à la libération dans la cellule des composés réactifs, qui peuvent en particulier endommager l'ADN et présenter donc un risque génotoxique.

Lors de la peroxydation lipidique, deux familles de composés formés réagissent avec l'ADN. Il s'agit des hydro-peroxydes lipidiques intermédiaires et des aldéhydes issus de leur décomposition.

Les hydro-peroxydes forment des radicaux peroxydes par action de métaux de transition [60]. Ces radicaux peuvent dégrader bon nombre de biomolécules [61]. Ils peuvent former des dommages oxydatifs de l'ADN par un mécanisme d'oxydation des bases à un électron [62]. Cependant, les hydro-peroxydes sont peu stables dans les conditions physiologiques ; leur diffusion dans le noyau, pour aller réagir avec l'ADN, est ainsi limitée [62].

Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique représentent une source de dommages de l'ADN bien plus importante. Eux, sont suffisamment stables pour pouvoir diffuser dans le noyau et réagir avec l'ADN [63; 64; 65; 66].

3. Moyens de défense contre le stress oxydatif

En guise de protection contre les ERO, qui sont très dommageables pour les cellules, ces dernières possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant résultant du métabolisme aérobie et que l'on appelle antioxydants [67]. Les antioxydants peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action.

- 3.1.** La superoxydodesmutase SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires qui possède une fonction antioxydante. En fait, elle est l'enzyme antioxydante contre les O_2^- la plus importante dans toutes les cellules vasculaires [68].

L'absence de cette enzyme est létale et une trop grande quantité, durant un stress oxydatif, entraîne une production d' H_2O_2 excessive qui devient rapidement toxique pour la cellule. La quantité de SOD produite est contrôlée par des gènes spécifiques sensibles aux réactions d'oxydo-réduction [68].

- 3.2.** Le glutathion (GSH) est un antioxydant non enzymatique synthétisé à partir de la cystéine, du glutamate et de la glycine et nécessite de l'ATP [63].

Les glutathions peroxydases sont présentes dans le cytoplasme où elles jouent un rôle majeur dans la régulation de l'état d'oxydoréduction intracellulaire dans les cellules vasculaires [68]. On peut retrouver le glutathion sous deux formes, soit la forme thiol-réduite (GSH) ou bien sous la forme oxydée où une molécule de GSH peut se fixer à un thiol d'une autre molécule (R-SSG) ou d'un autre GSH (GSSG). Cette dernière forme oxydée se retrouve sous forme disulfure suite à la réduction du H_2O_2 et d'autres peroxydes en eau ($ROOH$ ou $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$) et ce, aux niveaux cytosolique et mitochondrial [69; 70; 71].

- 3.3.** La catalase est une enzyme intracellulaire de l'hème qui catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par les SOD) [68].

Elle se retrouve normalement dans les peroxyosomes, mais pour les cellules ne possédant pas cette organelle (ex : les érythrocytes) l'enzyme se situe dans le cytoplasme. La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif dans le développement d'une tolérance au stress oxydatif dans la réponse adaptative des cellules [68].

- 3.4.** Les antioxydants non enzymatiques :

Sont des molécules qui proviennent généralement de l'alimentation et/ ou médicaments. Les plus connus et abordés par la littérature sont les suivants :

3.4.1. La vitamine C

C'est un antioxydant hydrosoluble qui réduit les superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$) et les peroxydes ($ROO\bullet$). Elle devient donc oxydée à son tour et est ensuite réduite par le système du glutathion. Elle se retrouve en grande concentration dans le foie, le cerveau, la rate, le pancréas et les glandes hypophysaires et surrénales [72].

3.4.2. La vitamine E

Un puissant antioxydant liposoluble. Bien qu'elle existe sous diverses formes dans les aliments (α -, β -, γ -, δ -tocophérols et -tocotriénols), c'est la forme α -tocophérol qui est la plus répandue *in vivo* puisque la protéine de transfert du tocophérol (α -TTP) hépatique, permettant de véhiculer le tocophérol vers le plasma, a plus d'affinité avec l' α -tocophérol qu'avec les autres formes de vitamine E [73]. Cette vitamine réduit les radicaux peroxydes et hydroxyles en leur livrant un électron, ce qui permet d'empêcher et d'arrêter le processus de peroxydation des lipides et d'autres molécules. La vitamine E devient donc oxydée et sera réduite à l'aide de la vitamine C afin de retrouver son pouvoir antioxydant. Elle se retrouve dans les lipoprotéines, les membranes cellulaires et les fluides extracorporels [72].

3.4.3. Les carotènes

Sont la seule forme de vitamine A possédant un pouvoir antioxydant et d'origine végétale seulement. Ils sont liposolubles et se retrouvent dans les membranes cellulaires des tissus et des lipoprotéines [74]. La forme la plus connue est le β -carotène, sans parler des autres de plus en plus étudiées : lycopène, lutéine et zéaxanthine. Le β -carotène réagit davantage avec l'oxygène singulet ($\dot{A}O_2$: oxygène excité), un autre type de ERO, ainsi que les radicaux peroxydes [74].

En outre, une grande famille de métabolites secondaires fait de nos jours l'objet d'un nombre très importants de recherche grâce à son pouvoir antioxydant hautement apprécié : les polyphénols.

TROISIÈME PARTIE

Les polyphénols

Les plantes produisent un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont la structure n'a été identifiée que récemment, malgré la large utilisation des plantes, depuis l'antiquité, en médecine traditionnelle et en phytothérapie [75].

Dans le passé, la plupart de ces composés ont été classés comme des métabolites secondaires parce qu'ils n'ont pas semblé avoir une fonction claire dans les organismes qui les produisent. De nos jours, il a été reconnu que même si ces molécules ne sont pas indispensables pour la croissance et la reproduction des plantes, elles jouent un rôle très important dans plusieurs fonctions biologiques. Beaucoup de composés secondaires sont maintenant connus non seulement en raison de leur rôle protecteur contre les effets nocifs de la lumière UV ou d'autres facteurs abiotiques, mais également en tant que défenseurs contre les herbivores et les microbes pathogènes. De plus, ils sont reconnus pour aider au processus de pollinisation, ou même à titre de molécules clés dans beaucoup de processus physiologiques d'importance pour les plantes. Par ailleurs, beaucoup de métabolites secondaires permettent d'augmenter les perspectives de la survie des plantes en interaction avec l'environnement [76].

Un des groupes largement distribués de ces métabolites secondaires : les composés phénoliques. Il s'agit d'un groupe très répandu et est représenté par divers types de composés définis comme des composés aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique.

1. Caractéristiques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués et connus par leurs nombreuses propriétés bénéfiques, notamment antioxydantes et anti-inflammatoires. Synthétisées par les végétaux, ces molécules possédant plusieurs groupements phénoliques, avec d'autres fonctions [77], allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tel que les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [78].

Une des particularités des polyphénols réside dans leur incroyable diversité, puisque l'on dénombre à l'heure actuelle plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 pour la sous classe des flavonoïdes [79].

En fonction de leur structure chimique, les polyphénols sont classés en plusieurs familles et principalement en 6 grandes classes largement connues sous le nom des flavonoïdes, qui regroupe : les anthocyanines, les flavones, les flavan-3-ols, les flavonoles, les flavanones et les isoflavones [80]. Les acides phénoliques sont représentés par deux classes principales : les acides benzoïques et les dérivés de l'acide cinnamique. En dernier, la classe des tanins qui sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines [81] (annexe I).

2. Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés au sein des cellules végétales. Cette biosynthèse s'effectue de manière tissu- dépendante, à partir de la dégradation des carbohydrates produits par le cycle de Calvin [82].

Ces carbohydrates peuvent être mobilisés pour produire des polyphénols par la voie de la glycolyse ou celle des pentoses phosphates qui produit le glycéraldéhyde 3-phosphate (le précurseur initial de la glycolyse). À la fin de la glycolyse, Le pyruvate obtenu entre dans le cycle de l'acétate/malonate et forme le malonyl-CoA, le précurseur des stilbènes, flavonoïdes et aussi les curcuminoïdes et autres. Le phosphoénolpyruvate (précurseur intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose-4- phosphate (de la voie oxydative des pentoses phosphates) peuvent entrer dans la voie des shikimates, produisant ainsi l'acide shikimique, qui est le précurseur des acides aminés aromatiques des tanins, des lignanes et des acides phénoliques (en rentrant dans la voie des précurseurs phénylpropanoïde : comme le malonyl-CoA) [82 ; 83 ; 84].

3. Métabolisme et Biodisponibilité des polyphénols:

Comme tout nutriment, les composés phénoliques empruntent différentes voies au niveau de l'intestin. La structure chimique de chaque molécule ainsi que son poids moléculaire influent en grande partie le schéma d'absorption et de métabolisation de cette dernière. Les polyphénols de faible poids moléculaire sont les mieux absorbés au niveau du petit intestin tandis que les molécules à structures complexes (oligomériques et polymériques) y seront faiblement absorbées et sont intactes durant le transit et atteindront le colon de façon intacte [85].

Au niveau de l'intestin, environ 5 à 10% des polyphénols y sont principalement absorbés [86]. Le reste sera hydrolysé une fois arrivé à la partie distale de l'intestin par la flore intestinale.

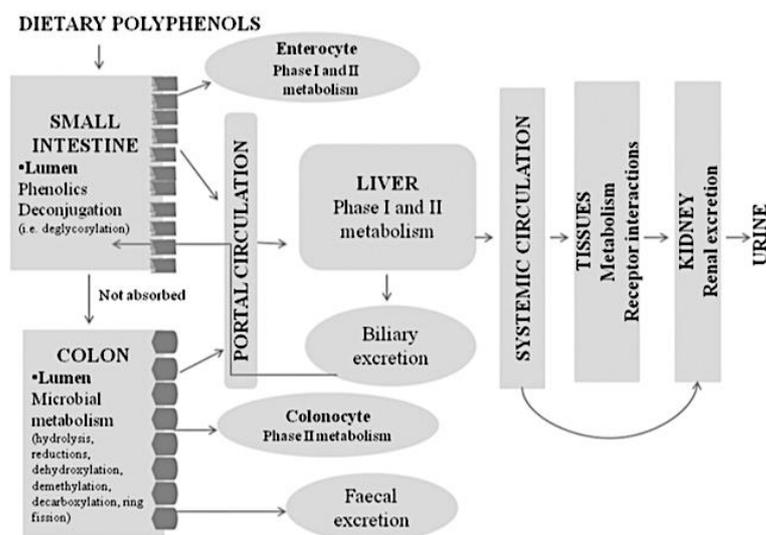


Figure 1.6 : Métabolisme des Polyphénols [85].

La biodisponibilité d'une molécule se définit généralement par la quantité ou la fraction ingérée et qui est absorbée via la barrière intestinale.

La biodisponibilité des polyphénols varie très largement d'une molécule à l'autre. Après avoir été absorbés à travers la barrière intestinale et se retrouvant dans le sang, leur concentration plasmatique est maximale environ 2 heures après leur consommation. Cette concentration diminue ensuite pour atteindre une valeur nulle 6 à 9 heures plus tard. Elle ne peut être maintenue élevée que par une consommation renouvelée au cours de la journée [87].

Les polyphénols ingérés pénètrent dans les tissus et organes, en particulier au niveau des sites de métabolisation tel que l'intestin et le foie. En effet, des études menées avec des polyphénols marqués (quercétine, épigallocatechine, quercétine 4'-glucosideresvératrol, cyanidine 3-glucoside) ont montré que, 1 à 6 heures après l'ingestion, la radioactivité était principalement détectée dans le sang et les organes du système digestif. Toutefois, les polyphénols ont également été détectés dans des organes tels que le cerveau, le cœur, les reins, le thymus, le pancréas et la prostate [88, 89].

A la fin, les polyphénols sont éliminés par voies biliaire et urinaire [90], cela dépend principalement de la structure des molécules. Les taux urinaires représentent 1 à 25 % des doses ingérées en fonction de la nature des polyphénols [90]. La voie biliaire est particulièrement impliquée dans l'élimination de polyphénols hautement conjugués. Ces composés excrétés dans les acides biliaires peuvent être hydrolysés à nouveau par la flore intestinale et réabsorbés par la voie de recyclage entéro-hépatique [85].

La quantité de métabolites excrétés dans les urines est corrélée à la concentration plasmatique maximale des polyphénols. L'excrétion urinaire varie d'une molécule à l'autre et peut aller de 0,3 à 43 % de la dose ingérée (pour 50 mg d'aglycone). Cette excrétion est faible pour les anthocyanes, les flavanols et les flavonols et particulièrement élevée pour les acides phénoliques et les isoflavones [88, 91].

4. Rôle et bienfaits des polyphénols

Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les pathogènes ou le rayonnement UV [92]. Souvent présents en grandes quantités dans les plantes consommées par les herbivores, ils limitent leur appétence et digestibilité. Ils ont donc été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels [93]. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et de leurs effets présumés sur la santé. Les recherches sur les effets santé des polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants [92 ; 94].

En tant qu'antioxydants, tous les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions

de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.) [85]. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telles que cancers, maladies cardio-vasculaires ou ostéoporose.

Ils ont aussi des propriétés spécifiques (affinité pour des récepteurs cellulaires comme les récepteurs des estrogènes, impact sur la signalisation cellulaire) qui induisent des réponses cellulaires très diverses. La somme de ces effets se traduit par des effets santé que l'on commence tout juste à comprendre à travers les expérimentations animales et cliniques.

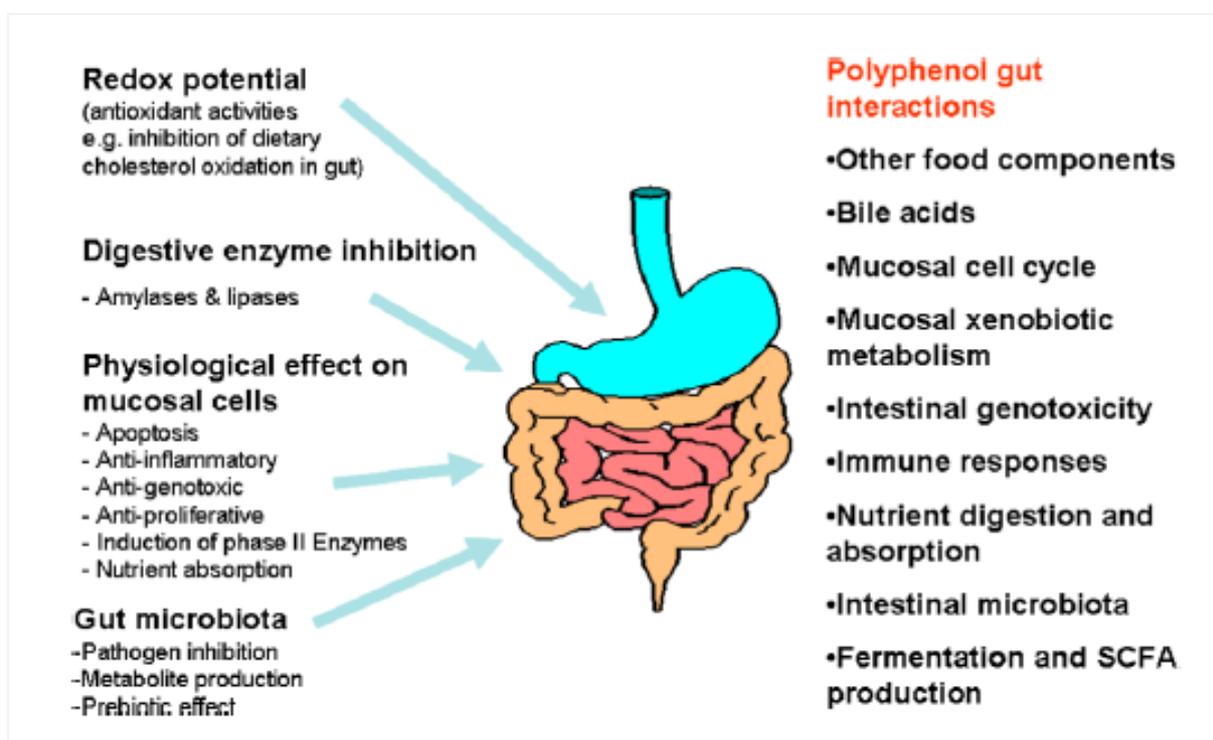


Figure 1.7 : Principaux effets des polyphénols végétaux sur l'intestin humain [96].

En effet, et autre que leurs propriétés antioxydantes, des propriétés bénéfiques des polyphénols pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux pour n'en citer que quelques-uns [97]. Ils peuvent également participer à la bonne conservation de certains aliments transformés, comme l'huile d'olive, en limitant l'oxydation des lipides qu'ils contiennent [98].

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'évolution de la composition physico-chimique des dattes lors des différents stades de maturité a fait l'objet de plusieurs travaux. C'est au cours de la maturation que s'élabore la qualité physico-chimique et organoleptique (accumulation de sucres et d'acides, production d'arômes,..). La maturation phénolique représente donc un processus très important lors de la formation de la baie de datte. C'est grâce à la maturation que les composés phénoliques deviennent biodisponibles pour l'organisme.

Cette partie présente l'ensemble des réactifs, du matériel et des méthodes analytiques utilisés au cours de chaque étape de notre étude. Dans le but de bien réaliser notre recherche, nous étions amenés à diviser ce travail en trois grandes parties. Le schéma suivant explique en détail les principales étapes de notre travail :

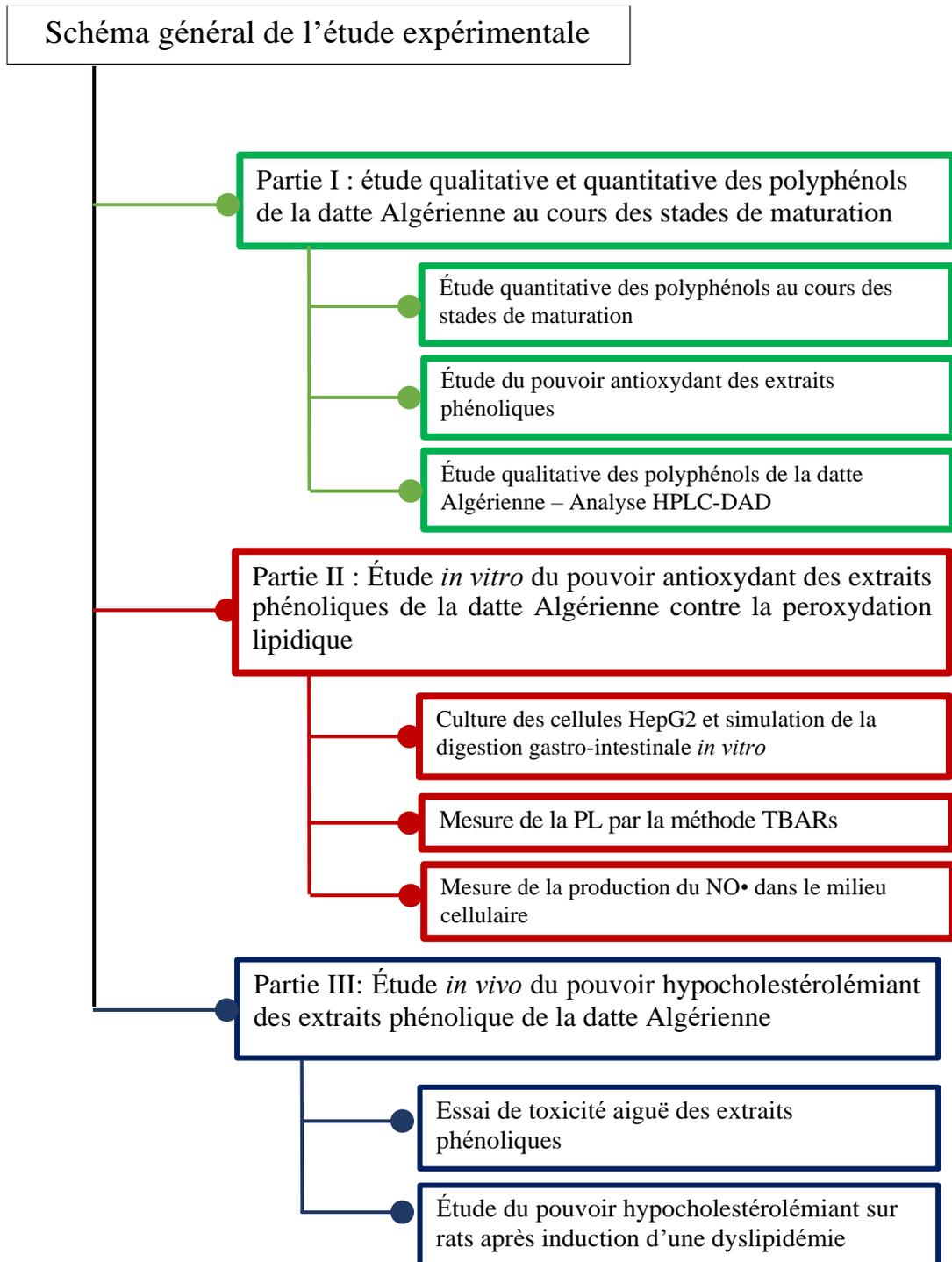


Figure 2.1 : Démarche expérimentale.

PREMIÈRE PARTIE

Caractérisation biochimique des antioxydants et étude de la maturation phénolique de trois variétés de dattes algériennes (*Phoenix dactylifera* L.)

Après avoir réalisé une étude bibliographique étendue sur le présent thème, la matière première a été collectée, et ce durant les différents stades de maturité : Kimri, Khalal, Routab et Tamr. La récolte a été effectuée dans les palmeraies de la Wilaya de Biskra (année 2013-2014), sous la direction de l'institut technique du développement de l'agronomie saharienne (ITDAS). La première partie du protocole expérimental a été entamée au sein du laboratoire de la technologie alimentaire, Département de Technologie alimentaire, Université El Hadj Lakhdar, Batna.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour la réalisation de la première partie de notre recherche était essentiellement les trois principales variétés de dattes Algériennes : Deglet Nour, Degla Baïda et Ghars. Les variétés retenues pour la réalisation de notre étude représentent les trois principales classes (selon textures) du fruit du palmier dattier : les dattes molles (GH), semi-molles (DN) et dures (DB). La matière première a été collectée durant les différents stades de maturité : Kimri, Khalal, Routab et Tamr. La récolte des échantillons a été effectuée sous la supervision de Dr. Malek BELGUEDJ, directeur de l'institut technique du développement de l'agronomie saharienne (ITDAS).

1.2. Réactifs chimiques

Tous les produits chimiques et réactifs utilisés étaient de haute qualité analytique avec faible taux d'impureté et/ou de grade HPLC. L'eau a été traitée dans un système de purification d'eau Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) avant utilisation. Acétonitrile, méthanol et acétone étaient de grade HPLC (Carlo Erba, Milan, Italie). Les standards utilisés pour l'identification et quantification des acides phénoliques et des flavonoïdes étaient l'acide gallique, l'acide vanillique, acide chlorogénique, acide férulique et quercétine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

2. Méthodes analytiques

2.1. Caractérisation quantitative et étude de la maturation phénolique des trois variétés de dattes algériennes

2.1.1. Extraction des polyphénols

La pulpe de datte (100 ± 1 g) a été homogénéisée à l'aide d'un Ultraturrax (IKA, Germany) puis mélangée avec 300 mL de méthanol-eau (4 : 1, v / v) [99]. L'extraction a été réalisée à température ambiante pendant 3 h à l'aide d'un agitateur orbital. Les extraits ont été filtrés et centrifugés à 4000 g pendant 10 min et le surnageant a été concentré sous pression réduite à $40 \pm 2^\circ$ C en utilisant un évaporateur rotatif (IKA RV 10 digital, Germany). L'extrait de datte brut est conservé dans des bouteilles en verre foncé et conservé au congélateur jusqu'à utilisation.

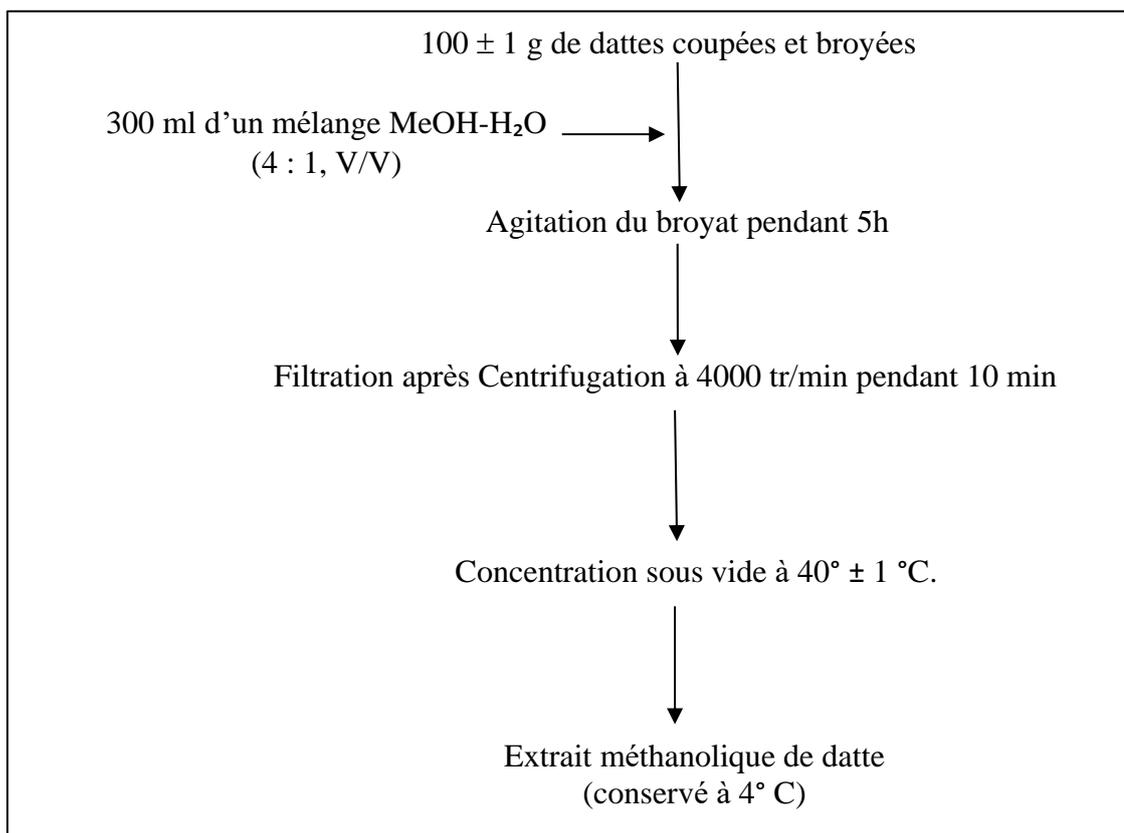


Figure 2.2 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique de datte [99].

2.1.2. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu [37].

La concentration des composés phénoliques totaux a été mesurée comme décrit par Singleton et Rossi [100]. En bref, 300 μL d'extrait méthanolique de datte et une solution d'étalonnage d'acide gallique (0-0,17 mg/mL) ont été ajoutés à 25 flacons volumétriques. De l'eau bi-distillée a été utilisée comme blanc. Environ 1500 μL de réactif phénolique de Folin-Ciocalteu dilué (1 :10) ont été ajoutés au mélange et agités. Après 5 min, 1200 μL de solution aqueuse de Na_2CO_3 (7,5 g/100 mL) ont été ajoutés tout en mélangeant. Après incubation à l'obscurité pendant 90 min à $23^\circ \pm 1^\circ \text{C}$, les valeurs d'absorbance ont été lues à 765 nm contre une courbe d'étalonnage préparée simultanément (annexe II) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Jasco V-

530, Japan). La teneur phénolique totale a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) / 100 g FW.

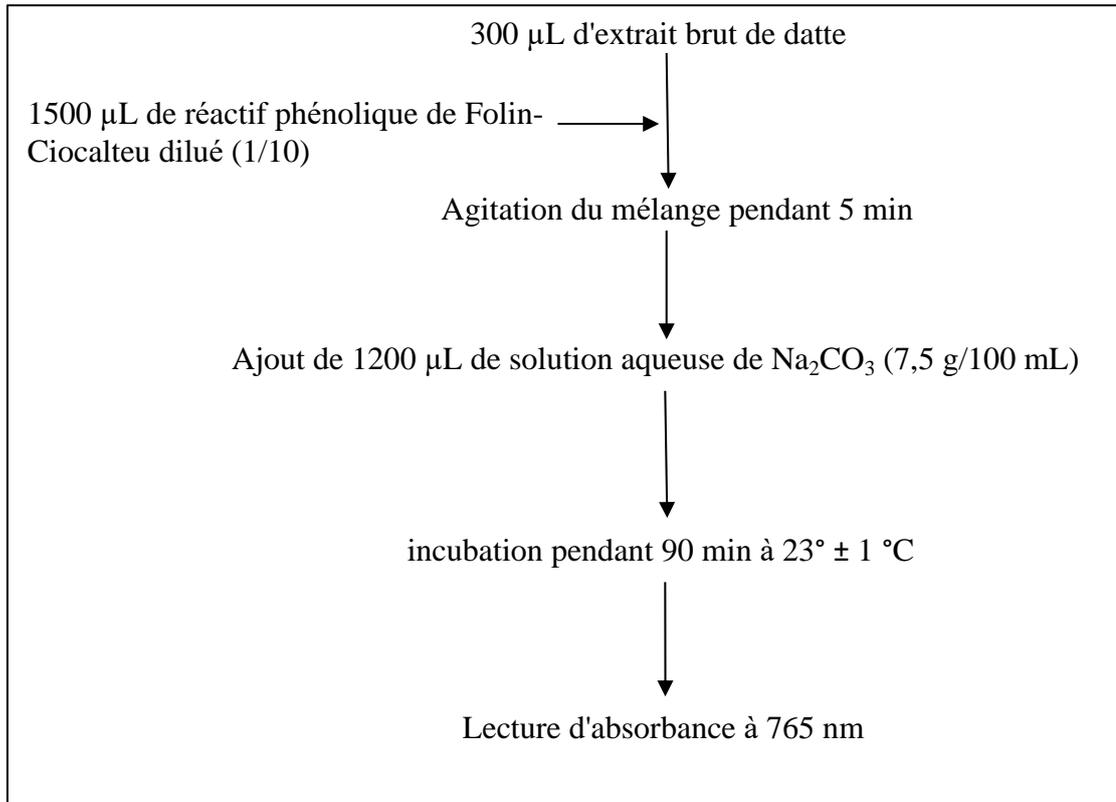


Figure 2.3 : Protocole de dosage des polyphénols totaux [100].

2.1.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée pour l'estimation des taux de Flavonoïdes dans les cinq variétés de dattes est celle décrite par Bahourun et *al.* [101]. Une gamme de 10 concentrations de quercétine allant de 0 à 40 µg / mL a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg/ mL de concentration (annexe II). 3 mL des extraits méthanoliques des trois variétés de dattes et de la solution d'étalonnage (quercétine) ont été ajoutés à 25 flacons volumétriques. De l'eau bi-distillée a été utilisée comme blanc.

Environ 1000 µL d'une solution méthanolique de chlorure d'Aluminium à 2% ont été ajoutés aux mélanges et agités. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

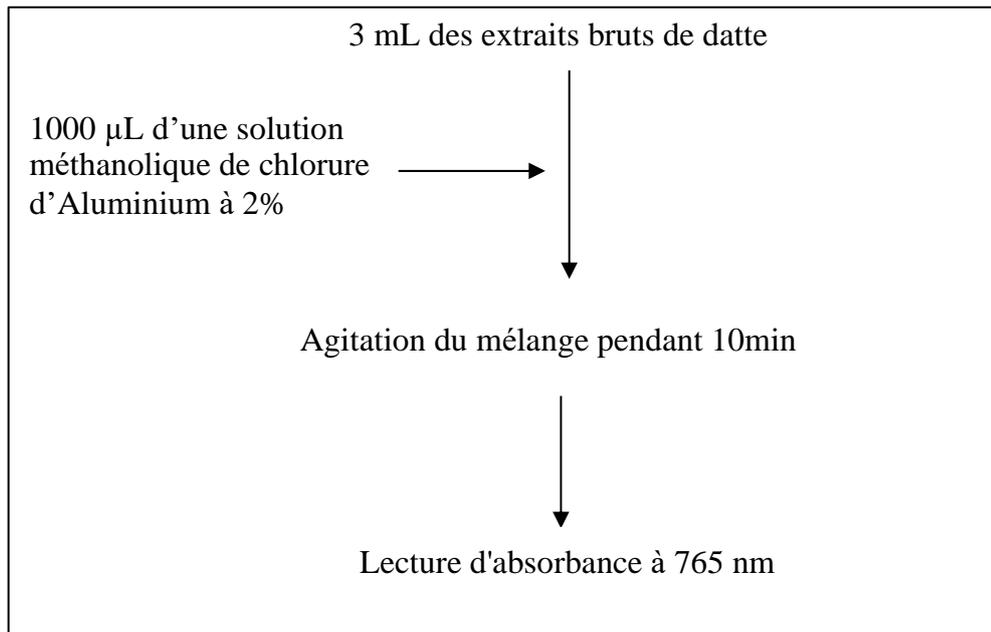


Figure 2.4 : Protocole de dosage des flavonoïdes [101].

2.1.4. Dosages des caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes totaux des extraits est déterminée selon la méthode rapportée par Talcott et Howard [102] avec quelques modifications. $2 \pm 0,02$ g de pulpe de dattes ont été homogénéisés puis, pour l'extraction des caroténoïdes, sont traités avec 25 mL du mélange acétone/éthanol (1:1, v/v) et 200 mg/L butyle- hydroxy toluène (BHT). La manipulation est réalisée à l'abri de la lumière car les caroténoïdes sont sensibles à cette dernière. Après extraction, l'échantillon est centrifugé à 1500g pendant 15 minutes à 4-5°C.

L'extraction est refaite pour le résidu plusieurs fois dans les mêmes conditions jusqu'à ce que le filtrat soit décoloré. A la fin, les surnageants sont récupérés dans une fiole de 100 mL. L'absorbance est lue à 470 nm. La concentration en caroténoïdes est estimée en mg/100g MS en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le β - carotène (gamme d'étalonnage en annexe II).

2.1.5. Mesure du pouvoir antioxydant au cours des différents stades de maturité

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits a été réalisée à l'aide de trois dosages différents. Pour chaque essai, un aliquote Trolox a été utilisé pour établir une courbe d'étalonnage à des concentrations allant de 200 à 1000 $\mu\text{mol/L}$. Toutes les données ont ensuite été exprimées en équivalent Trolox ($\text{mmol TE} / 100\text{g FW}$) (annexe II).

2.1.5.1. Pouvoir réducteur par l'indice FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)

Le test FRAP a été réalisé selon la méthode décrite par Benzie et Strain [103]. La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu [104]. Une solution de 10 mmol / L de TPTZ dans 40 mmol / L de HCl et de 12 mmol / L de chlorure ferrique a été diluée dans 300 mmol / L de tampon acétate de sodium (pH 3,6) dans un rapport de 1: 1: 10. Des aliquotes (20 μL) d'extrait brut des trois variétés de dattes (aux différents stades de maturation) ont été ajoutées à 3 mL de la solution FRAP et l'absorbance a été déterminée à 593 nm toutes les 5 min jusqu'à l'état d'équilibre.

2.1.5.2. Test de piégeage des radicaux au DPPH ((2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- α -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier le lien entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques.

Cette activité a été mesurée selon la méthode décrite par Brand-Williams et *al.* [105]. Des aliquotes (25 μL) d'extrait brut des trois variétés de dattes (aux différents stades de maturation) ont été ajoutées pour compléter un volume de 3 mL de solution de DPPH (6 x 10⁵ mol / L) et l'absorbance a été déterminée à 515 nm toutes les 5 min jusqu'à l'état d'équilibre.

2.1.5.3. Test du blanchiment de la β -Carotène

Ce test permet la mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits végétaux. En effet, L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder la β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge [106].

Brièvement, Une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme, ensuite 25 μ L de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rota-vapeur et 100 mL d'eau oxygénée sont ajoutés en agitant. À 5 mL du mélange précédent, 350 μ L de chaque extrait ont été ajoutés.

Les tubes à essai ont été incubés en obscurité à la température ambiante. Deux tubes contrôle ont été aussi préparés avec la même procédure, l'un contenant un antioxydant de référence le BHA (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ L de méthanol. L'absorbance est déterminée à 490 nm.

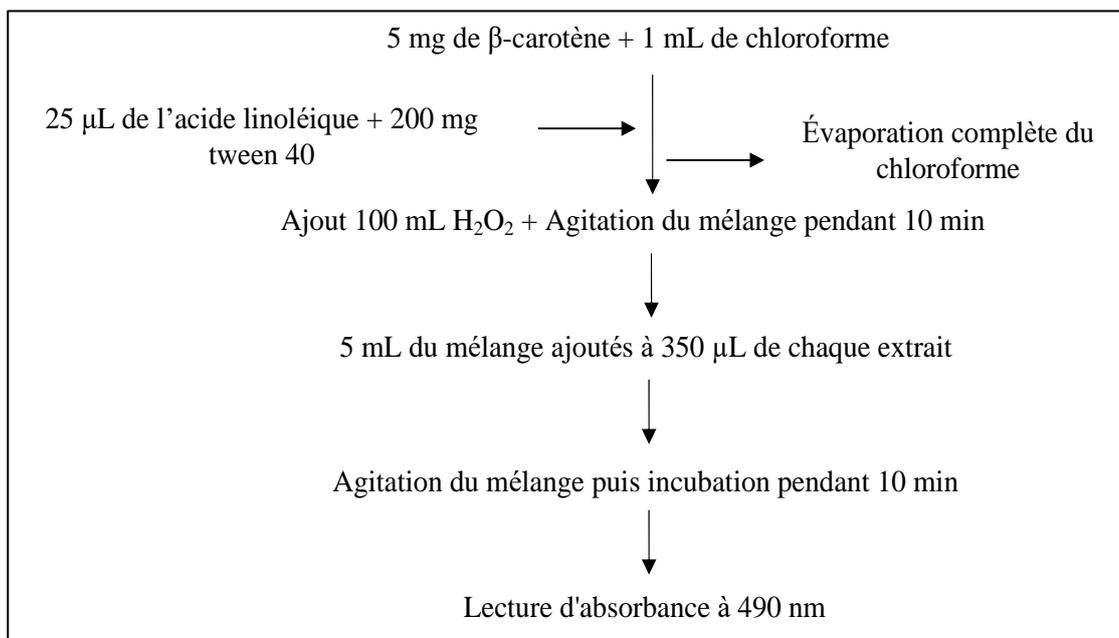


Figure 2.5 : Protocole du test du blanchiment de la β -Carotène [106].

2.2. Caractérisation qualitative des composés phénoliques des extraits de dattes à maturité par HPLC-DAD

2.2.1. Extraction des polyphénols

La pulpe de datte (100 ± 1 g) a été homogénéisée à l'aide d'un Ultra-turrax puis mélangée avec 300 mL de méthanol-eau (4: 1, v / v) [99]. L'extraction a été réalisée à température ambiante pendant 3 h à l'aide d'un agitateur orbital. Les extraits ont été filtrés et centrifugés à 4000 g pendant 10 min et le surnageant a été concentré sous pression réduite à $30^\circ \pm 1^\circ$ C en utilisant un évaporateur rotatif.

2.2.2. Purification des extraits

Les extraits bruts ont été filtrés à travers une cartouche Sep-Pak C18, préalablement activée avec du méthanol puis de l'eau (5 mL de chaque). Les composés phénoliques ont été adsorbés sur la colonne, tandis que les sucres, les acides et autres composés hydrosolubles ont été élués avec 5 mL d'eau [107]. Les composés phénoliques ont ensuite été récupérés avec 1 mL de méthanol acidifié et passés à travers un filtre à pores de $0,45 \mu\text{m}$, avant d'être analysés par HPLC pour identification et quantification.

2.2.3. Mesure du pouvoir antioxydant

Comme l'utilisation de plusieurs méthodes photométriques pour mesurer l'activité antioxydante des extraits végétaux est fortement recommandée, et en plus des méthodes décrites précédemment (les tests FRAP et DPPH), nous avons choisis un autre test, qualifié de sensible, pour évaluer l'activité antioxydante des extraits purifiés des différentes variétés de dattes mûres.

2.2.3.1. L'indice FRAP (voir section 2.1.5.1.)

2.2.3.2. Test de détection des radicaux au DPPH (voir section 2.1.5.2.)

2.2.3.3. Essai ABTS.

Ce test est basé sur la capacité d'une molécule à réduire le radical ABTS•+, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

Ce test a été réalisé selon le protocole décrit par Turoli et *al.* [108]. La solution de cation radicalaire ABTS (ABTS +) a été préparée par la réaction de 7 mM d'ABTS et de 2,45 mM de persulfate de potassium, après incubation à $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C dans l'obscurité pendant 16 h. La solution ABTS + obtenue a été diluée avec de l'éthanol à 80% pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,005$ à 734 nm. Un aliquote de la solution ABTS + (3,9 mL; absorbance de $0,700 \pm 0,005$) a été ajoutée à 0,1 mL de l'extrait purifié de chaque variété de datte puis mélangé vigoureusement. Ce mélange réactionnel a été laissé au repos à $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C pendant 6 min et l'absorbance à 734 nm a été immédiatement enregistrée face à la gamme d'étalonnage Trolox préparée simultanément (annexe II).

2.2.4. Analyse par HPLC-DAD

L'étude de la composition phénolique des différentes variétés de dattes utilisées a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur DAD (Diode Array Detector).

Les méthodes chromatographiques représentent un moyen très fiable et flexible pour l'identification des composés phénoliques des extraits végétaux.

2.2.4.1. Mise en place du système chromatographique pour l'analyse des échantillons

L'établissement du profil phénolique de différents extraits a été réalisé en utilisant un système LC-DAD (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA). Le protocole analytique a été réalisé en suivant celui adapté par Eid et *al.* [109]. Les extraits de dattes ont été séparés en utilisant une colonne C18 NovaPak (250 mm × 4,6 mm, taille de particule 5 µm), équipée d'un support de garde C18 NovaPak (Waters Ltd., Elstree, UK). La phase mobile était constituée de (A) de l'acide chlorhydrique 5 M (0,1%) dans du méthanol aqueux à 5% et (B) de l'acide chlorhydrique 5 M (0,1%) dans de l'acétonitrile aqueux (1: 1) et a été pompée à travers la colonne à un débit égale à 0,7 mL/min. Les échantillons (50 µL) ont été injectés et séparés en utilisant le système de gradient suivant (min /% B): 0/5, 5/5, 40/50, 55/100, 59,9 / 100 et 60/5 pour la détection de tous les composés. L'éluant a été contrôlé par détection du réseau de photodiodes (DAD) à 254, 280 et 320. L'identification des composés phénoliques a été réalisée en comparant les spectres obtenus et les temps de rétention avec ceux obtenus pour les standards.

2.2.4.2. Établissement des gammes d'étalonnages des polyphénols de référence

Cinq polyphénols de références ont été utilisés pour l'établissement de la gamme étalon : acide galic, quercetine, acide chlorogénique, acide ferulique et acide vanilique. Les gammes étalons ont été utilisées pour la réalisation des chromatogrammes de référence, et ce dans des concentrations comprise entre 0 et 1 mg/mL à partir de trois solutions mères différentes pour chaque composé.

Les chromatogrammes ci-dessus représentant les pics obtenus pour chaque standard sont illustrés dans l'annexe II.

DEUXIÈME PARTIE

Étude du pouvoir antioxydant des trois variétés de dattes algériennes sur la peroxydation lipidique – Étude *in vitro* sur cultures cellulaires HepG2

Cette partie de notre recherche a été réalisée dans le cadre d'une collaboration d'apprentissage et de formation entre le centre national de recherche en biotechnologie de Constantine et l'université de Naples Federico II.

Le travail a été réalisé entre le département de Pharmacie sous la supervision du Dr. Gian Carlo Tenore et Pr. Ettore Novellino (analyses HPLC et simulation de la digestion gastro-intestinale *in vitro*), et l'institut de Médecine de l'université de Naples. Les cultures cellulaires et l'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits ont été réalisées au sein des laboratoires du département de Biochimie, Biophysique et Pathologie Générale sous la supervision du Pr. Paola Stiuso

1. Matériel végétal

Lors de cette deuxième partie de notre recherche, nous avons utilisé les mêmes variétés de dattes (Deglet Nour, Degla Baïda et Ghars) à maturité. A titre comparatif, la variété Adjwa d'Arabie Saoudite a été également utilisée.

2. Matériel biologique

Les cellules HepG2 sont une lignée cellulaire qui provient d'un tissu hépatique humain présentant un carcinome hépatocellulaire (CHC). Cette lignée est souvent utilisée pour les études sur le métabolisme et la toxicité des médicaments.

La lignée utilisée pour la réalisation de notre recherche provient de la collection « American type collection (HepG2, HB-8065 ATCC) ».

3. Réactifs chimiques et enzymes de digestion

Les produits chimiques et les réactifs utilisés pour simuler la digestion gastro-intestinale étaient le chlorure de potassium (KCl), le thiocyanate de potassium (KSCN), le phosphate monosodique (NaH_2PO_4), le sulfate de sodium (Na_2SO_4), le chlorure de sodium (NaCl), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3), l'urée, l' α -amylase, l'acide chlorhydrique (HCl), la pepsine, la pancréatine, les sels biliaires (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

4. Méthodes analytiques

4.1. Simulation de la digestion gastro-intestinale *in vitro*

Afin de pouvoir évaluer la biodisponibilité des composés phénoliques et leur pouvoir antioxydant sur les cellules HepG2, une simulation de la digestion gastro-intestinale est requise [110].

Les modèles biochimiques de digestion consistent à mimer les conditions physico-chimiques digestives. Ils reproduisent donc les deux principales étapes de la digestion se déroulant dans l'estomac et l'intestin grêle.

Afin de pouvoir parfaire le schéma de la digestion *in vitro*, nous avons reproduit les étapes de digestion sur trois principales étapes : digestion salivaire, gastrique et intestinale.

- La digestion salivaire

Les échantillons de dattes ($20 \pm 0,2$ g) ont été mélangés à 6 mL de salive artificielle composée de KCl (89,6 g/L), KSCN (20 g/L), NaH_2PO_4 (88,8 g/L), Na_2SO_4 (57,0 g/L), NaCl (175,3 g/L), NaHCO_3 (84,7g/L), urée (25,0 g/L) et 290 mg de α -amylase. Le pH de la solution a été ajusté à 6,8. Le mélange a été introduit dans un sac en plastique contenant 40 mL d'eau et homogénéisé dans un Stomacher 80 pendant 3 min.

- La digestion gastrique

Immédiatement, 0,5 g de pepsine (14.800 U) (enzyme digestive lyophilisée) dissous dans 10 mL de HCl 0,1 N ont été ajoutés, le pH a été ajusté à 2,0 avec du HCl 6 N, et le mélange était incubé à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ dans un agitateur orbital Polymax 1040 (250 tr / min) pendant 2h.

- La digestion intestinale

La digestion pancréatique était simulée comme suit: le pH a été augmenté à 6,5 avec NaHCO_3 0,5 N et 5 mL d'un mélange de pancréatine (8,0 mg/mL) et de sels biliaires (50,0 mg/mL) (1: 1; v / v), dissous dans 20 mL d'eau, ont été ajoutés et incubés à 37°C dans un agitateur orbital (250 tr /min) pendant 2h. Les surnageants (fractions gastro-intestinales : FGI) ont été lyophilisés et conservés à $-20^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Les composés phénoliques de chaque FGI ont été caractérisés (qualitativement et quantitativement) par les méthodes décrites précédemment.

Le diagramme ci-dessous résume les étapes de la digestion gastro-intestinale *in vitro* :

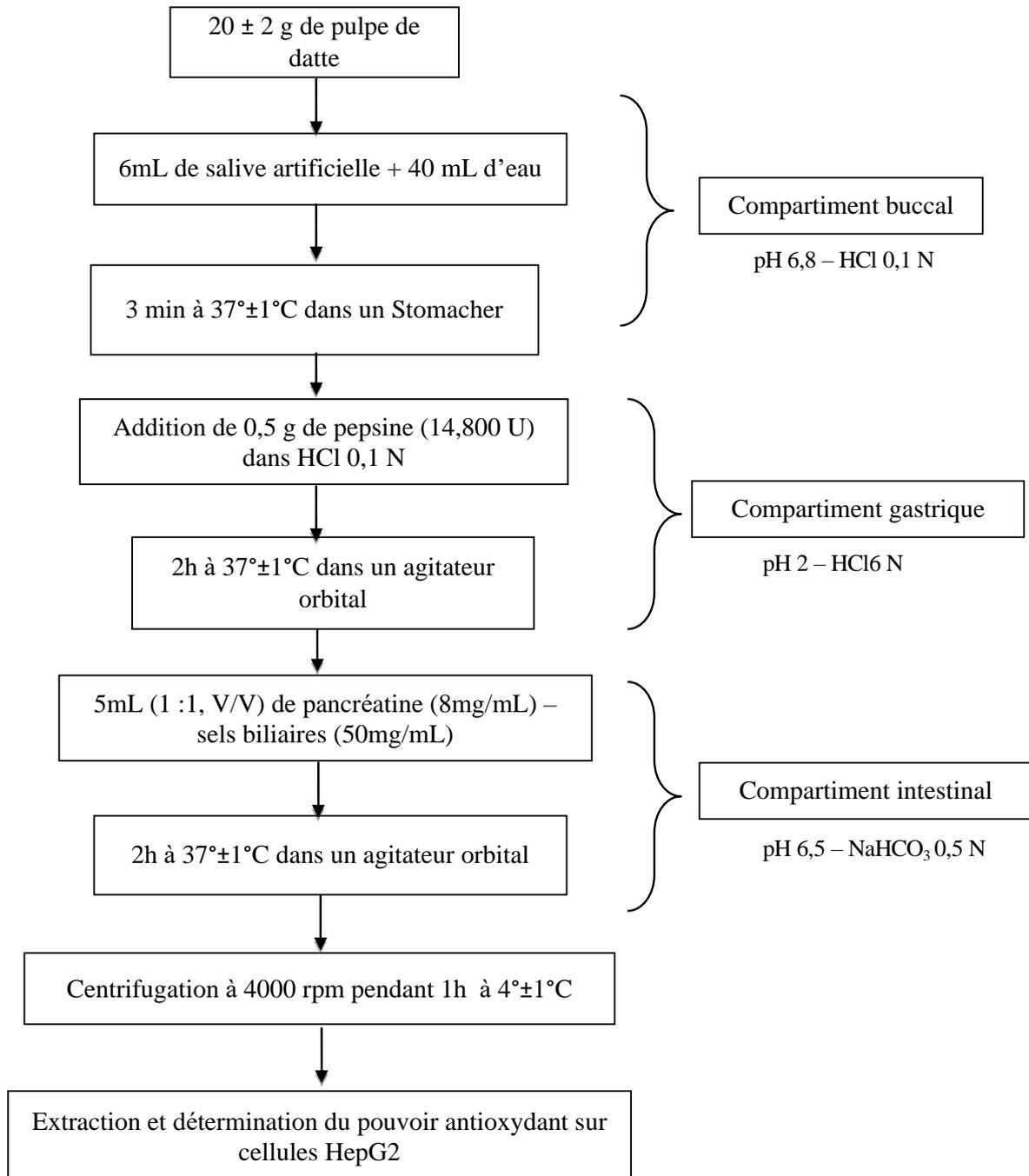


Figure 2.6 : Représentation schématique du modèle digestif *in vitro* [110].

4.2. La culture cellulaire

4.2.1. Mise en culture des cellules hépatiques HepG2

Des cellules de carcinome hépatocellulaire humain (HepG2, HB-8065) ont été obtenues à partir d'une sélection de culture cellulaire de type américain. Pour lancer la première mise en culture, les cellules sont décongelées très rapidement à partir de cultures conservées à $-80^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Flash freezer) dans un milieu de culture spécifique (20% DMSO). Après décongélation, les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1200 tpm. Le surnageant a été ensuite éliminé (contenant le milieu de culture et le DMSO qui devient toxique pour les cellules à température ambiante) et le culot était repris dans un nouveau milieu de culture. Des monocouches de cellules ont été cultivées dans des flacons T75 et maintenu en RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) complété avec 10% (v / v) de sérum bovin fœtal (FBS), 100 U/mL pénicilline, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycine, et 1% de L-glutamine. Le tout a été incubé à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 dans l'air [111].

Comptage des cellules :

Le comptage des cellules en culture cellulaire est une étape obligatoire qui permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur la culture cellulaire effectuée à un temps T. Aussi, elle nous permet la surveillance de l'état des cellules et le taux de prolifération pour la bonne reproductibilité et précision expérimentales.

Les cellules déjà cultivées dans des flacons T75 (ou parfois dans des boîtes de Pétri) ont été récupérées. Le milieu de culture a tout d'abord été éliminé et les cellules ont été lavées avec 3 mL du PBS stérile, qui a été éliminé par la suite également. Cette étape de lavage permet l'élimination des débris cellulaires. 1 mL d'une solution de trypsine a été ensuite ajouté aux cellules et le tout est incubé à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ pendant 15 min. une fois les cellules décollées, la culture a été centrifugée à 1200 tpm pendant 5 min, le culot (les cellules sédimentées) a été récupéré dans 2 mL du milieu de culture à 37°C .

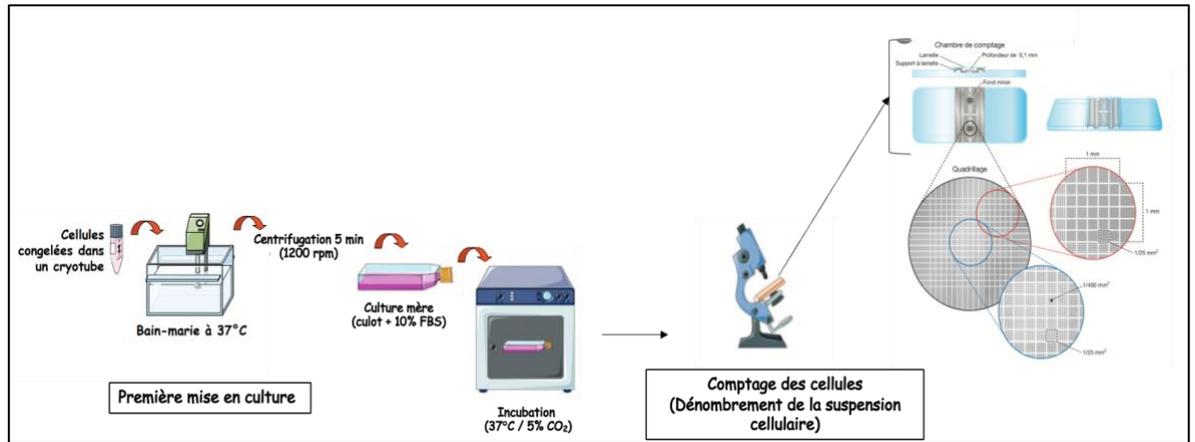


Figure 2.7 : Schéma de la première mise en culture avec comptage sous microscope des cellules hépatiques HepG2

A l'aide d'une pipette pasteur, l'échantillon a été placé dans une chambre de comptage des cellules. Seules les cellules avec un contour illuminé sont comptabilisées. La technique de comptage sera détaillée dans l'annexe II.

Les analyses effectuées sur les cellules ont été réalisées sur des microplaques de 96 puits à raison de 10 000 cellules et 500 000 cellules/puits. A 80% de confluence, les cellules sont traitées en triplicata pendant des durées d'exposition souhaitées.

Avant traitement des cellules, les FGI des différentes variétés de datte ont été reconstituées comme suit : 10 mg du lyophilisat ont été dilués dans 1 mL d'eau (stérile). Après homogénéisation, des dilutions ont été réalisées à partir des solutions mères de chaque fraction GI afin d'obtenir deux concentrations finales de 1 mg et 0,5 mg respectivement.

4.2.2. Étude de la sensibilité de la culture cellulaire HepG2 aux FGI

Nous avons évalué la viabilité des cellules HepG2 après traitement avec les fractions GI en utilisant le test MTT [112], un test colorimétrique sur microplaque qui mesure la capacité des cellules viables à transformer un sel de tétrazolium soluble [bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (MTT)] en un précipité de formazan violet insoluble. Les cellules ont été plaquées à la densité appropriée (2 mL – 1,000,000 cellules)

dans des plaques de micro-titration à 96 puits. Après 24 heures, les cellules ont été traitées avec des fractions GI à deux concentrations : 0,5 – 1 mg/mL pendant 24 h. Le lendemain, 50 μ L de MTT (1 mg/mL) et 200 μ L de milieu ont été ajoutés aux cellules de chaque puit. Après 4 h d'incubation à $37 \pm 1^\circ$ C, le milieu a été éliminé et les cristaux de formazan ont été solubilisés en ajoutant 100 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO) puis homogénéisés dans un agitateur orbital pendant 20 minutes. L'absorbance était mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur de plaque. Les expériences ont été réalisées en triple. Pour le témoin (contrôle négatif), 0,5% de DMSO a été ajouté aux cellules non traitées.

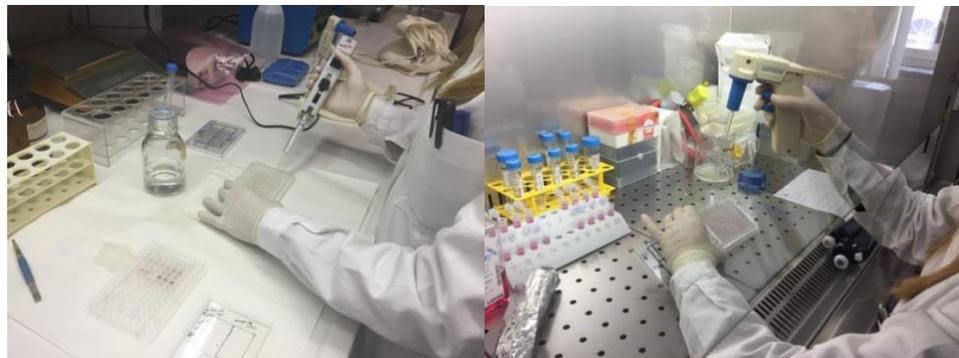


Figure 2.8 : Manipulation des cultures cellulaires sous hotte.

4.2.3. Mesure de l'activité antioxydante des fractions GI sur les lignées cellulaires HepG2

Les cellules ont été étalées sur une plaque à 12 puits dans 2 mL de milieu de culture à une densité de $1,0 \times 10^5$ cellules / mL. Les dosages ont été réalisés en incubant la culture avec 0,5 et 1 mg / mL de fraction GI pendant 24h. La lyse cellulaire a été réalisée en utilisant un tampon de lyse glacé (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton) supplémenté avec un mélange de protéase inhibiteur pendant 30 min. Le mélange a été centrifugé à 13 000 tr / min à $4^\circ \pm 1^\circ$ C pendant 5 min. Le surnageant a été récupéré dans des tubes Eppendorf et conservé à -20° C pour la quantification des protéines et le dosage TBARs, tandis que le milieu des cellules HepG2, récupéré après traitement avec des fractions GI, a été utilisé pour le test NO $^\bullet$. La teneur en protéines des échantillons a été évaluée par la méthode Biorad®, basée sur la méthode de Bradford qui implique l'ajout d'un colorant acide à la solution des

protéine, puis mesure spectrophotométrique à 595 nm. Les résultats obtenus ont été comparés à une courbe d'étalonnage de BSA (Albumine de Sérum Bovin) afin d'obtenir une mesure relative de la concentration en protéines.

4.2.3.1 Mesure de la peroxydation lipidique par la méthode TBARS (TBARS vient de : Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Le test TBARS est une méthode d'analyse quantitative largement utilisée pour quantifier la peroxydation lipidique. Elle est considérée comme l'une des premiers test de l'étude du stress oxydatif réalisée par Gutteridge & Halliwell [113]. L'abréviation TBARS vient de : Thiobarbituric Acid Reactive Substances.

Le principe de cette méthode se base sur le traitement par la chaleur d'un échantillon dans des conditions acide en le faisant réagir avec l'acide 2-thiobarbiturique [114]. L'obtention d'une solution rose en fin de la réaction signifie que le résultat est positif.

Les cellules HepG2 traitées avec les FGI ont été incubées avec 2 mL de la solution TBA-acide trichloroacétique (TCA) (15% TCA, 0,37% TBA dans 0,12 N HCl) à $100 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 30 min. La réaction a été stoppée en refroidissant l'échantillon dans de l'eau froide, et après une centrifugation à 7000 tpm pendant 8 min les surnageants ont été quantifiés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 532 nm. La quantité de TBARS a été exprimée en mM / mg de protéine.

4.2.3.2 Production de l'oxyde nitrique NO•

La mesure du NO• a été effectuée selon la méthode basée sur la réaction de Griess. 100 µL d'échantillon ont été mélangés avec 400 µL d'eau MilliQ® et 500 µL de réactif Griess (0,5% de sulfanilamide, 2,5% de H₃PO₄ et 0,05% de naphthyl-éthylène diamine dans H₂O) et incubés pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 550 nm et par rapport à une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une solution de nitrite de sodium. Les résultats obtenus ont été exprimés en nM / mg de protéine [115].

TROISIÈME PARTIE :

Étude du pouvoir hypocholestérolémiant des extrait de trois variétés de dattes algériennes - Étude *in vivo*

1. Matériel végétal

Seuls les extraits des variétés algériennes de dattes ont été utilisés pour la réalisation de l'étude *in vivo*. L'étude a été réalisée sous la supervision du personnel habilité à ces pratiques chez Saïdal Antibiotical -Médéa, Algérie.

2. Animaux

Des rats *Wistar* mâles âgés de trois semaines (pesant 190-220 g) de la station d'élevage d'antibiotiques de Saïdal (Centre de recherche et développement Saïdal, kouba, Algérie) ont été utilisés. Ils ont été mis en cage dans des conditions standard de laboratoire ($T^{\circ} 23 \pm 1^{\circ}C$, éclairage 08-16 h), nourris de granulés (bâtonnets de soja et de maïs) et de l'eau ad libitum. La pesée a été effectuée quotidiennement (avec un contrôle strict du poids) et les expériences ont été effectuées durant la journée (08:00 - 16:00h). Les expériences rapportées dans cette étude ont été menées dans le respect de l'éthique des réglementations et directives locales pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire de l'Institut Pasteur, Algérie. Le protocole expérimental a été approuvé par les deux comités locaux du département R&D, Saïdal-Antibiotical (Algérie) et l'équipe du Département de Contrôle des Vaccins de l'Institut Pasteur, (Algérie).

3. Expérimentation *in vivo*

Pour éviter tout risque de toxicité, seul l'extrait éthanolique a été retenu pour le test *in vivo*. Le protocole d'extraction a été réalisé dans des conditions contrôlées et les extraits ont été filtrés en atmosphère stérile pour éviter tout risque de contamination. Les filtrats ont été conservés dans des fioles scellées à $4^{\circ} \pm 1^{\circ} C$. L'extraction était renouvelée chaque trois jours dans les mêmes conditions. Après chaque extraction, la teneur en polyphénols totaux a été mesurée.

3.1. Essai de toxicité aigüe

Ce test a été approuvé par le laboratoire de toxicologie de Saïdal-Antibiotical pour les doses toxiques de médicaments.

Quinze souris saines (pesant 12 à 18 g) ont été soumises au test. Les souris ont été divisées en trois lots (5 souris par lot) et recevaient à J0, des injections intra-péritonéales des trois extraits (en fonction de leur poids) [116].

Après traitement, les sujets étaient observés une fois par jour (du J2 à J5) pour la mortalité, les schémas physiques et comportementaux, et pour tout signe de toxicité pendant une période de cinq jours.

3.2. Test de l'activité hypocholestérolémiant des extraits (Rats)

Afin d'induire une hyper-cholestérolémie chez les sujets, une administration d'une source de radicaux libres est requise. Pour faire, une huile végétale à usage alimentaire a été oxydée au niveau du laboratoire à $80^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à plusieurs reprises pendant 24 h.

3.2.1. Traitement des rats

Les rats ont été divisés en six (6) groupes [de quatre (4) rats chacun]. Ils avaient libre accès à l'eau et à la nourriture. Les rats sont maintenus à une température ambiante ($30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et photopériode de 8h/16h. Ils ont été traités conformément au principe et directive énoncés dans le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation. Pour différencier les sujets d'un même lot, la méthode du « piercing » a été utilisée (figure 2.9).

Les rats des six groupes ont été traités comme suit [116, 117] :

- Groupe I- témoin sain : les sujets recevaient quotidiennement par gavage gastrique 2 mL d'eau distillée.
- Groupe II- témoin intoxiqué : les sujets recevaient chaque jour par gavage gastrique 2 mL d'huile oxydée + une injection intra-péritonéale 0.5 mL d'eau physiologique (placebo).

- Groupe III- Degla Baïda : les rats recevaient chaque jour par gavage gastrique 2 mL d'huile oxydée + une injection intra-péritonéale 0.5 mL de l'extrait purifié de DB ;
- Groupe IV- Delet Nour : les rats recevaient chaque jour par gavage gastrique 2 mL d'huile oxydée + une injection intra-péritonéale 0.5 mL de l'extrait purifié de DN ;
- Groupe V- Ghars : les rats recevaient chaque jour par gavage gastrique 2mL d'huile oxydée + une injection intra-péritonéale 0.5 mL de l'extrait purifié de GH ;
- Groupe VI- témoin traité avec un polyphénol référence (Quercétine) : les sujets recevaient chaque jour par gavage gastrique 2 mL d'huile oxydée + une injection intra-péritonéale 0.5 mL d'une solution de Quercétine.

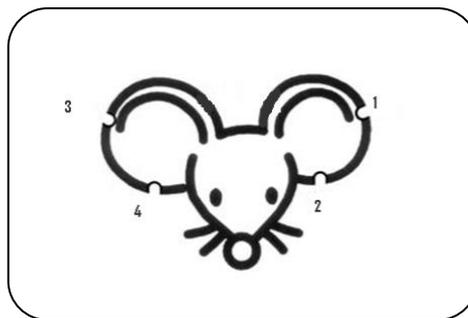


Figure 2.9 : Schéma du mode de différenciation des souris et rat (piercing)

3.2.2 Prélèvement sanguin et mesure du poids

Le prélèvement sanguin a été effectué du sinus retro-orbital sous anesthésie (figure 2.10) [118]. Le premier prélèvement est effectué sur les rats une journée avant le début de l'expérimentation (J0), les autres prélèvements sont effectués chaque fin de semaine de traitement (J7, J14 et J21). Les échantillons (placés dans des tubes Eppendorf) ont été centrifugés à 4000 tours/minute pendant 10 minutes, le sérum est récupéré et utilisé pour les dosages biochimiques du cholestérol total, les TG, le HDL et le LDL

cholestérol. La mesure pondérale a été effectuée régulièrement avant les prélèvements sanguins.



Figure 2.10 : Prélèvement sanguin au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital.

3.2.2.1. Dosage du cholestérol total (TC)

Le cholestérol a été dosé par une méthode enzymatique (réaction de Trinder) par un auto-analyseur de type (ARCHITECT *c*-Systems) en utilisant le Kit de réactif du cholestérol [119]. L'enzyme utilisée est la cholestérol-estérase, elle hydrolyse les esters de cholestérol en cholestérol et acides gras libres. Les molécules de cholestérol libre (déjà existant dans le milieu cellulaire) et celles issues de l'hydrolyse s'oxydent par le cholestérol oxydase pour former du cholestène-4-one-3 et du peroxyde d'hydrogène, qui se combine avec de l'acide hydroxy benzoïque (HBA) et de la 4-aminoantipyrine pour former un chromophore (quinone imine) quantifié à 500 nm. L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 500 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présent dans l'échantillon du sérum.

3.2.2.2. Dosage des triglycérides (TAG)

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode colorimétrique enzymatique des triglycérides (Glycérol phosphate oxydase) en utilisant le Kit de réactif des glycérides. [120 ;121]

La technique repose sur le dosage enzymatique, après action de la lipase, du glycérol libre. Les triglycérides sont hydrolysés par la lipase afin de libérer les acides gras et le glycérol. Le glycérol est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) et le glycérol Kinase (GK) pour produire du Glycérol-3- phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP). Le Glycérol-3-phosphate est oxydé en Dihydroxyacétone phosphate (DAP) par le glycérol phosphate oxydase (GPO) en produisant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Lors d'une réaction colorée catalysée par la peroxydase, le H₂O₂ réagit avec le 4-aminoantipyrine (4-AAP) et le 4-chlorophénol (4-CP) pour produire un colorant rouge. L'intensité de la coloration de la quinine imine mesurée à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité des triglycérides dans l'échantillon du sérum.

3.2.2.3. Dosage du HDL-c

La méthode de Roeschlau et *al.* [119] été appliquée en utilisant des kits de dosage (Laboratoires Randox Ltd, UK) pour la détermination des lipoprotéines. Le dosage des lipoprotéines de haute et basse densité s'effectue après précipitation quantitative grâce au réactif phosphotungustique associé au chlorure de magnésium. Après centrifugation, les concentrations du cholestérol (des HDL et LDL) contenues dans le surnageant sont alors dosées par colorimétrie à 540 nm [117].

3.2.2.4. Dosage du LDL-c

Le même principe du dosage des HDL cholestérol a été utilisé pour réaliser le dosages des LDL cholestérol. Il s'effectue après précipitation grâce au réactif phosphotungustique associé au chlorure de magnésium qui

consiste à précipiter le LDL cholestérol, qui est alors dosé par colorimétrie (à 540 nm) dans le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total [117 ; 119].

Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type (n=3). Une évaluation statistique a été réalisée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) suivie du test HSD (Honest Significant Difference) de Tukey pour séparer les moyennes statistiquement différentes. Le niveau de signification a été fixé à $P < 0,05$. La version 10 du logiciel STATISTICA (Version 13.2, 2016) a été utilisée pour effectuer ces analyses. Les coefficients de corrélation (R) ont été calculés à l'aide de l'application Microsoft Office Excel.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

PREMIÈRE PARTIE

Caractérisation biochimique des antioxydants et étude de la maturation phénolique de trois variétés de dattes algériennes (*Phoenix dactylifera* L.)

I. Caractérisation quantitative et étude de la maturation phénolique des trois variétés de dattes algériennes

1. Paramètres biochimiques

1.1. Teneur en Eau

Le tableau 3.1 présente les taux moyens d'humidité au cours du processus de la maturation des trois variétés de datte.

Tableau 3.1 : Teneur en eau des trois variétés de dattes au cours des stades de maturité.

Stade de maturité	DB	DN	GH
Kimri	77,6% ± 4,39 ^A	82 % ± 2,49 ^A	78,2% ± 2,36 ^A
Khalal	52,5% ± 1,11 ^A	78,4% ± 0,84 ^B	67,1% ± 1,66 ^C
Routab	21,9% ± 1,54 ^A	51,7% ± 1,16 ^B	38,7% ± 1,23 ^C
Tamr	13,3% ± 1,23 ^A	22,5% ± 0,59 ^B	25,8% ± 0,42 ^B

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

Il est à noter que les teneurs en eau peuvent franchement varier d'une région à une autre, selon le stade de maturité et aussi selon la variété, car ce paramètre est étroitement lié à l'humidité du milieu extérieur.

Au stade kimri, les trois variétés de dattes présentent des teneurs élevées en eau, la variété Deglet Nour (DN), étant de texture semi-molle, elle présente le taux le plus élevé avec 82% d'eau (tableau 3.1), suivie par la variété Ghars (GH) avec 78,2% et en dernier la variété Degla Baïda (DB) avec 77,6%. Pour l'ensemble des trois variétés de dattes étudiées, la teneur en eau dégraisse significativement d'un stade à l'autre jusqu'à maturation.

Au stade khalal, la perte d'eau est faible pour la variété DN : 78,4% (soit - 4,4% de sa teneur initiale), et modérée pour la variété GH : 67,1% (soit -14,2% de sa teneur initiale). La variété DB quant à elle, sa perte d'eau est importante (- 32,35 % de sa teneur initiale).

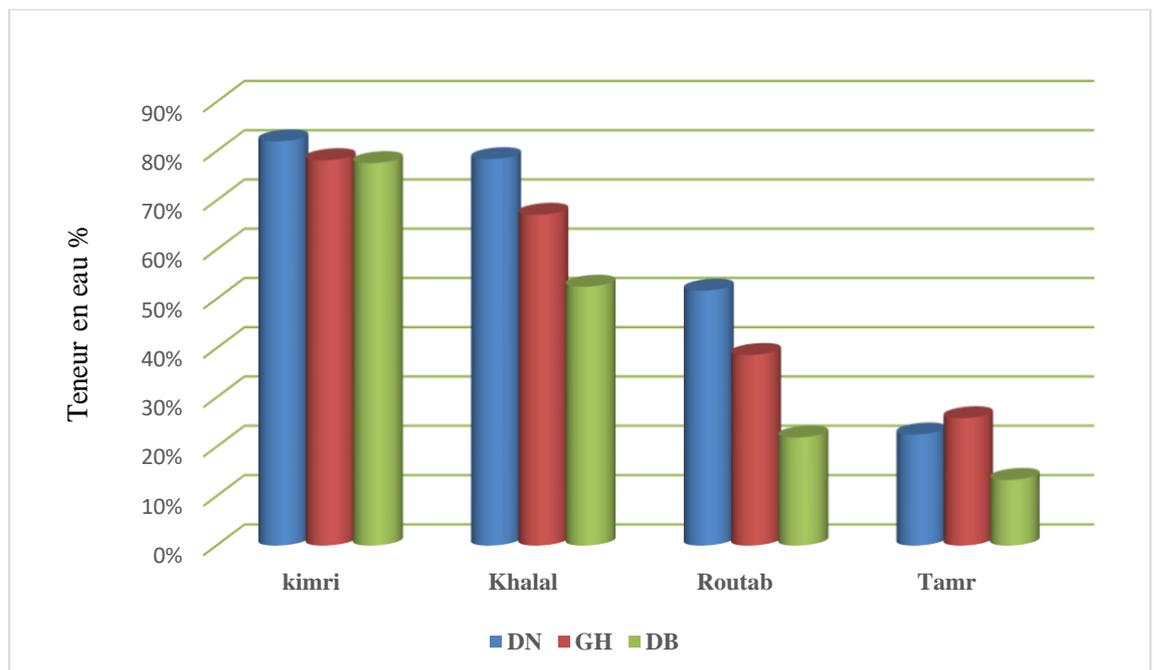


Figure 3.1 : Évolution de la teneur en eau des trois variétés de dattes au cours des différents stades de maturation.

Ces résultats obtenus et l'évolution du taux d'humidité des dattes correspondent à la description du stade Khalal par la littérature [7 ;14 ;17 ;122 ;123 ;124 ;125]; ce stade est caractérisé principalement par une évolution morphologique et biochimique très lente.

Au stade Routab, une baisse significative a été enregistrée pour l'ensemble des cultivars (figure 3.1). La teneur en eau de la variété DN était de 51,7% (soit – 36,95% de sa teneur initiale), suivie par la variété GH avec une teneur de 38,7% (soit – 50,5% de sa teneur initiale), puis la variété DB qui a enregistré un taux égale à 21,9% d'eau (soit -71,7% de sa teneur initiale). Cette perte importante d'eau pour l'ensemble des variétés est due à l'augmentation rapide du taux de sucres et des matières solides, aussi la teneur en fibre à ce stade est importante par rapport aux stades précédents [15].

Au stade Tamr, marqué par la maturation complète du fruit, les valeurs observées pour les variétés GH et DN sont égales à 25,8% et 22,5%, tandis que la variété DB arrive à maturité avec un taux d'humidité plus bas qui est égale à 13,3%. La faible teneur en eau de la variété DN peut s'expliquer par un non-respect des conditions de stockage occasionnant ainsi une perte supplémentaire et assèchement de la datte. Des travaux similaires sur un panels plus large de cultivars on rapportés des teneurs proches aux résultats obtenus [126 ; 127 ; 128].

La teneur en eau est une variable très importante qui a été utilisée comme critère principal de classification des dattes selon leur texture : des dattes molles (taux d'humidité > 30% dont la variété GH), semi-molles (teneur en eau comprise entre 10% et 30% dont la variété DN) et sèches (teneur en eau < 10 % dont la variété DB) [129].

Les résultats obtenus ont montré que la teneur en eau des trois variétés de dattes évolue en fonction de leur maturation : l'humidité décroît des stades verts aux stades mûrs (tableau 3.1). Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par Munier *et al.* [14] ; Booiij *et al.* [130]; Hulme [131] et Reuveni [132].

1.2. Teneur en matière sèche (MS)

La détermination de la matière sèche permet d'exprimer les résultats obtenus en fonction de l'unité du poids sec du fruit. Les teneurs en matière sèche des différentes variétés de dattes étudiées sont représentées par la figure 3.2.

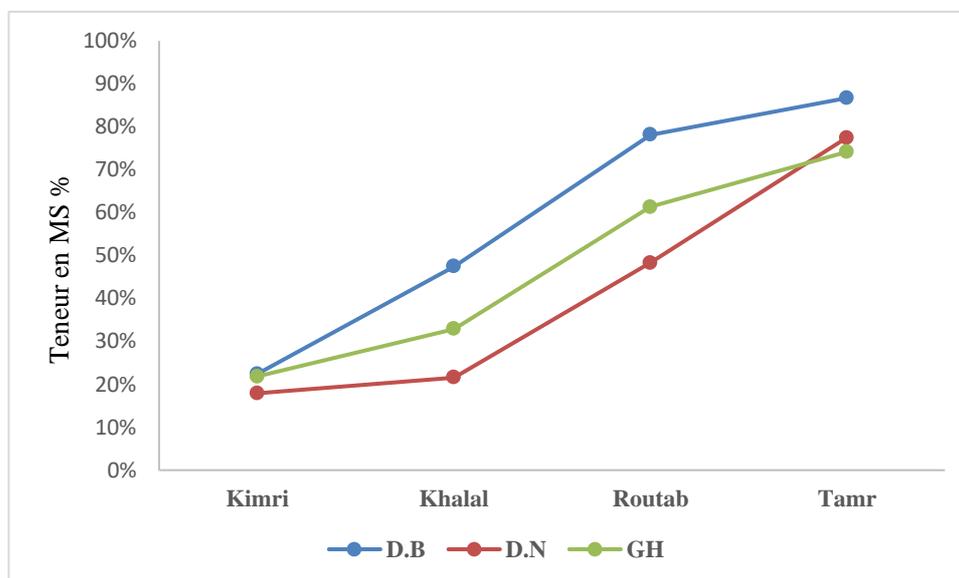


Figure 3.2 : Évolution de la teneur en matière sèche des trois variétés de dattes au cours des différents stades de maturation.

Au stade Kimri, les teneurs en matière sèche (MS) varient en moyenne entre 17,91% et 22,42% ; le groupe est donc homogène sans différences significatives ($P < 0,05$). Au stade Khalal, une augmentation lente de la MS a été enregistrée, la variété DB enregistre le taux le plus élevé (47,77%). Au stade Routab, une augmentation rapide de la teneur en MS de l'ensemble des variétés de dattes a été observée ; cette augmentation correspond à la baisse significative de la teneur en eau. A ce stade, la variété DN contient moins de MS que les variétés GH et DB (48,30%).

Au stade de maturation (stade Tamr), la teneur en MS est à son summum pour l'ensemble des variétés. Les variétés DN et GH contiennent 77,45% et 74,14% de MS respectivement. La variété DB quant à elle, et à ce stade de maturation, elle atteint un taux très bas de teneur en eau : 13,3% (86,70% de MS). Ces résultats correspondent aux données décrites par la littérature [133 ; 134 ; 135]. Cette évolution de la teneur en MS de la datte au cours des différents stades de maturation est le résultat d'une

accumulation progressive des sucres, et ce suite à une perte progressive d'eau [34 ; 136 ; 137].

L'ensemble des principaux paramètres biochimiques (sucres totaux, sucres réducteurs, protéines et minéraux, .. etc.) seront exposés en annexe III.

1.3. Teneur en composés phénoliques totaux

La figure 3.1 représente l'évolution de la teneur en composés phénoliques des différents extraits des trois variétés de dattes étudiées, et ce durant les quatre stades de maturation. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/ 100 g MS :

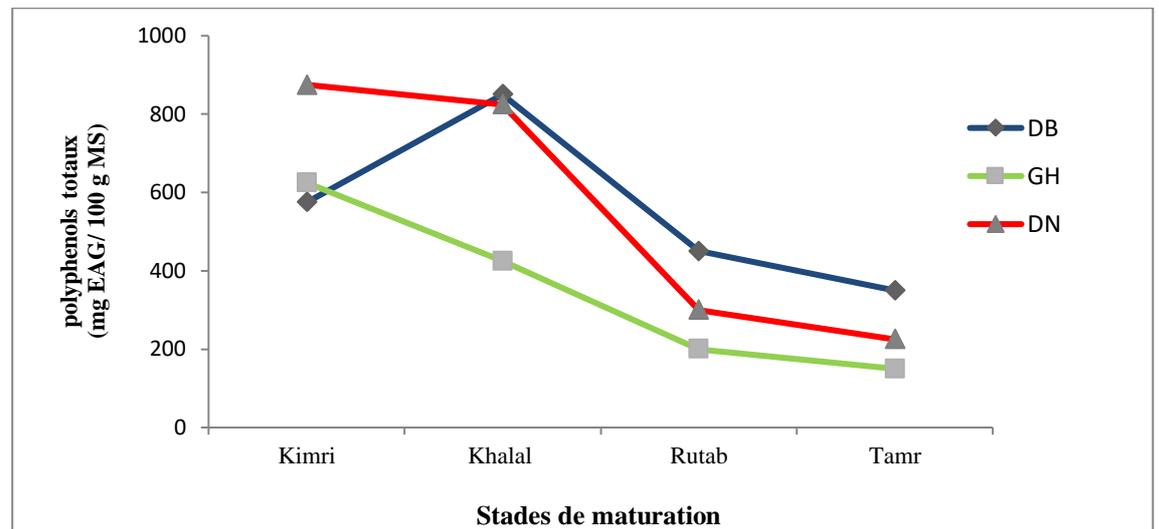


Figure 3.3 : Évolution de la teneur en composés phénoliques totaux (mg EAG / 100g MS) des différentes variétés au cours des différents stades de maturation.

la teneur totale en polyphénols a été quantifiée à l'aide du réactif de Folin. La figure 3.3 démontre que les trois variétés de dattes étudiées sont une bonne source de polyphénols. Cependant, la quantité totale variait significativement entre les variétés au cours les stades de maturation et à maturité. Le dosage des composés phénoliques a montré que durant le stade kimri, les teneurs en polyphénols totaux enregistrées sont significativement plus élevées que celles des autres stades de maturation pour les variétés DN et GH, ces résultats sont en parfaite concordance

avec les résultats publiés par Eid et *al.* [109]. Pour la variété DB, la teneur en polyphénols augmente en passant du stade Kimri au stade Khalal, puis elle décline au cours des stades Routab et Tamr; Tandis qu'une graduelle diminution est observée pour les variétés DN et GH dès les premiers stades de maturation.

Au stade Kimri, la teneur en polyphénols est à son summum, elle varie entre 504,54 et 877,24 mg eq AG/ 100 g MS, alors qu'au stade Tamr elle atteint des valeurs moyennement comprises entre 158 et 322 mg- eq AG/100 g MS.

La variété DN est la plus riche en polyphénols, elle marque la plus forte teneur au stade Kimri (877,24 mg eq AG/ 100 g MS). Puis au stade Khalal, on remarque une nette régression du taux de polyphénols atteignant 297,52 mg eq AG/ 100 g MS. Cette baisse peut être due à l'entière précipitation des tanins solubles sous forme insolubles, ce qui les rend inaccessibles [138]. Tandis que pour le variété GH, la cinétique est plutôt en baisse continue sans fluctuations. La variété GH est la moins riche en polyphénols et ce durant les trois derniers stades de maturation (157,5 mg eq AG / 100 g MS). Quant à la variété DB, elle montre la plus faible teneur au stade Kimri avec 588,8 mg eq AG / 100 g MS, puis au stade Khalal, on enregistre un pic maximal atteignant 856,2 mg eq AG / 100 g MS suivi par une chute au stade Routab jusqu'à maturation où elle enregistre 320 mg eq AG / 100 g MS.

Ces valeurs sont supérieures à celles trouvées par Awad et *al.* [139] qui avaient obtenus des valeurs variant de 30 mg à 180 mg/ 100g MS durant la maturation de la variété Medjool, et inférieures à celles de Shahdadi *et al.* [140] qui donnent des valeurs comprises entre 800 mg et 1100 mg eq AG/ 100 g MS pour deux variétés de dattes iraniennes au cours de la maturation.

L'influence du stade de maturité se traduit par la diminution progressive de la teneur en polyphénols ; ce phénomène est expliqué par la synthèse active des polyphénols qui a lieu après la fécondation durant la phase de division cellulaire, puis elle diminue à partir de la phase de croissance cellulaire [141]; alors que la diminution de la teneur en polyphénols pendant la maturation peut être due à l'action des enzymes: les polyphénol oxydases (PPO) et les peroxydases (POD) [142].

Plusieurs études ont reporté qu'il y a une corrélation entre les taux des polyphénols et l'activité enzymatique des PPO durant la maturation ; Gooding *et al.* [143] ont montré que l'activité enzymatique des PPO dans les fruits de bananier diminue en fonction du stade de maturité. En plus, Ayaz *et al.* [144] ont montré qu'il y a une diminution de la teneur en polyphénols ainsi que l'activité enzymatique des PPO au cours de trois stades de maturation des nèfles.

Les différences de teneurs en polyphénols résultent de l'effet d'un certain nombre de facteurs dont les principaux sont:

- Les facteurs climatiques et environnementaux : la lumière, les précipitations, la topographie, la saison et le type des sols [145].
- Le patrimoine génétique : la concentration des polyphénols est très variable d'une espèce à une autre et d'une variété à autre et diminue régulièrement durant la maturation ainsi que la période de récolte et le stockage par différentes voies du brunissement (notamment enzymatique) [146].
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification [147].

Toutefois, il faut prendre en considération le fait que la méthode Folin-Ciocalteu est une méthode fiable et largement recommandée possédant également des limites. Ciocco *et al.* [148] et Ciocco et Lattanzio [149] ont été les premiers à décrire l'interférence de l'alcool dans le mélange Folin-Ciocalteu. Ciocco et Lattanzio [149] ont déterminé que lorsque la concentration d'alcool dépasse 4 %, le degré de saturation du soluté dans les mélanges réactionnels diminue, ce qui réduit la propriété diélectrique moyenne affectant le développement de la couleur, qui par la suite affecte les lectures d'absorbance et les résultats finaux. Aussi, il a été démontré que le réactif Folin-Ciocalteu peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane), et les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose [150].

1.4. Teneur en flavonoïdes

Le tableau ci-dessous représente les teneurs en flavonoïdes des différents extraits des variétés de dattes au cours de la maturation. Les résultats sont exprimés en mg équivalent Quercétine / 100g MS.

Tableau 3.2. Teneur en flavonoïdes (mg eq Q / 100g MS) de différentes variétés de datte au cours de la maturation.

Stades de maturation	DB	DN	GH
Kimri	118,67±1,82 ^A	138,27±1,16 ^B	78,64±2,14 ^C
Khalal	153,36±1,56 ^A	106,39±1,32 ^B	51,27±0,84 ^C
Routab	83,49±0,58 ^A	43,25±0,42 ^B	28,11±0,31 ^C
Tamr	62,45±0,12 ^A	31,83±0,17 ^B	19,34±0,25 ^C

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD. Les moyennes avec différentes lettres pour le même stade sont significativement différentes (P<0,05).

Les valeurs représentées dans le tableau 3.2 montrent une différence significative entre les variétés étudiées (p<0,05). La teneur la plus élevée a été enregistrée par la variété DB au stade Kimri (153,36 mg eq Q / 100g MS), tandis que la teneur la plus faible a été enregistrée par la variété GH au stade Tamr (19,34 mg eq Q / 100g MS).

les valeurs que nous avons enregistrées sont supérieures à celles trouvées par Guizani *et al.* [151], qui sont de l'ordre de 34 à 66 mg eq Q / 100g MS pour quelques variétés de dattes omanaises. Au stade Tamr, Ben meddour *et al.* [152], ont trouvé des valeurs assez proches à nos résultats, à savoir 72,77 mg eq Q / 100g, 15,22 mg eq Q. / 100g et 45 mg eq Q / 100g MS pour les variétés Degla Beida, Deglet Nour et Mech Degla respectivement).

La cinétique démontre que la teneur en flavonoïdes diminue au cours du processus de maturation, à l'exception de la variété DB qui montre un pic maximal enregistré au cours du passage Kimri - khalal, puis une diminution au cours du reste des stades de maturation. Cette concentration des flavonoïdes peut être due à la forte accumulation des sucres à ce stade. Le squelette de base des flavonoïdes peut présenter divers substituants pouvant présenter au moins trois groupes hydroxyles phénoliques (OH) qui sont généralement combinés avec des sucres pour former des glycosides (avec le glucose comme sucre prédominant). Dowsen et Atten [15] rapportent par ailleurs que la catégorie des dattes sèches se caractérise par une teneur en saccharose importante. Au stade Khalal, la teneur en saccharose des dattes sèches est plus importante que celle des dattes molles, pouvant stimuler ainsi la biosynthèse des flavonoïdes dans la cellule.

1.5. Teneur en caroténoïdes totaux

Les caroténoïdes totaux ont été dosés par colorimétrie. La figure 3.4 illustre les résultats de la teneur en caroténoïdes totaux des extraits des trois variétés de dattes étudiées.

La teneur en caroténoïdes totaux (exprimée en mg/100g MS) des variétés étudiées, oscille entre 1,416 - 1,765 au stade Kimri, et entre 0,556-1,462 au stade Tamr; une diminution significative de la teneur en caroténoïdes totaux au cours de la maturation est constatée. La variété GH a enregistré les teneurs les plus faibles (à l'exception du stade Kimri). De même, il a été observé une légère augmentation de la teneur en caroténoïdes totaux, pour les deux variétés DN et GH en passant du stade Routab au stade Tamr ; ceci n'est pas due à une nouvelle activité de biosynthèse mais plutôt à la diminution de la teneur en eau du le fruit à ce stade [153].

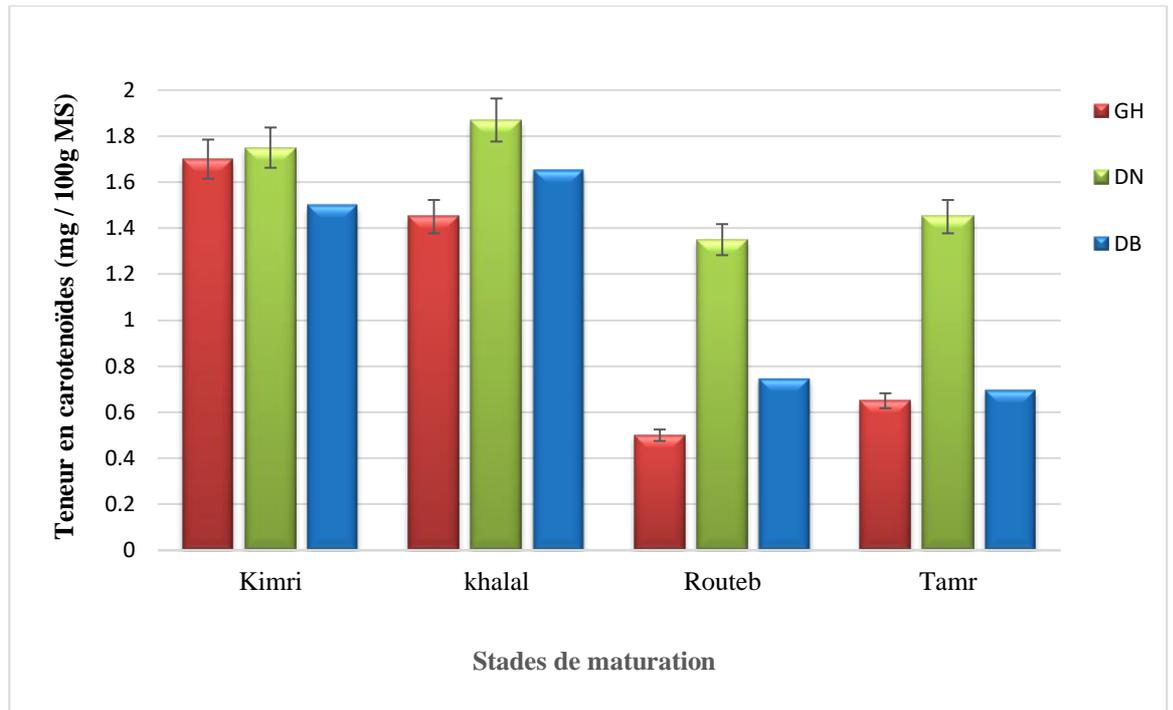


Figure 3.4 : Évolution de la teneur en caroténoïdes totaux pour les différentes variétés au cours du développement et maturation.

Ces valeurs sont supérieures à celles trouvées par Boudries et *al.* [153] qui s'étendent sur les fourchettes de 61.7 - 167, 32.6 - 672, et 37.3-773 $\mu\text{g} / 100 \text{ g MF}$ pour les variétés Deglet Nour, Tantebouchte et Hamraya respectivement, et ce durant les stades Khalal, Routab et Tamar, et inférieures à celles publiées par Al-Farsi et *al.* [154], qui donnent des valeurs comprises entre 1,31 et 3,30 $\text{mg} / 100 \text{ g MF}$ pour trois variétés de dattes omanaises (Fard, Khasab et Khalas).

Beaucoup de travaux de recherche ont démontré que, à côté de la β -le carotène, une grande diversité d'autres carotènes mineurs ont été trouvés dans les fruits du palmier ; Les γ - et les δ -carotènes étaient généralement trouvés dans bon nombre de ces fruits. Ces caroténoïdes s'accumulent préférentiellement dans le cerveau humain [155], réduisent les dommages photo-oxydatifs et modulent l'expression de l'inflammation associée à la dégénérescence maculaire [156].

1.6. L'activité antioxydante des extraits phénoliques des différentes variétés de dattes

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité antioxydante est nécessaire [157].

Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydante sont simples, peu coûteux et rapides à mettre en œuvre. Les tests DPPH, test de blanchissement du β - carotène, et FRAP ont été retenus dans le cadre de cette étude. Des modifications ont été, cependant, apportées afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

1.6.1. Blanchissement du β - carotène

Les résultats du test du blanchissement du β -carotène évaluant l'activité antioxydante des extraits phénoliques des trois variétés de dattes étudiées sont illustrés dans la figure 3.5.

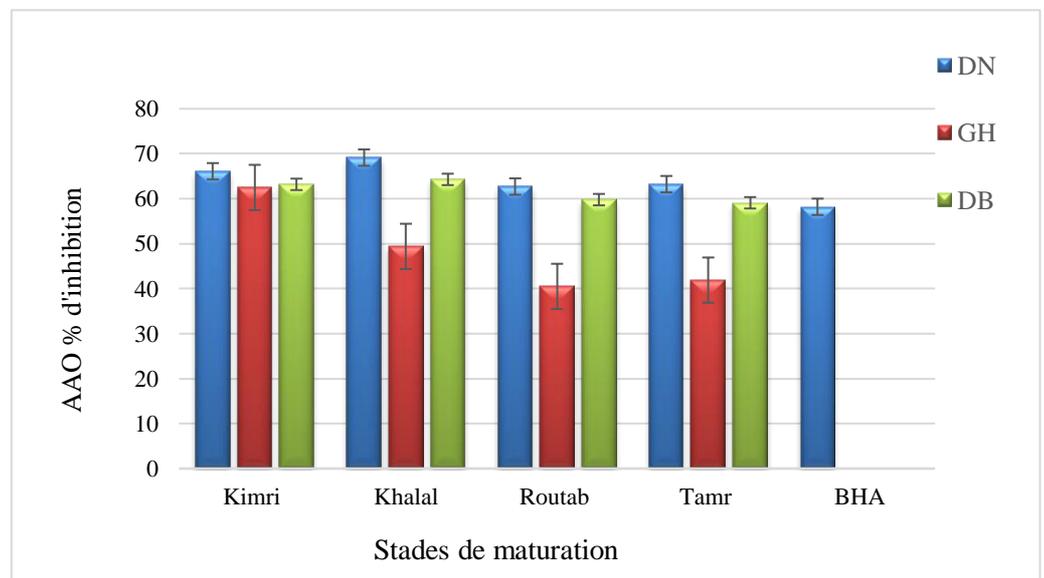


Figure 3.5 : Évolution de l'activité antioxydante par le test du blanchissement du β -carotène exprimée en pourcentage d'inhibition pour les différentes variétés de datte au cours du développement et maturation.

D'après les résultats obtenus, on constate que tous les extraits testés, et le BHA (utilisé en tant qu'antioxydant de référence) inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. Au stade Kimri, l'activité antioxydante (% d'inhibition) oscille entre 60,17 - 66,08 % ; ces valeurs sont nettement supérieures au pourcentage marqué par le control positif BHT (58,20 %). On note par la suite une légère augmentation qui s'établit au stade Khalal, où la variété DN a enregistré le taux le plus élevé (69,14%), suivi par les variétés DB (64,23%), et GH (49,38%). Au stade Routab, une forte diminution de l'activité antioxydante a été constatée, la variété DN a marqué le taux le plus élevé (62,69%), alors que le taux le plus faible a été enregistré par la variété GH (40,53%).

Au stade Tamr, les pourcentages d'inhibition sont proches de ceux trouvés au cours du stade Routab pour l'ensemble des variétés étudiées ; on note les valeurs suivantes en ordre décroissant : DN (63,24%), DB (59,11%), BHT (58,20%) et GH (41,87%).

Ben Abbes [158], réalisant le même test sur l'extrait éthanoïque de la variété DN au stade Tamr, avait obtenu une inhibition inférieure à la nôtre (33,66%). Selon Haddadi [159], plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants, ainsi que leurs concentrations.

De plus, Ferreria *et al.* [160] ont remarqué que le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celui du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques.

Pour conclure, Liyana-Pathirana et Shahidi [161] considèrent qu'un extrait qui arrête, retarde ou inhibe le phénomène du blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur des radicaux libres donc un antioxydant primaire.

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

Les résultats obtenus sur l'évaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), pour les différentes variétés de datte étudiées sont illustrés dans la figure 3.6.

D'après la figure illustrant les courbes de l'activité antioxydante, il s'avère que l'ensemble des extraits phénoliques des trois variétés de dattes présentent une très bonne activité antioxydante. Elle est à son maximum au cours du premier stade de maturité, puis une régression est constatée au cours de la maturation pour l'ensemble des variétés à l'exception de la DB, où le pouvoir radicalaire augmente pour atteindre 81,55% au stade khalal, puis il régresse graduellement jusqu'à maturation.

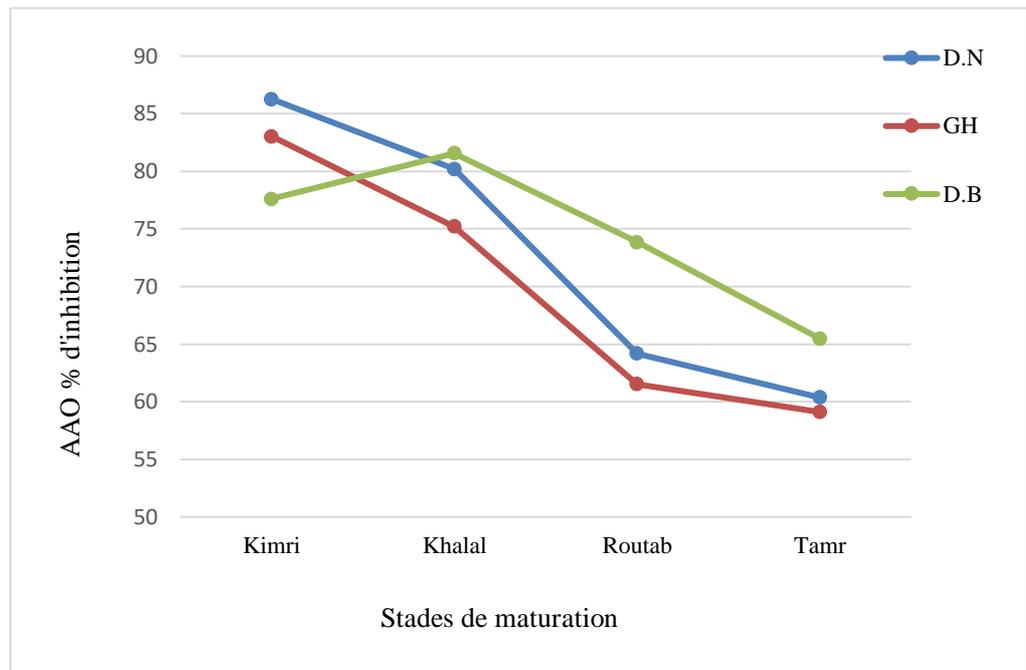


Figure 3.6 : Évolution de pouvoir radicalaire par le test au DPPH• pour les différentes variétés au cours du développement et maturation.

Au stade Kimri, l'activité antioxydante varie entre 72,14% et 86,27%, alors qu'au stade Tamr elle atteint des valeurs qui sont comprises entre 59,11% et 65,49%. la variété DN marque le meilleur pourcentage d'inhibition au stade Kimri (86,27%). La variété GH quant à elle, affiche une plus faible activité antiradicalaire au stade Tamr avec une inhibition égale à 59,11%.

Cette capacité antioxydante, telle que mesurée par piégeage des radicaux DPPH•, a significativement diminué au cours des différents stades de maturation (Kimri, Khalal, Routab et Tamr) (figure 3.6).

Ces valeurs sont proches de celles trouvées par Awad et *al.* [128], qui se situent entre 56% et 88% pour la variété Helali (variété de dattes d'Arabie saoudite), et de celles de Guizani et *al.* [151], qui donnent des valeurs comprises entre 62,5% et 72% pour trois variétés de dattes omanaises (Fardh, Khasab et Khalas).

L'analyse de la corrélation entre la capacité de piégeage des radicaux DPPH• des différents extraits phénoliques des dattes étudiées et leur teneur en composés phénoliques totaux montre une corrélation linéaire significative ($p < 0,05$). Cette forte corrélation observée entre l'évolution de la capacité antioxydante et celle de la teneur en polyphénols totaux au cours de la maturation, pour la plupart des cultivars suggère une forte contribution de ces composés dans la capacité antioxydante totale.

Plusieurs études ont rapporté des corrélations positives entre la capacité antioxydante et la concentration totale en polyphénols des dattes [37, 162], et des fruits [163, 164, 165]. Cependant, Yu et *al.* [166] n'ont trouvé aucune corrélation significative entre la concentration totale des composés phénoliques et la capacité de piégeage des radicaux libres (DPPH•) dans des échantillons de céréales. Ceci s'explique probablement, par le fait que les différents composés phénoliques ont des réponses différentes à la méthode de Folin-Ciocalteu [167].

1.6.3. Pouvoir réducteur par l'indice FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Le tableau ci-dessous (Tableau 3.3) représente le pouvoir réducteur de différentes variétés de dattes au cours de la maturation. Les résultats sont exprimés en mg eq AG / 100g MS. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm ET. Les moyennes avec différentes lettres pour le même stade sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Tableau 3.3. Activité antioxydante (mg eq AG / 100g MS) des différentes variétés de datte au cours de la maturation.

	D.B	D.N	GH
Kimri	421,50±2,87 ^A	310,76±8,47 ^B	306,55±5,13 ^B
Khalal	447,37±3,03 ^A	289,70±7,71 ^B	253,70±5,04 ^C
Routab	402,38±6,07 ^A	213,53±7,95 ^B	197,07±3,58 ^B
Tamr	389,22±6,52 ^A	252,50±8,94 ^B	237,25±5,93 ^B

Le pouvoir réducteur est l'un des mécanismes utilisés pour évaluer la capacité antioxydante, il repose sur la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en fer ferreux (Fe^{2+}). Comparativement aux deux méthodes précédentes (test DPPH[•] et test du blanchissement du β -carotène), la cinétique d'inhibition est similaire, le pouvoir réducteur diminue graduellement au cours de la maturation, à l'exception du pic enregistré au cours du passage du stade Kimri au stade khalal pour la variété DB, qui est également suivie d'une baisse au cours du reste des stades de maturation.

Le taux le plus élevé a été enregistré par la variété DB au stade Khalal (447,37 mg eq AG / 100g MS), tandis que le taux le plus faible a été enregistré par la variété GH au stade Routab (19,34 mg eq AG / 100g MS). Au cours des différents stades de maturation, la variété DB a enregistré les taux les plus élevés, suivie par la variété DN, et enfin la variété GH.

Benmeddour *et al.* [152] ont trouvé des valeurs assez proches de nos résultats au stade Tamr. Ils ont obtenus 420 mg eq AG / 100g MS, 376 mg eq AG / 100g MS et 272 mg eq AG / 100g MS pour les variétés Degla Beida, Deglet Nour et Mech Degla respectivement.

En comparant les résultats de l'étude de l'activité antioxydants obtenus par les trois méthodes utilisées, nous avons constaté que les trois variétés de dattes possède un important pouvoir radicalaire. Ce dernier est à son summum au début de la maturation. L'évolution est donc caractérisée par une baisse jusqu'à maturation. Les résultats obtenus indiquent que les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes sont fortement responsables de ce pouvoir antiradicalaire.

II. Caractérisation qualitative des composés phénoliques des extraits de dattes à maturité par HPLC-DAD

1. Analyse du profil phénolique des extraits de dattes par HPLC-DAD

Les variétés Deglet Nour (DN) Ghars (GH) et Degla Baïda (DB) utilisées pour la réalisation de cette partie de notre étude ont été récoltées à maturité (stade Tamr). Les variétés de dattes contenaient respectivement 22,46%, 28,26%, 15,32% et 19,68% d'humidité. Les résultats de l'analyses de nos extraits phénoliques des trois variétés de dattes étudiées sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 3.4: Profils phénoliques des extraits phénoliques des trois variétés de dattes analysées par HPLC-DAD.

Extraits (variétés de dattes)	Concentration des composés phénoliques (mg / ml)				
	GA	VA	Ch A	FA	Qu
DN	0.825±0.09 ^{#b}	n.d	n.d	0.156±0.01 ^{#c}	1.39±0.04 ^a
GH	0.284±0.03 ^a	4.65±0.19 ^{#b}	n.d	0.06±0.004 ^{#b}	1.40±0.12 ^a
DB	0.11±0.0009 ^a	n.d	n.d	0.015±0.01 ^{#a}	0.96±0.13 ^a

^a Valeurs exprimées en moyenne ± ET (n= 2). Les valeurs entre deux colonnes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (p<0.05) (Tukey HSD test). * et # montrent une différence significative (P < 0.01 et P < 0.05, respectivement) (One-way ANOVA). Abréviations: GA, gallic acid; VA, vanillic acid; ChA, Chlorogenic acid; FA, ferulic acid; Qu, quercétine; n.d, non déterminé.

Le profil phénolique des extraits de datte a été évalué par analyse HPLC-DAD. La figure 3.7 montre les chromatogrammes des différentes variétés de dattes. Neuf pics importants sont apparus dans tous les chromatogrammes à intensités variables. Selon les profils des spectres UV, obtenus dans les conditions étudiées, l'acide gallique et la quercétine ont été trouvés comme les antioxydants les plus abondants. Les trois variétés contiennent de l'acide férulique et seule la variété GH a montré la présence d'acide vanillique.

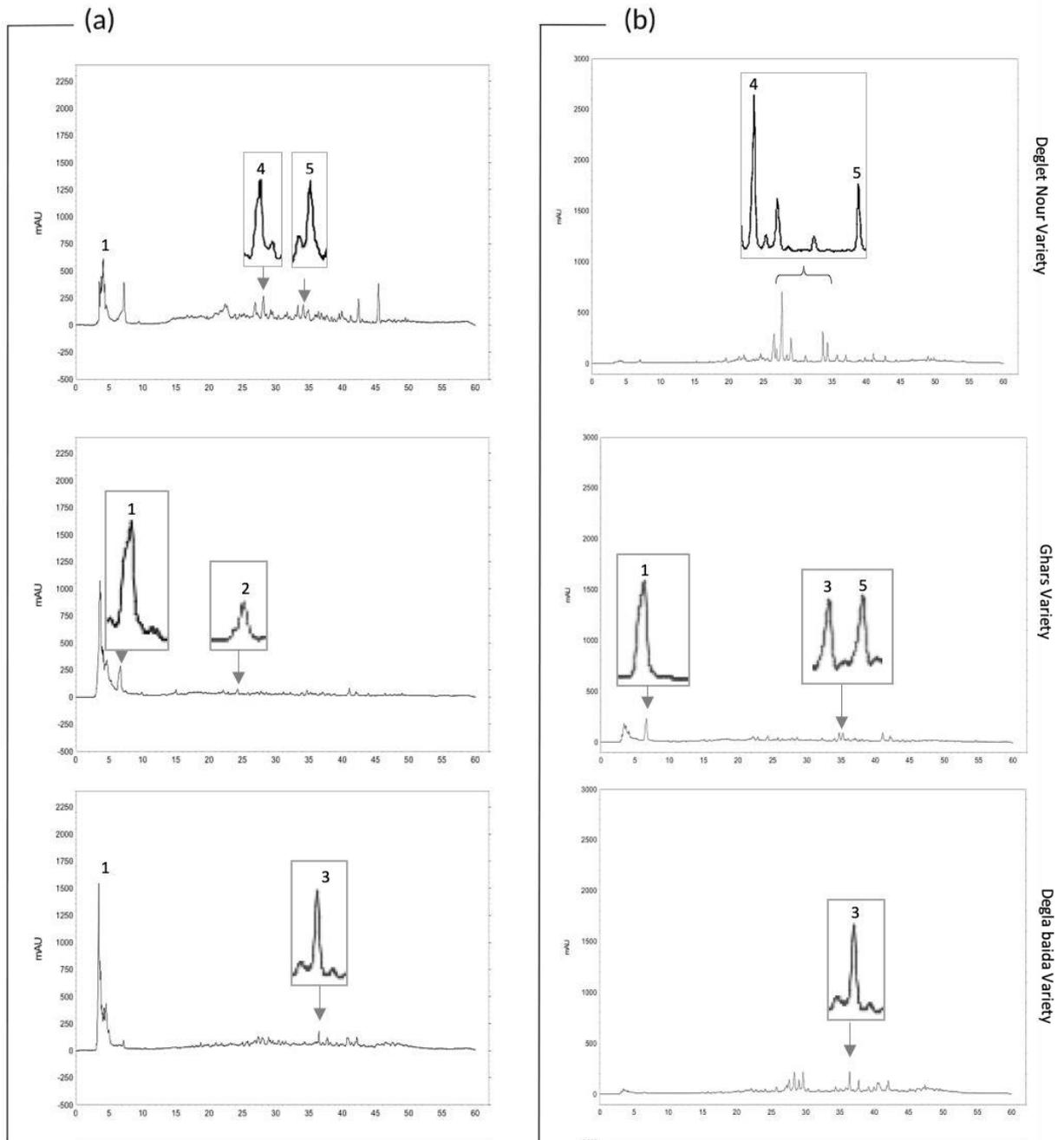


Figure 3.7 : Chromatogrammes des composés phénoliques des trois variétés de dattes. Données recueillies à 280 nm (a) et 320 nm (b). (1) acide gallique, (2) acide vanillique, (3) acide chlorogénique, (4) acide férulique, (5) quercétine.

Les analyses qualitatives des composés phénoliques des trois variétés de dattes ont révélé que les teneurs trouvées sont très inférieures aux données rapportées dans les travaux précédents sur différentes variétés de dattes venant de différentes régions [37; 168 ; 169]. La purification des extraits en utilisant la colonne chromatographique C18 aurait fortement pu être à l'origine en entraînant une perte intensive de composés phénoliques (tableau 3.4).

En outre, la caractérisation quantitative des extraits de dattes à l'aide d'un nombre limité d'étalons phénoliques ne peut pas donner une image claire de la composition phénolique des extraits. De plus, le plus grand nombre de pics détectés pour chaque extrait de datte était uniquement présent en traces, rendant ainsi leur identification et leur quantification difficiles.

Dans ce contexte, nous avons appuyé nos résultats par une large comparaison de nos spectres d'absorption UV – Vis et temps de rétention chromatographique avec ceux des composés de référence et des données obtenues lors des études antérieures. Selon les données obtenues par Mansouri *et al.* [37] et dans les mêmes conditions analytiques adaptées par Eid *et al.* [109] la présence d'acides isoféruliques, d'acides p-coumariques, d'acides cinnamiques, les acides hydroxycinnamiques et les glycosides de flavone peut être fortement suggérée.

2. Teneur en polyphénols et pouvoir antioxydant des extraits phénoliques

Les composés phénoliques ont été extraits au méthanol aqueux, qui est le plus recommandé pour extraire des composés phénoliques de datte [168 ; 170]. La teneur en polyphénols totaux a été évaluée par le test de Folin-Ciocalteu.

La teneur en polyphénols des différentes variétés est comprise entre 207,86 et 300,29 mg eq AG / 100 g MF. La variété DB est la plus riche en polyphénols ($p < 0,001$), elle enregistre la teneur la plus élevée en composés phénoliques solubles (tableau 3.5). Ces résultats sont proches des résultats trouvés pour la variété saoudienne Adjwa, qui est très connue par sa richesse

en polyphénols [119]. Les variétés DN et GH contiennent 207.86 mg eq AG / 100 g MF et 286.06 mg eq AG / 100 g MF respectivement. Une différence significative très élevée a été trouvée entre la teneur en polyphénols totaux des différentes variétés de dattes ($p < 0,05$).

Il est très évident que la datte contient moins de composés phénoliques solubles que les autres fruits connus comme source importante d'antioxydants, comme la fraise, la pomme, les figues et la tomate [37 ; 171], cela peut être dû à l'importante teneur en fibre des dattes, qui affectent l'accessibilité d'une partie importante des composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires [172]. Distinctement, il est important de noter que la composition de la matrice alimentaire joue un rôle important dans la stabilité des polyphénols [173].

Tableau 3.5 : Activités antioxydantes et teneurs en polyphénols des trois variétés de datte.

Extrait (variétés)	Activité antioxydante			Teneur en PT (mg eq AG / 100 g MF)
	DPPH mM eq T / 100 g MF	FRAP mM eq T / 100 g MF	ABTS mM eq T / 100 g MF	
DN	2.52±0.013 ^a	1.36±0.016 ^a	1.54±0.06 ^b	207.86±6.46 ^b
GH	1.11±0.002 ^a	0.859±0.003 ^b	2.55±0.31 ^a	286.06±6.001 ^a
DB	2.36±0.85 ^a	1.94±0.106 ^c	2.96±0.04 ^a	300.29±12.28 ^a

^a Valeurs exprimées en moyenne ± ET (n= 3). Les valeurs entre deux colonnes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$). Mesurées par Tukey HSD test, One-way ANOVA.

Il est fortement recommandé d'utiliser différentes méthodes pour évaluer l'activité antioxydante d'un extrait à fin d'établir l'authenticité [174]. Pour cette raison, l'activité antioxydante de nos extraits phénoliques a été évaluée à l'aide de différentes méthodes photométriques et exprimée en mM d'équivalents Trolox (ET) pour 100 g de poids frais. Comme présenté dans le tableau 3.6, les données montrent de fortes capacités antioxydantes pour l'ensemble des extraits phénoliques des différentes variétés de dattes étudiées. Les capacités antioxydantes les plus élevées ont été obtenues par le test ABTS pour la plupart des variétés de dattes à l'exception de la variété DN, qui est plus réactive au radical libre DPPH ($2,52 \pm 0,013$ mM ET / 100 g FW).

Certaines variétés ont montré un fort potentiel de piégeage des radicaux (DN, DB) tandis que la variété GH a donné un pouvoir réducteur élevé.

Par conséquent, cette différence d'affinité aux radicaux peut être attribuée à la composition chimique des polyphénols, la différence de concentration de ces composés et la texture des différentes variétés de dattes (teneur en eau et période de maturité). Nos données ont révélé une bonne corrélation linéaire (R) entre les activités antioxydantes déterminées par différents dosages, en particulier ABTS ($p < 0,05$), et la teneur en polyphénols totaux (R allant de 0,897 à 0,9627).

DEUXIÈME PARTIE

Étude du pouvoir antioxydant des trois variétés de dattes algériennes sur la peroxydation lipidique – Étude *in vitro* sur cultures cellulaires HepG2

L'influence de la fraction gastro-intestinale (FGI) des différentes variétés de datte sur le stress oxydatif cellulaire et la surexpression cellulaire d'oxyde nitrique a été étudiée sur des cellules du carcinome hépatocellulaire humain (HepG2). En situation de stress oxydatif, les lipides sont les premières cibles des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [175; 176]. La peroxydation lipidique (LP) génère une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN [177]. L'acide thiobarbiturique (TBARS) est l'un des produits formés et considéré comme l'un des marqueurs importants de la peroxydation lipidique (PL).

1. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique

1.1. Viabilité des cellules (Test MTT)

Le test MTT est un test rapide qui nous a permis d'évaluer la viabilité des cellules HepG2 après traitement avec nos FGI, il nous a permis également d'évaluer la cytotoxicité de ces fractions sur les cellules. Après traitement (et au passage au microscope et lecture d'absorbance), les résultats du test MTT nous avons enregistré ce qui suit (figure 3.8) :

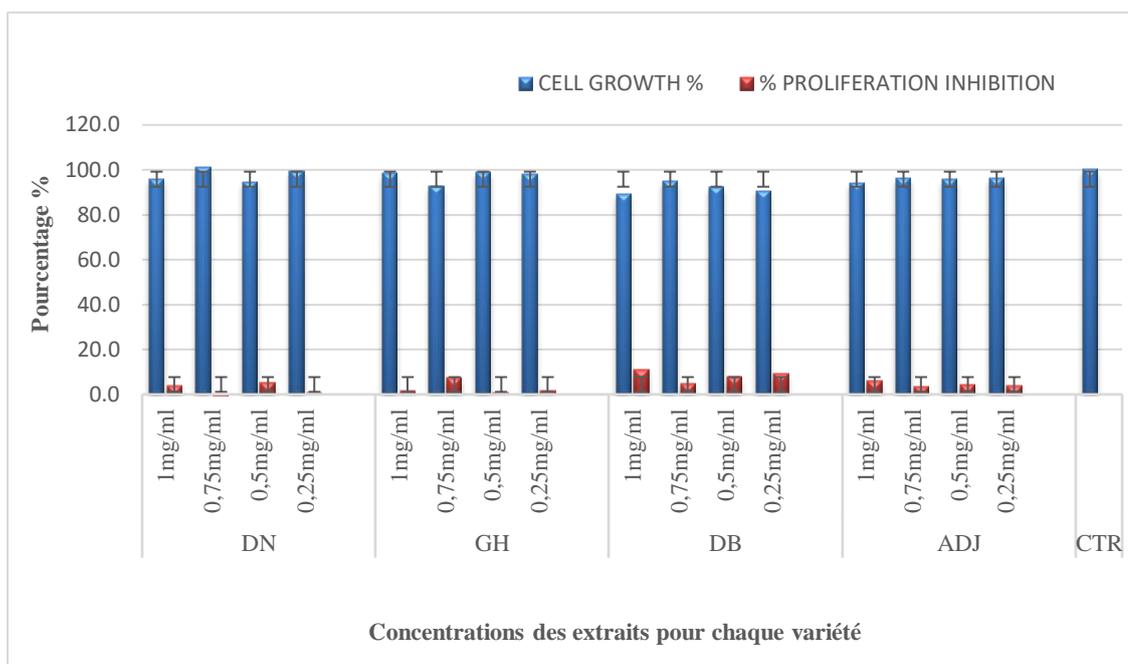


Figure 3.8 : viabilité cellulaire et taux de prolifération cellulaire établis par l'essai MTT.

Les cultures cellulaires traitées par les FGI montraient un taux de prolifération significativement bas par rapport au témoin, ce taux de prolifération est significativement proportionnel à la concentration des FGI. La prolifération cellulaire se traduit par la multiplication abondante des cellulaires carcinomateuses engendrant ainsi une invasion de la tumeur sur un organe. Nos extraits ont montré une efficacité dépendant des concentrations des fractions. Par exemple, la variété GH à la concentration 0,75 mg/ml enregistre un pourcentage de multiplication cellulaire faible par rapport à celui enregistré pour la même variété à 1mg/mL.

En outre, un taux de mortalité cellulaire très bas a été constaté (par microscopie), ce qui fournit plus d'informations sur la cytotoxicité des FGI. L'activité métabolique (métabolisme mitochondrial) des cellules a également été significativement réduite.

1.2. Taux de protéines des cellules HepG2

Lors de l'étude de la peroxydation lipidique au niveau cellulaire (foie, cœur, etc.), le taux de protéines est systématiquement déterminé pour l'expression des résultats des tests (comme le test TBARS).

La figure 3.9 illustre les teneurs en protéines des cellules HepG2 traitées par les FGI des différentes variétés de dattes. En comparant les résultats obtenus pour les FGI des trois variétés au témoin, seule la variété DN (à 0,5 mg/mL et 1 mg/mL) donne un faible taux de protéines, avec 25,63 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 25,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivement. Les variétés DB et GH enregistrent des valeurs moyennement inférieures à celle données par le témoin. La variété Adj est la seule à enregistrer les teneurs les plus élevées comparée aux autres variétés (26,46 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 26,84 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ respectivement).

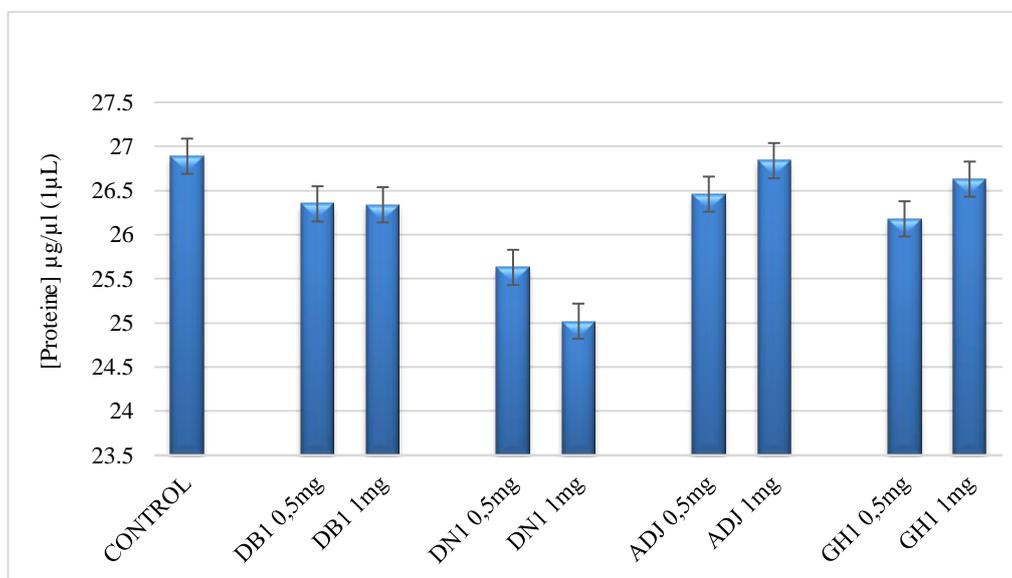


Figure 3.9 : Teneur en protéines des cellules traitées avec les FGI des différentes variétés de dattes. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET de deux expériences indépendantes ($P < 0,001$ par rapport au témoin).

Ces résultats nous renseignent sur l'effet de la FGI riche en polyphénols sur le métabolisme des cellules carcinomateuses. En effet, le taux de protéines dans le milieu cellulaire est une résultante d'une activité de division cellulaire donc de prolifération de masse cellulaire et son développement. La réduction du taux de protéines dans le milieu cellulaire est synonymes d'une inhibition de la division

de ces dernières. Nos résultats montrent que cette inhibition de production de protéines est dose-dépendante. La variété DN semble avoir un excellent effet inhibiteur par rapport aux autres variétés étudiées.

1.3. Les mesures TBARS pour l'évaluation de la peroxydation lipidique

Les TBARS sont un marqueur de peroxydation lipidique, reflet d'une atteinte pro oxydante. Les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique sont considérées comme premier indicateur de la PL [178]. Les résultats sont exprimés en micromoles de MDA / microgramme de protéines. Les taux TBARS dans les cellules HepG2 après traitement sont illustrés dans la figure 3.10.

Les taux des marqueurs TBARS ont été réduits positivement. Les variétés algériennes montrent plus d'efficacité dans l'inhibition de la peroxydation lipidique que la variété saoudienne. En comparant nos données avec celles rapportées pour différents fruits, connus par des teneurs importantes en polyphénols, nous avons conclu que la datte possède un potentiel important contre la peroxydation lipidique.

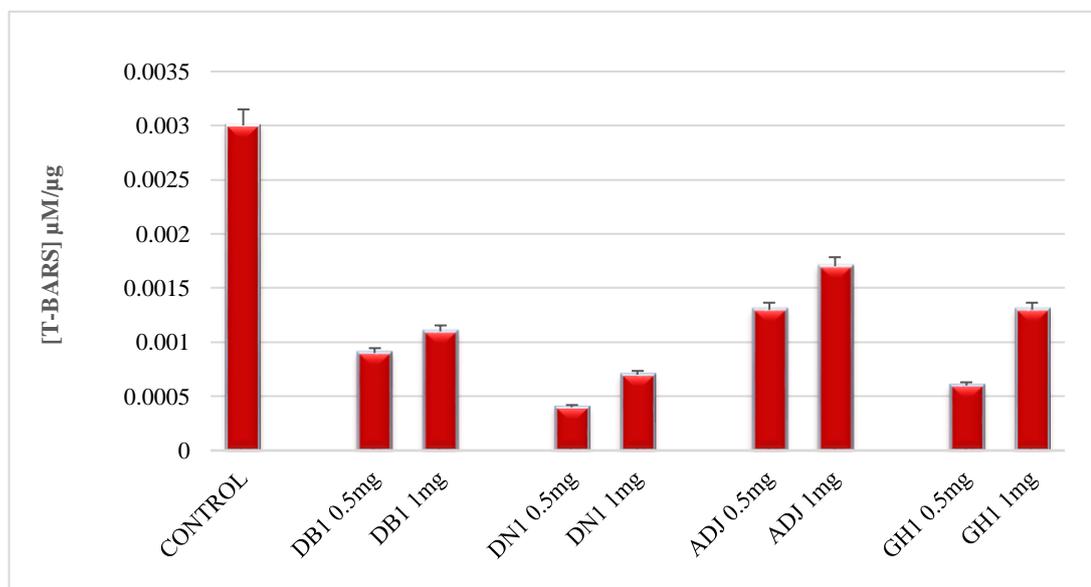


Figure 3.10 : Effet des polyphénols de la FGI des différentes variétés de dattes sur le stress oxydatif cellulaires (HepG2). Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET de deux expériences indépendantes ($P < 0,001$ par rapport au témoin). * TBARS: substances réactives à l'acide thiobarbiturique.

L'inhibition efficace de la peroxydation lipidique cellulaire par les antioxydants présents dans les FGI à la concentration de 0,5 mg/mL comparée à celle donnée par la concentration de 1 mg/mL peut être expliquée par le fait que la réaction à chaud dans des conditions acides avec la présence d'une dose double en antioxydants ont conduit à la surproduction des molécules MDA, et ce suite à une auto-oxydation des lipides. Ceci confirme, que dans certaines conditions, l'excès en antioxydants peut générer un statut pro-oxydant conduisant à des réactions inverses favorisant ainsi un statut de stress oxydatif dans la cellule.

1.4. Production du monoxyde d'azote NO•

La figure 3.11 illustre les résultats de la production du monoxyde d'azote par les cellules HepG2 traitées avec les FGI riches en polyphénols. Des niveaux intéressants d'oxyde nitrique dans le milieu cellulaire ont été révélés après le traitement, en particulier par la variété DB qui donne une valeur significativement élevée (0,32 nmol/mg) à la concentration de 1mg/mL par rapport au témoin (0,042 nmol/mg).

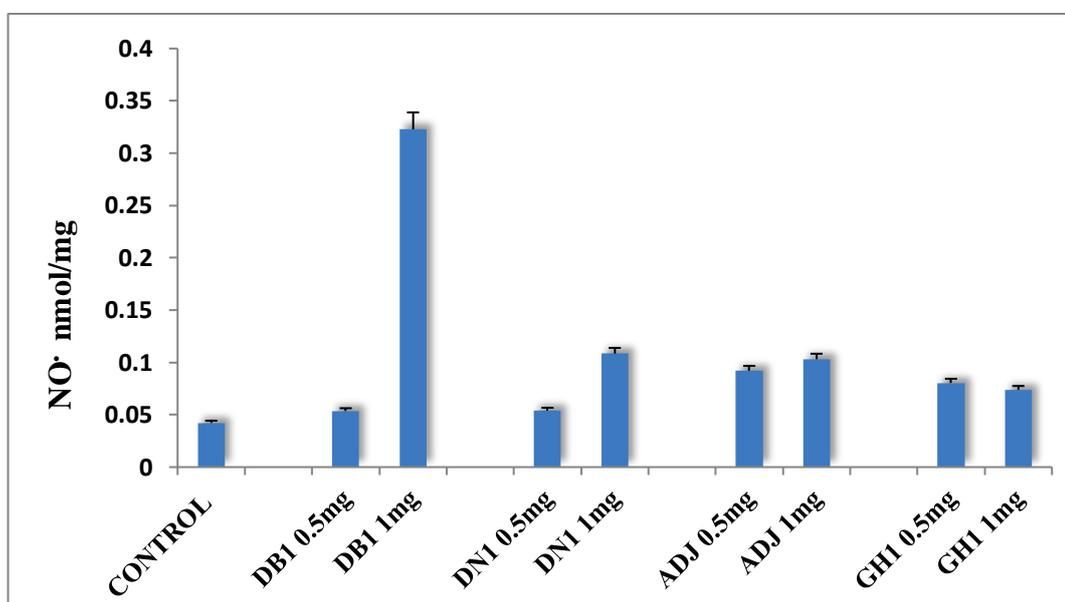


Figure 3.11 : Effet des polyphénols de la FGI lyophilisée (FGI) de différentes variétés de dattes sur le taux du monoxyde d'azote dans le milieu cellulaire. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± ET de deux expériences indépendantes (P <0,001 par rapport au témoin).

Cette augmentation de la libération du NO^{*} dans le milieu cellulaire a été considérée comme ayant des effets bénéfiques sur les fonctions cardiaques [179].

Le monoxyde d'Azote (NO^{*}) est un messager biologique important, il est considéré comme la défense ultime du corps associé à la fonction cytotoxique des macrophages. Il a un rôle majeur dans la neurotransmission, la vasodilatation et la protection contre le développement des tumeurs [180]. De nos jours, il se révèle également être une valeur thérapeutique inestimable; le défaut de fonctionnement des processus physiologiques peuvent souvent être traités en augmentant ou en diminuant la production du NO^{*} dans les cellules. Fait intéressant, ces résultats confirmeraient que les dattes pourraient être une source importante d'agents qui préviennent le stress oxydatif dans les cellules en stimulant leur système de défense antioxydante. La datte peut également jouer un rôle important dans la protection du système NO^{*} cellulaire; en vieillissant, ce système devient moins efficace en raison des dommages causés par les radicaux libres, qui exposent l'organisme à des lésions neuronales, cardiaques et artérielles. Ce potentiel important peut être associée à une réduction de la sensibilité des cellules aux lésions induites par les ROS.

TROISIÈME PARTIE

Étude du pouvoir hypocholestérolémiant des extraits phénoliques de trois variétés de dattes algériennes - Étude *in vivo*

Cette partie a été consacrée à l'étude du pouvoir des extraits phénoliques des trois variétés de dattes algériennes sur l'hypercholestérolémie induite chez le rat. L'étude *in vivo* a été réalisée sous la supervision du personnel habilité à ces pratiques chez Saïdal Antibiotical - Médéa, Algérie.

Lors de cette étude, le modèle animal utilisé a été représenté par des rats *wistar* de sexe male (pour assurer l'homogénéité face aux interférences hormonales). Les extraits des trois variétés de dattes : Deglet nour (DN), Degla baïda (DB) et Ghars (GH) ont été utilisés. Issus uniquement des extractions à l'éthanol, et renouvelés périodiquement (chaque 3 jours), les extraits purifiés et stérilisés ont été initialement testés sur des souris pour vérifier leur toxicité.

1. Test toxicologique

Les résultats du test de toxicité ont montrés que les animaux utilisés pour l'étude de toxicité n'avaient présenté aucun symptôme; aucun signe clinique n'a été détecté et un taux de mortalité négatif tout au long des jours de traitement a été confirmé. L'observation physique des souris traitées n'avait montré aucun érythème local ou général ni choc anaphylactique, aucune hyperactivité, aucun régime alimentaire déséquilibré, pas de diarrhée ni de vomissements.

Ces constatations ont permis de qualifier les extraits de non-toxiques, leur usage pour la prochaine étape du test de l'activité hypocholestérolémiant est donc sans risque.

2. Étude de l'activité hypocholestérolémiante des extraits

2.1. L'indice de peroxyde de l'huile oxydée dans l'induction de l'hypercholestérolémie

L'indice de peroxyde s'intéresse au nombre d'oxygène actif dans les chaînes organique des corps gras. Il permet d'évaluer le degré d'oxydation des acides gras insaturés présents dans notre huile végétale (huile de tournesol). La consommation régulière met le consommateur sous stress oxydatif en continu d'où l'importance de mesurer l'indice de peroxyde.

La valeur obtenue pour cet indice (qui est égale à 12.35 ± 0.2) indique que notre huile de tournesol est oxydée car plus l'indice de peroxyde est élevé, plus la matière grasse est oxydée.

2.2. Tests *in vivo*

L'effet de différents extraits de dattes sur le métabolisme des lipides a été examiné en déterminant les taux de lipoprotéines dans le sérum sanguin.

Pour évaluer l'effet anti-hyperlipidémique des polyphénols de datte, les rats recevaient (par gavage) de l'huile comestible oxydée pendant trois semaines; date à laquelle les extraits phénoliques ont été administrés par voie intra péritonéale par dose unique (300 mg / kg) et la quercétine (2,5 mg / kg) a été fournie à titre de comparaison. Au jour 0 et avant le début du traitement, tous les groupes d'animaux sont considérés comme des sujets référence pour les futurs prélèvements sanguins (figure 3.12). À ce stade, tous les lots diffèrent par de petits pics de triglycérides et de cholestérol total. Le lot huile oxydée se distingue des autres lots par son taux de Cholestérol total qui est égale à 0,88 g/L. En moyenne, le taux du HDL (bon cholestérol) est de 0,6 g/L pour l'ensemble des lots.

Selon la figure 3.12, le profil lipidique semble être physiologiquement équilibré et le bilan est plutôt normal comparé aux normes biologiques. Les petites fluctuations enregistrées peuvent être dues au comportement alimentaire des rats (quantités de granulées ingérées).

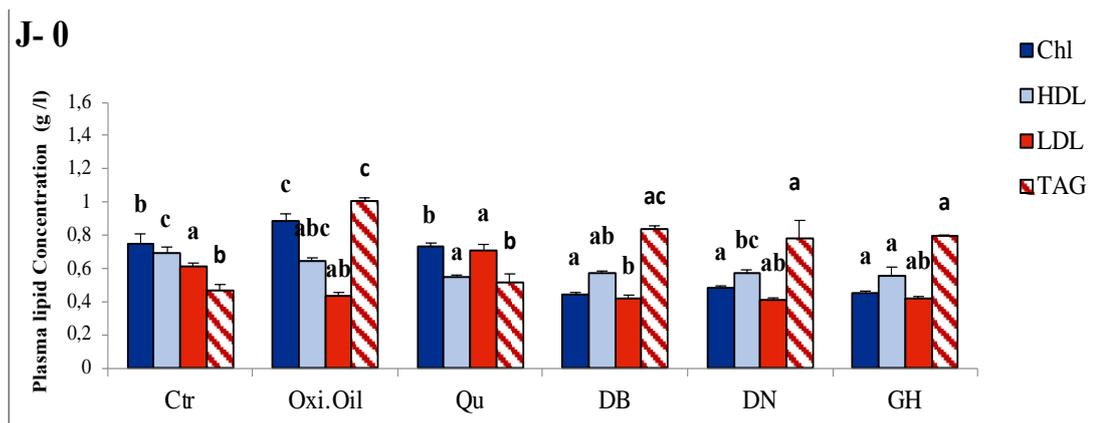


Figure 3.12 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J0 en g/L.

Au cours de la première semaine de traitement suivant le régime défini pour chaque lot, de légères modifications du profil lipidique ont été notées (figure 3.13); les valeurs sont toujours dans les normes par rapport au témoin (Ctr). Après la première semaine, les données ont révélé une augmentation significative ($P < 0,001$) du cholestérol total sérique, des triglycérides et du LDL-cholestérol chez les lots ayant une hypercholestérolémie induite et traités par des extraits de dattes, avec un niveau positif maintenu de HDL-cholestérol ($P < 0,05$) par rapport aux rats témoins et valeurs enregistrées avant de commencer le traitement.

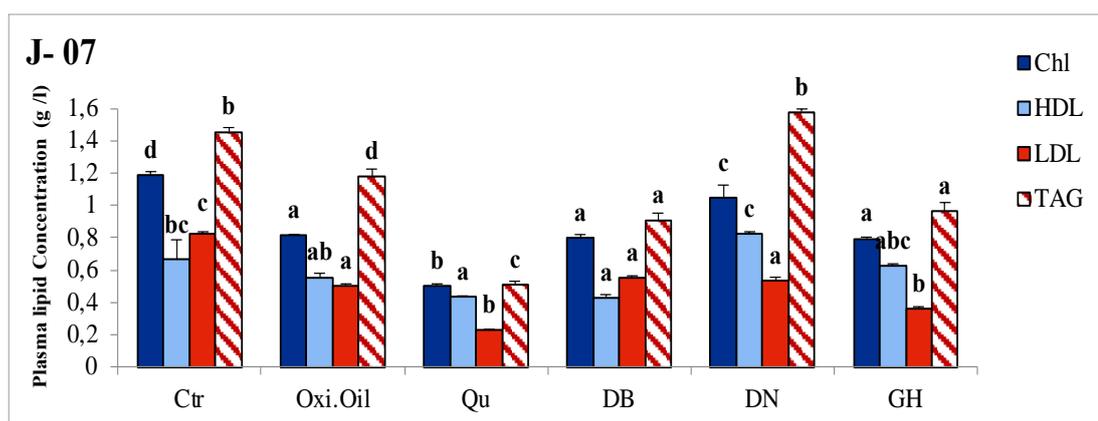


Figure 3.13 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J7 en g/L.

Au cours de la deuxième semaine (Figure 3.14), le traitement des rats ayant une hyperlipidémie par des extraits de polyphénols de datte a induit une diminution

significative du cholestérol sérique (-51% pour le DB, -31% pour la GH et -30% pour le DN) et du triacylglycérol (-61% pour le DN, -54% pour DB et -32% pour GH et). La variété DB a montré la meilleure diminution significative du taux de LDL-cholestérol (-53%) par rapport aux extraits des autres variétés. Pendant ce temps, le contrôle positif traité par la quercétine a maintenu un profil lipidique stable.

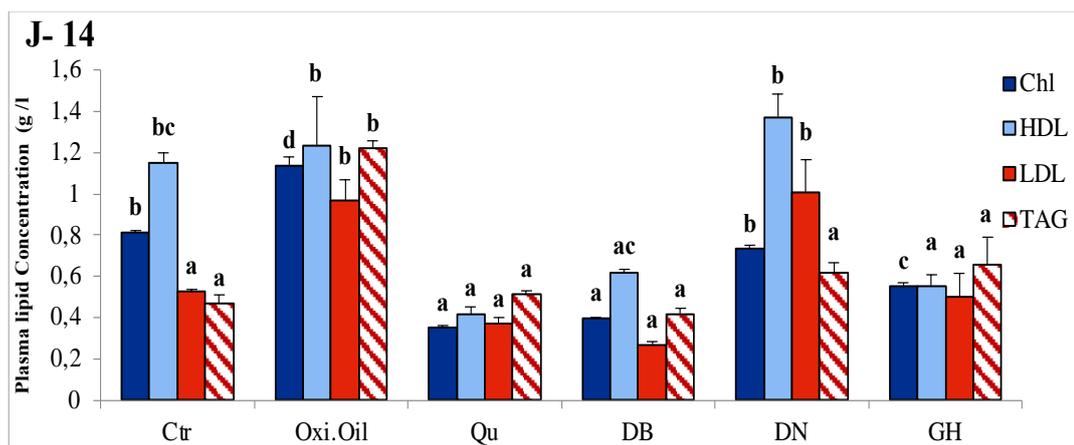


Figure 3.14 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J14 en g/L.

Sur la période de trois semaines, les résultats sont plutôt peu concluants puisque les profils lipidiques des rats traités montrent une perturbation dans la première semaine de traitement mais, après la deuxième et pendant la troisième semaine de traitement (Fig. 3.15), on observe une stabilité à la baisse des constantes biologiques, notant que seul le groupe des huiles oxydées a montré une augmentation continue de son cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol et triacylglycérol.

Le mécanisme d'action possible par lequel l'activité des extraits phénoliques a été liée à l'effet hypolipidémiant chez les rats avec hyperlipidémie induite peut être expliqué par l'interférence de ces métabolites secondaires avec l'absorption intestinale du cholestérol diététique ou sa modulation [181]. De même, les interactions entre les métabolites secondaires et le cholestérol peuvent favoriser son excrétion fécale [182]. Le mécanisme d'action est intéressant, mais il y a encore un grand manque de preuves de l'efficacité de la réduction du cholestérol chez l'homme.

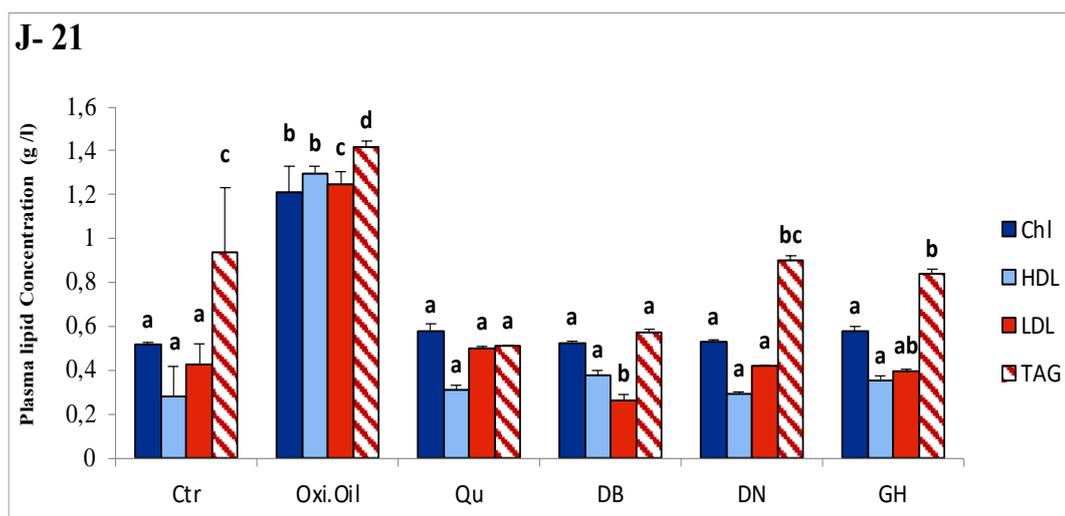


Figure 3.15 : Bilan lipidique du prélèvement sanguin à J21 en g/L.

Ces résultats semblent correspondre aux données des essais sur les cellules HepG2 et qui sont cohérents avec les études précédentes [116]. La variété DB a montré une augmentation significative du taux de HDL-cholestérol chez le rat et un niveau important du NO^{*} dans le milieu cellulaire (HepG2); ces résultats peuvent être corroborés par la teneur importante en fibres solubles de cette variété de datte par rapport aux autres variétés utilisées. De nombreuses études avaient démontré que les aliments riches en antioxydants associés à un apport en fibres alimentaires préviennent les maladies cardiovasculaires [183; 184] en modulant les taux plasmatiques et hépatiques des lipides [185].

CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent les effets bénéfiques de la datte sur le métabolisme lipidique et son rôle important dans la prévention des maladies et le maintien d'une bonne santé. Cette étude a donc permis de valider l'ensemble de nos hypothèses. Il résulte des travaux de nature fondamentale visant le suivi de la maturation phénolique de la datte, une image éclairée sur le mécanisme de formation et métabolisation des métabolites secondaires tout au long du cycle de formation du fruit. Ce suivi nous a permis de comprendre globalement le devenir des composés phénoliques au sein de la cellule dès la fécondation jusqu'à maturité. Pendant la période de maturation, les composés phénoliques varient significativement d'un stade à l'autre, et d'une variété à l'autre. De la véraison à la maturité, la teneur en polyphénols baisse et la baie de datte s'en appauvrit pour l'ensemble des variétés étudiées. Néanmoins, et à maturité, la datte reste une bonne source de ces molécules.

En revanche, nous avons prouvé que l'activité antioxydante des polyphénols de la date évolue significativement tout au long de la maturation. Le profil phénolique de la datte obtenu par HPLC-DAD n'a pas été à la hauteur de nos attentes, la présence abondante des sucres et de fibres peuvent être à l'origine d'une difficulté de libération des composés phénoliques.

De plus, notre étude a démontré que la peroxydation des lipides était significativement réduite et que le niveau d'antioxydants endogènes était significativement augmenté (libération de NO•). Conformément aux observations des différents groupes de l'étude *in vivo*, il ressort clairement que l'administration de nos extraits de dattes aux rats ; chez lesquels on a induit

une hypercholestérolémie, avait amélioré leur profil lipidique, et ce durant trois semaines de traitement. Le profil phénolique des trois variétés de dattes algériennes étudiées ainsi que son association à d'autres métabolites potentiellement bioactives peut être responsable de ce pouvoir hautement significatif contre le stress oxydatif cellulaire, à la fois physiologique ou induit par les peroxydes. Le pouvoir antioxydant et antihyperlipidémiant des différents extraits de dattes étaient des résultats attendus. Cependant, la datte est considérée comme l'un des aliments anti-hypercholestérolémiants prometteurs qui pourraient prévenir les maladies cardio-vasculaires.

L'intérêt de cette étude consistait surtout en l'apport de nouvelle hypothèse sur les effets physiologiques des composés de la baie de datte. Notre projet se démarque des autres recherches réalisées à ce jour, par l'amendement de nouvelles preuves sur le plan cellulaire ; en effet, et à notre connaissance, aucune autre étude n'avait exploré cet aspect sur des cultures cellulaires d'un carcinome humain. Cependant, ce travail nécessite d'être soutenu par d'autres recherches visant à mieux comprendre les mécanismes d'actions des polyphénols au niveau cellulaire et l'exploration profonde et détaillée des effets protecteurs de ce fruit, permettant ainsi sa valorisation en pharmacologie et en agroalimentaire.

APPENDICES

Annexe I

1. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (tableau 1) qui se différencient d'abord pour la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), en fin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques...)

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques

Classe	Squelette carbonée	Exemple
Acides phénoliques	C ₁ -C ₆	Acide gallique, ac. vanillique, ac. Tannique
Acides hydroxycinnamiques	C ₆ -C ₃	Ac. férulique, ac. caféique, Ac. ρ -coumarique
Coumarines, Isocoumarines	C ₆ -C ₃	Scopolétine, esculétine, umbélliférone.
Stiblenes	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Anthraquinones	C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
Flavonoïdes	C ₆ -C ₃ -C ₆	
	(C ₆ -C ₃) ₂	Kaempférol, quercétine, Cyanidine, pélargonidine
		Catéchine, épicatechine, Naringénine, Daidzéine
Lignanes, neolignanes	(C ₆ -C ₃) ₂	Pinorésinol
Lignines	(C ₆ -C ₃) _n	
Tanins	(C ₁₅)	

1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont largement répons chez les plantes. Ils dérivent principalement de l'acide benzoïque et l'acide cinnamique.

Tableau2 : Représentation des groupes d'acides phénols dérivants de l'acide hydroxybenzoïque.

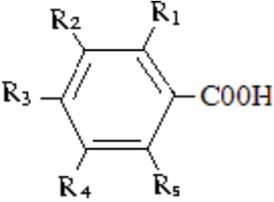
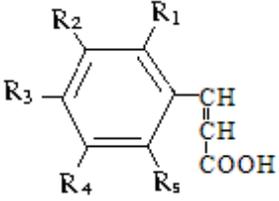
Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	H	H	H	H	Ac. benzoïque /non phénolique
	H	H	OH	H	H	Ac. P-hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	H	Ac. protocatéchique
	H	OCH ₃	OH	H	H	Ac. vanillique
	H	OH	OH	OH	H	Ac. Gallique

Tableau 3 : Représentation des groupes d'acide phénol dérivant de l'acide hydroxycinnamique

Structure	R1	R2	R3	R4	R5	Dénomination
	H	H	H	H	H	Ac. Cinnamique /non phénolique
	H	H	OH	H	H	Ac. P-coumarique
	H	OH	OH	H	H	Ac. Caféique
	H	OCH ₃	OH	H	H	Ac. Férulique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Ac. Sinapique

La liste des acides phénoliques présents dans les plantes ne s'arrête pas là, nous tenons à mentionner en particulier : l'acide méthylgallique, l'acide chlorogénique et l'acide rosmarinique.

Les acides phénoliques comportent un radical COOH. Ils se trouvent souvent sous la forme de glycosides ou d'esters.

1.2. Les flavonoïdes

De structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆), ce groupe comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dont certaines ont une très grande importance biologique et technologiques comme les anthocyanes, pigments rouges des fleurs et des fruits .

Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme hydroxylée et combinés à diverses molécules, ce qui explique la grande variété de ces composés.

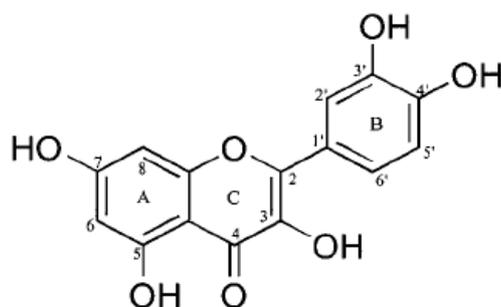
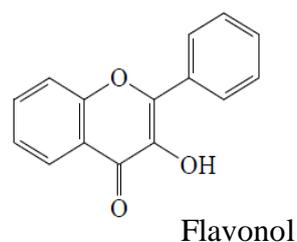
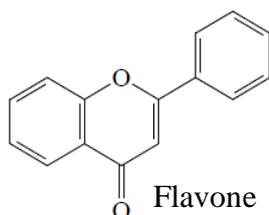
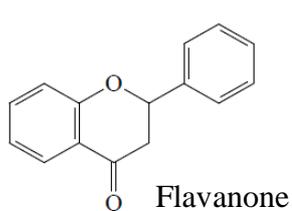


Figure 1 : Structure générale du noyau des flavonoïdes.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C [59], 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répondus et les mieux caractérisés : flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols et anthocyanidines. Les figures suivantes représentent quelques structures des éléments de la principale sous-classe des flavonoïdes :



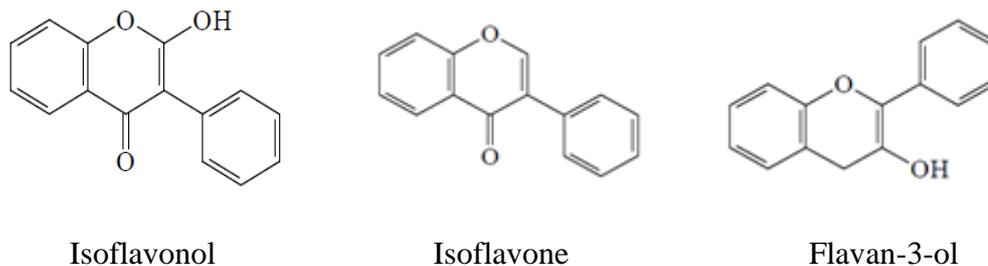
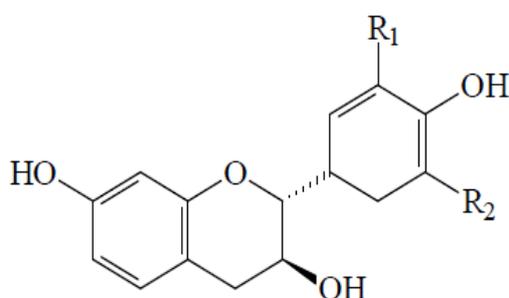


Figure 2 : Structures de quelques flavonoïdes.

1.3. Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines. Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau. Les tannins sont très répandus dans le monde végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre. On distingue, d'après leur structure et leurs propriétés, deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.



Tanins	R ₁	R ₂
Afzéléchol	H	H
Catéchol	OH	H
Gallocatéchol	OH	OH

Figure 3 : Structures de quelques tanins.

1.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes, la stilbène oxydase et les peroxydases . Contrairement aux flavonoïdes, ces composés sont peu réponsus chez les végétaux ; le raisin et le vin rouge constituent leur source alimentaire la plus importante.

Stilbènes	R ₁	R ₂
Ptérostilbène	O-CH ₃	O-CH ₃
Resvératrol	OH	OH
Picéide	OGlc	OH

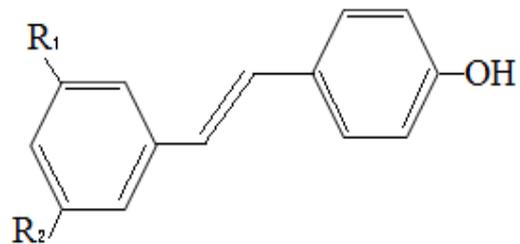


Figure 2.4 : Structures chimiques de quelques stilbènes.

1.5. Les lignanes

Les lignanes sont des composés dont les deux noyaux aromatiques sont reliés par quatre atomes de carbone. Elles se trouvent souvent dans le bois des gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les angiospermes.

Annexe II

1. Gamme d'étalonnage des polyphénols

Une gamme de neuf concentrations d'acide gallique allant de 0 à 0.17mg/ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0.2mg/ml de concentration.

Tableau 2.1 : Gamme d'étalonnage des polyphénols

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume pris de la solution mère (en ml)	0	0.5	0.1	0.25	0.4	0.5	0.65	0.75	0.85
Volume ajouté d'eau distillée (en ml)	1	0.95	0.9	0.75	0.6	0.5	0.35	0.25	0.15
Concentration finale de l'acide gallique (en mg/ml)	0	0.01	0.02	0.05	0.08	0.1	0.13	0.15	0.17

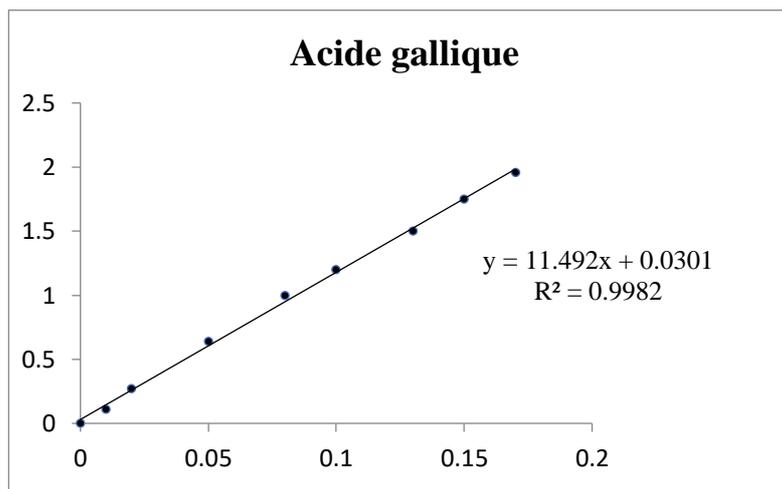


Figure 2.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

2. Gamme d'étalonnage des flavonoïdes

Une gamme de 10 concentrations de quercétine allant de 0 à 40 µg / ml a été préparée à partir d'une solution mère de 40 µg /ml de concentration (400 µg de Quercétine dissoute dans 10ml de méthanol)

Tableau 2.2 : gamme d'étalonnage des flavonoïdes

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume pris de la solution mère (en ml)	0	0.2	0.4	0.8	1.1	1.5	1.8	2.3	2,6	3,0
Volume ajouté d'eau distillée (en ml)	3	2.8	2.6	2.2	1.9	1.5	1.2	0.7	0.4	0,0
Concentration finale de la quercétine (en mg/ml)	0	2.5	5,0	10	15	20	25	30	35	40

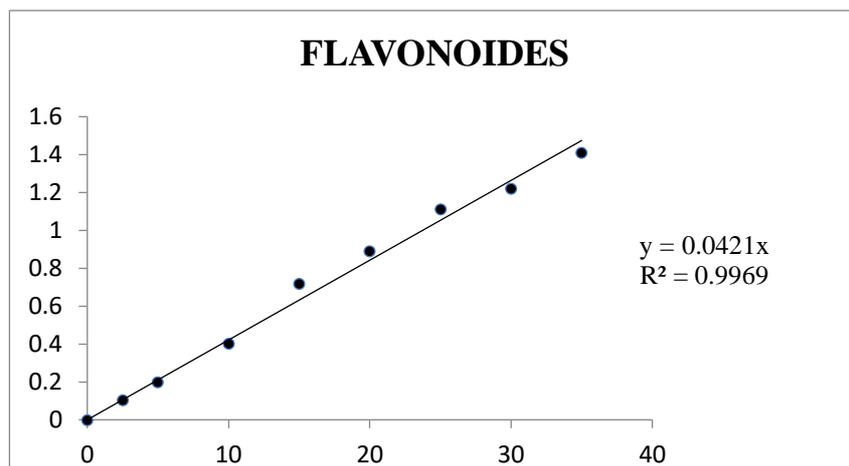


Figure 2.2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

3. gamme d'étalonnage du β - carotène.

Tableau 2.3 : gamme d'étalonnage du β -carotène

Concentration β - carotène ($\mu\text{g/ml}$)	0	2.5	5	10	15	20	25
Abs (470 nm)	0	0,12	0,679	1,289	1,733	2,136	2,355

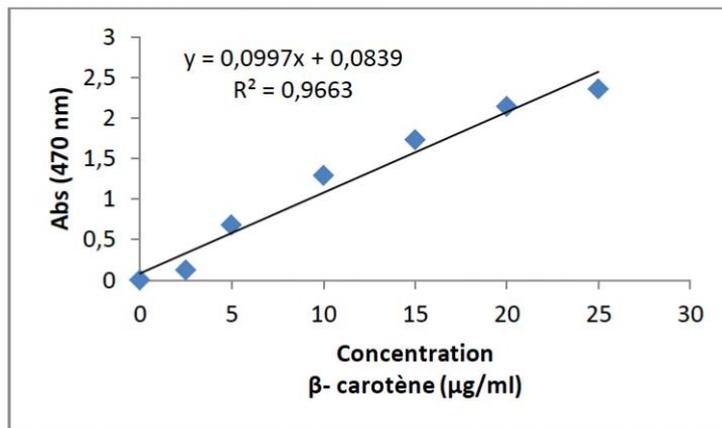


Figure 2.3 : Courbe d'étalonnage du β -Carotène

4. Les chromatogrammes représentant les pics obtenus pour les polyphénols standards

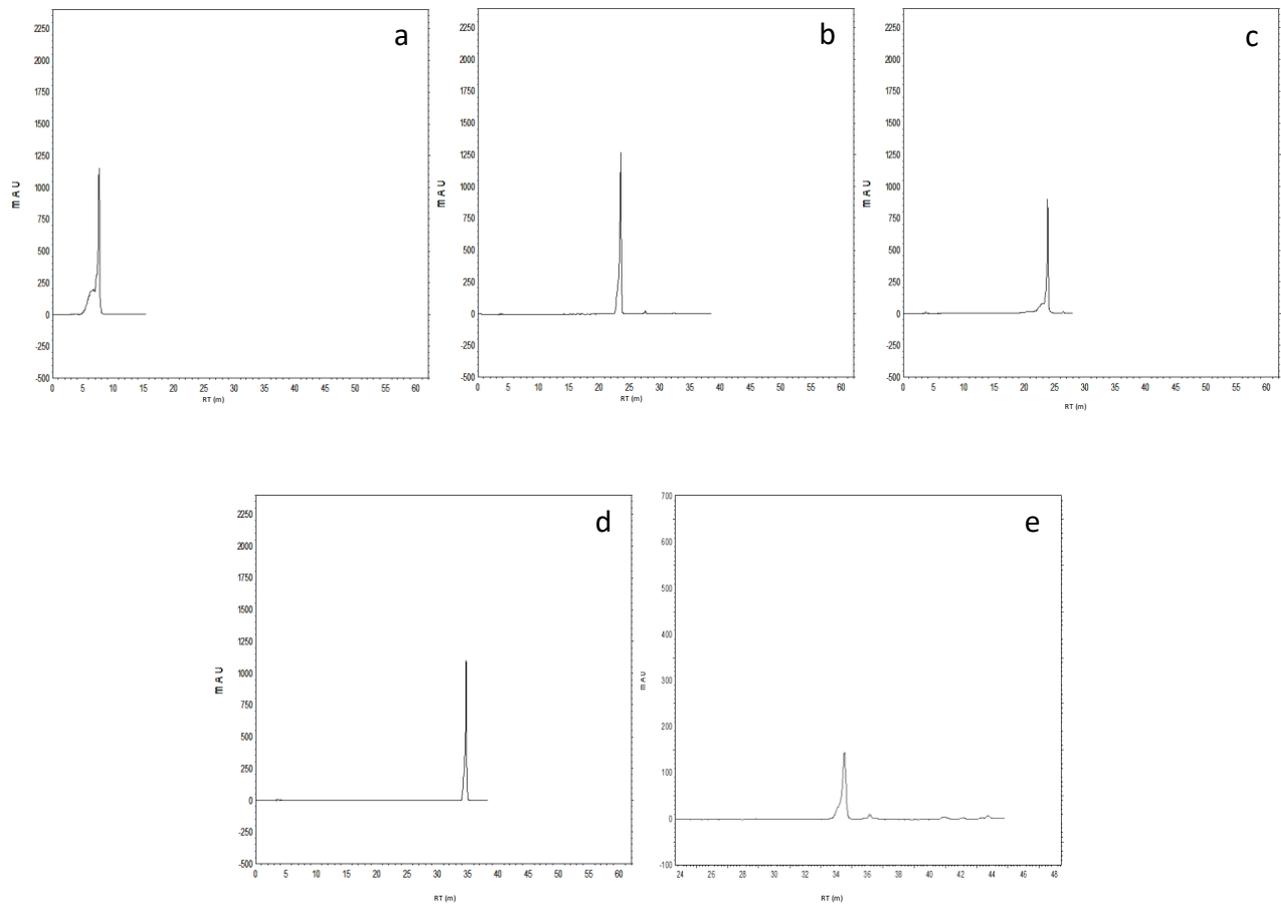
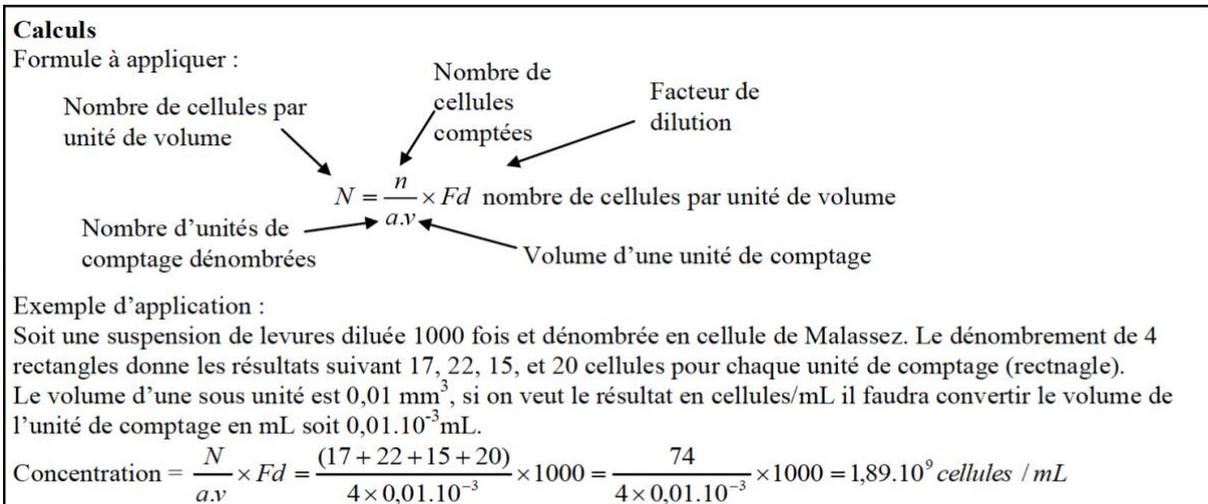
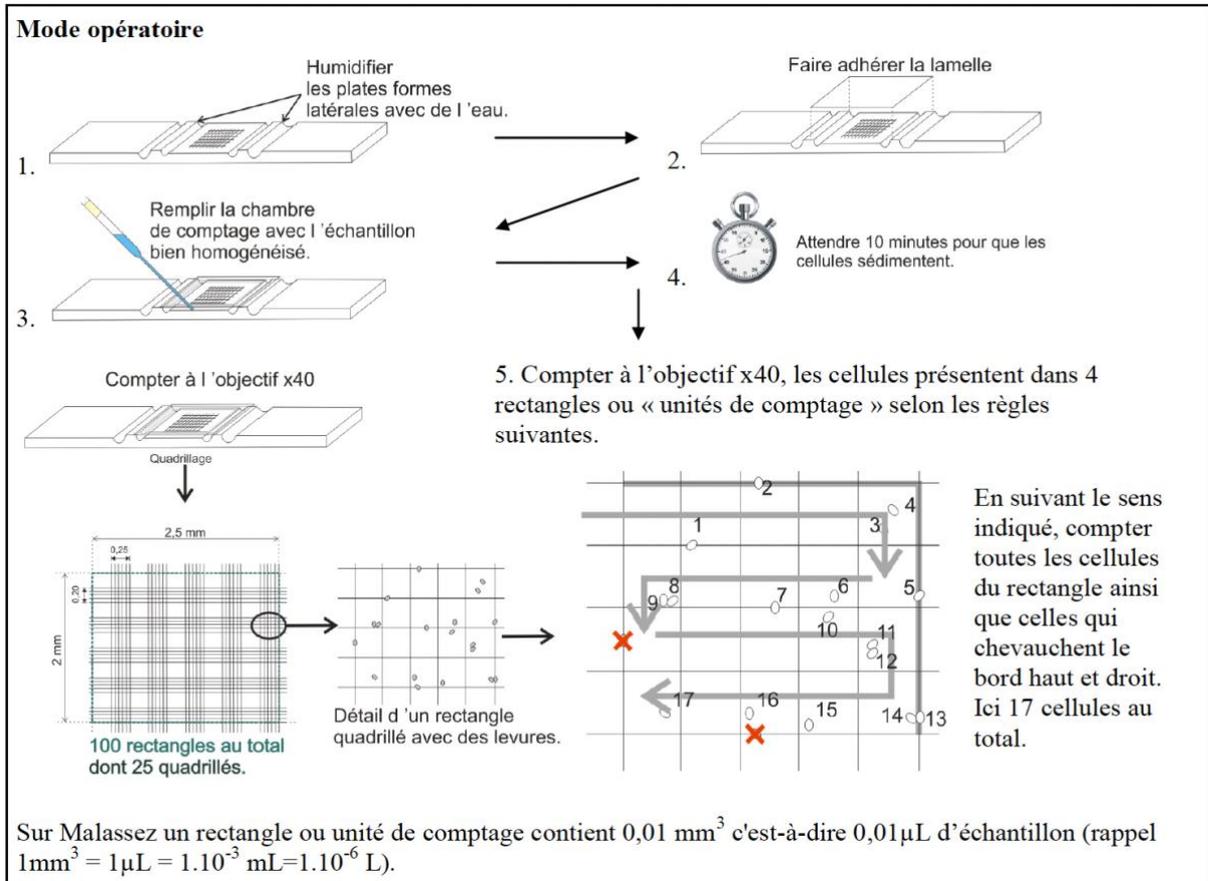


Figure 2.4 : Chromatogrammes des composés phénoliques de référence. a : acide gallique, b : acide vanillique, c : acide chlorogénique, d : acide ferulique, e : quercétine

5. Méthode de comptage des cellules après culture



Remarque : Il existe différents types d'hématimètres qui diffèrent de Malassez par le volume de l'unité de comptage ou par le nombre total d'unité de comptage. La formule pour le calcul est la même il faut juste adapter la valeur de v. Exemples : hématimètre de Thomas, cellule de Nageotte, cellule KovaSlide (analyse d'urines).

Figure 2.5 : Illustration de la méthode du comptage des cellules après culture

Source : Rémi Moreda – Lycée Docteur Lacroix – Narbonne - 2013

Annexe III

Résultats de la composition biochimique de la datte

Tableau 3.1 : Teneur en potassium (mg/100g MS) des différentes variétés de datte au cours de la maturation.

	D.B	D.N	GH	Mech. DG
Kimri	928,87±1,12 ^A	610,14±1,42 ^B	645,24±1,39 ^C	882,20±1,72 ^D
Khalal	876,29±1,03 ^A	535,10±1,12 ^B	621,62±1,54 ^C	760,52±1,31 ^D
Routab	617,11±0,14 ^A	352,04±0,13 ^B	460,12±0,08 ^C	679,04±0,11 ^D
Tamr	546,12±0,12 ^A	581,70±0,09 ^B	487,73±0,11 ^C	590,47±0,07 ^D

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

Tableau 3.2 : La teneur en sodium (mg/100g MS) de différentes variétés de datte au cours de la maturation.

	D.B	D.N	GH	Mech. DG
Kimri	13,68±0,27 ^A	12,89±0,56 ^A	20,48±0,15 ^B	21,38±0,68 ^B
Khalal	20,16±0,23 ^A	18,21±0,38 ^B	28,59±0,41 ^C	32,45±0,29 ^D
Routab	15,21±0,19 ^A	14,23±0,21 ^A	26,02±0,14 ^B	26,13±0,16 ^B
Tamr	17,86±0,05 ^A	15,42±0,11 ^B	25,89±0,09 ^C	28,16±0,08 ^D

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

Tableau 3.3 : Évolution de la teneur en sucres des trois variétés de dattes au cours des différents stades de maturation.

Variétés de dates	Stade de maturité	Sucres réducteurs	Saccharose	Sucres totaux
DN	Kimri	09,25% ± 0.03 ^A	01,87% ± 0,04A	11,13% ± 0,08A
	Khalal	04,98% ± 0.38 ^B	16,11% ± 0,42B	21,10% ± 0,42B
	Routab	08,98% ± 0.02 ^B	18,11% ± 0.21B	27,10% ± 0,36B
	Tamr	16,98% ± 0,80 ^B	36,12% ± 0.18B	53,10% ± 0,10B
GH	Kimri	08,12% ± 0.03 ^A	02,13% ± 0,01A	10,26% ± 0,02A
	Khalal	19,08% ± 0.54 ^C	12,79% ± 0,61C	31,87% ± 0,21C
	Routab	32,83% ± 0.21 ^C	05,04% ± 0.41C	37,87% ± 0,28C
	Tamr	62,08% ± 1,31 ^C	03,53% ± 0.01C	65,62% ± 1,16A
DB	Kimri	08,12% ± 0.02 ^A	01,79% ± 0,05A	09,91% ± 0,02A
	Khalal	14,66% ± 0.58A	29,49% ± 0,54A	44,15% ± 0,36A
	Routab	25,91% ± 0.42A	24,24% ± 0.34A	50,15% ± 0,48A
	Tamr	36,41% ± 1,02A	27,74% ± 0.11A	64,15% ± 1,31A

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADJ: Adjwa

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ABTS: Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ATP: Adénosine Triphosphate

BHT: Butyle- Hydroxy-Toluène

BHA: Butyle- Hydroxy-Anisole

CA: Acide chlorogénique

CoA: Co-enzyme A

Chl: Choleterol

CT: Cholestérol total

Ctr: Control

DB: Degla Baida

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DN : Deglet Nour

DPPH : Di-Phényle-Picryl-Hydrasyl

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EP : extraits phénoliques

eNOS : Synthase endothéliale de l'oxyde nitrique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FA : Acide férulique

FGI: Fraction gastro-intestinale

FAO : Food and agriculture organization

FBS: Fœtal Bovine Serum

FRAP: Ferric Reducing-Antioxidant Power

FW: Fresh Weight

GA: Acide gallique

GAE: Gallic Acid Equivalent

GH : Ghars

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé disulfure

HBA: L'acide hydroxybenzoïque

HDL : High Density Lipoprotein

HepG2 cells: Cellules du carcinomes hépatique humain

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HPLC : High Performance Liquide Chromatography

HPLC-DAD: Chromatographie liquid haute performace - Détecteur à barrette de photodiodes

HSD : Honest Significant Difference

ITDAS : Institut technique du développement de l'agronomie saharienne

LDL: Low density lipoprotein

MS: Matière sèche

MTT : 3- (4,5-diméthylthiazol-2-bromure de yl) -2,5-diphényltétrazolium

NO: monoxyde d'azote

OH: Radical hydroxyle

O₂⁻: Anion superoxyde

ONOO: Péroxynitrite

Ox.Oil : Huile oxydée

PL : Peroxydation lipidique

Qu: Quercétine

R&D : Recherche et Développement

R-GSSG: Glutathion réductase

ROO·: Radical peroxy

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

SOD: Super-oxyde dismutase

TAG : Triglycérides

T-BARS: l'acide 2-thiobarbiturique

TPTZ: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

UV: ultra-violet

VA: Acide vanillique

RÉFÉRENCES

- [1] Atamer, A., Bilici, A., Yenice, N., Selek, S., Ilhan, N. et Atamer, Y., “The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis”, *Journal of international medicine research*, V. 36, n° 4, (2008), 771–776.
- [2] Santhakumar, A. B., Battino, M. et Alvarez-Suarez, J. M., “Dietary Polyphenols: structures, Bioavailability and Protective Effects against Atherosclerosis”, *Food Chemical Toxicology*, V. 113, (2018), 49–65.
- [3] World Health Organization, “Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation”. WHO Technical Report Series, n°916, Geneva (2003).
- [4] Ness, A. et Powles J. W., “Fruit and vegetables, and cardiovascular diseases: a review”, *International Journal of Epidemiology*, V. 26, n° 1, (1997), 1-13.
- [5] Trichopoulou, A., Androniki, N. et Vasilopoulou, E., “Guidelines for the intake of vegetables and fruits : the Mediterranean approach”, *International Journal for Vitamin and Nutrition Cancer*, V. 71, n°3, (2001), 149-153.
- [6] Bravo, L., Polyphenols: “chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance”, *Nutrition Reviews*, V. 56, n°11, (1998), 317-333.
- [7] Belguedj, M., « Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-Est algérien », *Dossiers - Documents – Débats, Inra Alger*, N° 1, (2002).

- [8] Baliga, M. S., Baliga, B.R.V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P. et Vayalil, P.K, “A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (Phoenix dactylifera L.)”, Food Research International, V. 44, n°7, (2011), 812–1822.
- [9] FruiTrop, « Le point sur : Marché européen de la datte, une progression forte et continue », CIRAD, N°255, (2018), 26-31.
- [10] National Office Of Statistics, « La production Agricole en Algérie », Statista Research Departement, Algeria, (2019), p11.
- [11] Belguedj, M., « Evaluation du sous-secteur des dattes en Algérie », INRAA El-Harrach, (2007).
- [12] Tirichine, A., « Études des ressources génétiques du palmier dattier, Whyte, R.O., 1957 : prospection, récolte et introduction des plantes », Rome, (1997), 126p.
- [13] Espiard, E., « Introduction à la transformation industrielle des fruits », Edition Tech et Doc., Lavoisier, (2002), 360 p.
- [14] Munier, P., « Le palmier dattier », Edition Maisonneuve, Paris, (1973), 221 p.
- [15] Dowsen, V. H. W., Aten, A., “Récolte et conditionnement des dattes”, Food Agriculture Organisation, Rome, (1963), 397 p.
- [16] Peyron, G. et Gay, F., « Contribution à l'évaluation du patrimoine génétique Egyptien: phénologie du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) », CIRAD-DSA, (1988).
- [17] Barreveled, W. H., « Date palm products”, Food Agriculture Organization Agricultural services, Rome, Bulletin N° 101, (1993), 211 p.
- [18] Reynes, M, “Influence d’une technique de désinfestation par micro-ondes sur les critères de qualité physico-chimiques et biochimiques de la datte », Alimentation et Nutrition.

Institut National Polytechnique de Lorraine. Thèse de doctorat d'institut national polytechnique de Lorraine. 182p.

- [19] Booj, A, Piombo, G, Risterucci, J. M., Coupe, M., Thomas, D. et Ferry, M., “Étude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*L.) », *Fruits*, V. 47 n° 6, (1992), 667–678.
- [20] Chafi, A., Benabbes, R., Bouakka, M., Hakkou, A., Kouddane, N. et Berrichi, A., « Pomological study of some date palm varieties cultivated in Figuig oasis », *Journal of Materials and Environmental Science*, V. 6, (2015), 1266–1275.
- [21] Al Farsi, M. A. et Lee, C. Y., « Nutritional and functional properties of dates: a review », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V. 48, (2008), 877–887.
- [22] Al-Shahib W. et Marshall, R. J., “The fruit of the date palm: its possible use as the best food for the future”, *Food Science and Nutrition*, V. 54, (2003), 247-259.
- [23] Besbes, S., Drira, L., Blecker, K., Deroanne K. et Hamadi, A., “Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera* L.): compositional, functional and sensory characteristics of date jam” *Journal of Food Chemistry*, V. 112, (2009), 406-411.
- [24] Yahiaoui, K. « Caractérisation physico-chimique et l'évolution du brunissement de la datte Deglet-Nour au cours de la maturation », Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, (1998), 103 p.
- [25] Estanove, P., « Note technique : Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, Systèmes agricoles oasiens », Edition CIHEAM, série A, n°11., (1990), 301-318.
- [26] Noui, Y., « Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla », Thèse de Magister, spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès, (2007), 62 p.

- [27] Favier, J. C., Ireland, R. J., Laussucq, C. et Feinberg, M., « Répertoire général des aliments.,Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d’Afrique », Tome III, Edition ORSTOM, Lavoisier, INRA Editions, (1993), 27-28.
- [28] Siboukeur, O., « Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes », Thèse Magister, INA. El-Harrach, Alger, (1997), 106 p
- [29] Djidel, A., « Production de l’acide lactique par lactobacillus casei sibs p. sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues », Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, (2007), 152p.
- [30] Djouab, A., « Essai de formulation d’une margarine allégée à base d’un extrait de dates Mech-degla », Thèse de Magister, spécialité génie alimentaire, Université de Boumerdès, (2007), 102 p.
- [31] Açourene, S., Buelguedj, M., Tama, M. et Taleb, B., « Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Zibans », Recherche Agronomique, Edition INRAA, n° 8, (2001), 19-39.
- [32] Vilkas, M., « Vitamines », Edition Hermann, (1993), 158 p.
- [33] Al-Shahib, W. et Marshall, R.J., “Dietary fiber content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera L.*,” International Journal of Food Science and Technology, V. 37, (2002), 719-721.
- [34] Ben Chabane, A., « Rapport de synthèse de l’atelier "Technologie et qualité de la datte". In Options méditerranéennes, série A, N° 28. Séminaires méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain, (1996), 205-210.
- [35] Albert L., « La santé par les fruits », Edition VEECHI, (1998), 44-74.
- [36] Jaccot, B. et Campillo, B., « Nutrition humaine », Edition MASSON, Paris, (2003), 311p.

- [37] Mansouri, A., Emberek, G., Kokkalou, E. et Kefalas, P., “Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date fruit (*Phoenix dactylifera L.*)”, *Food chemistry*, V. 48, (2005), 411- 426.
- [38] Henk, J., Zwir, E. et Rik L., « Caroténoïdes et flavonoïdes contre le stress oxydatif », *Arômes Ingrédients Additifs*, n° 44, (2003), 42-45.
- [39] Devshony, S., Eteshola, E. et Shani, A., “Characteristics and some potential applications of date palm (*Phoenix Dactylifera L.*) seeds and seed oil”, *Journal of the American Oil chemists’ Society*, V. 69, (1992), 595-597.
- [40] Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., et Lyoussi, B., “Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in southeastern Morocco (Errachidia province)”, *Journal of Ethnopharmacology*, V. 110, (2007), 105–117.
- [41] Khare, C. P., “Indian medicinal plants: An illustrated dictionary” , First Indian Reprint, Springer Reference, New Delhi, 717-718.
- [42] Saddiqi, S. A., Rahman, S., Khan, M. M., Rafiq, S., Khurram, M. S., Seerangurayar, T. et Jamil, F., “Potential of dates (*Phoenix dactylifera L.*) as natural antioxidant source and functional food for healthy diet”, *Science of the total environment*, V. 748, (2020), 141-234.
- [43] Ghnimi, S., Umer, S., Azhanul, K., et Kamal-Eldin, A., “Date fruit (*Phoenix dactylifera L.*): An underutilized food seeking industrial valorization”, *Nutrition and Food Science Journal*, V. 6, (2017), 1–10.
- [44] Sirisena, S., Ng, K. et Ajlouni, S., “The emerging Australian date palm industry: date fruit nutritional and bioactive compounds and valuable processing by-products”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, V. 14, n°6, (2015), 813–823.

- [45] Shi, J., Ho, C. et Shahidi, F., "Asian Functional Foods", CRC Press, New York, (2005), pp. 508–516.
- [46] Ghnimi, S. et Kamal-Eldin, A., "Fruit nutraceuticals seeking clinical evidence and technological exploitations", *Journal of Bioequivalence Bioavail*, V. 7, n° 6, (2015), 525–5526.
- [47] Kamal-Eldin, A., Hashim, I. B. et Mohamed, I. O., "Processing and utilization of palm date fruits for edible applications", *Recent Patent on Food, Nutrition and Agriculture*, V. 4, (2012), 78–86.
- [48] Favier, A., Guillard, J. C., Potier de Courcy, G., Galan, P. et Hercberg, S., « Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?, Basic data", *Pathologie Biologique*, Paris, V. 51, n°2, (2003), 101-10.
- [49] Tremellen, K., "Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective", *Human Reproduction Update*, (2008), 243-258.
- [50] Atamer, A., Bilici, A., Yenice, N., Selek, S., Ilhan, N. et Atamer, Y., "The importance of paraoxonase activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis", *Journal of Internal Research*, (2008), 771-776.
- [51] Zou, Y., Qian, Z. I., Li, Y., Kim, M. M., Lee, S.H. et Kim, S. K., "Antioxidant Effects of phlorotannins Isolated from *Ishige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 56, (2008), 7001-7009.
- [52] Willcox, L. K., Ash, S. L., et Catignani, G. L., "Antioxidants and prevention of chronic disease", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V. 44, (2004), 275-295.
- [53] Dalle-Donne, L., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., et Milzani, A., « Biomarkers of oxidative damage in human disease", *Clinical Chemistry*, V. 52, (2006), 601-623.

- [54] Carney, M. et Camey, A. M., "Role of protein oxidation in aging and in age-associated neurodegenerative diseases", *Life Science*, V. 55, (1994), 2097-2103.
- [55] Wang, Y., "Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species", *Chemistry Research in Toxicology*, V. 21, (2008), 276-281.
- [56] Chevion, M., Berenshtein, E. et Stadtman, E. R., « Human studies related to protein oxidation: prote in carbonyl content as a marker of damage", *Free Radical Reseach*, V. 33 Suppl, (2000), 99-108.
- [57] Romieu, I., Castro-Giner, F., Kunzli, N. et Sunyer, J., « Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review", *European Respiratory Society*, V. 31, (2008), 179-197.
- [58] Kadiiska, M. B., Gladen, B. C., Baird, D. D. et Germolec, D., "Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning?", *Free Radical Biology and Medecine*, V. 38, (2005), 698-710.
- [59] Rietzschel, E. R., Langlois, M., De Buyzere, M. L., Segers, P., De Bacquer, D., Bekaert, S., Cooman, L., Van Oostveldt, P., Verdonck, P., De Backer, G. G. et Gillebert, T. C., « Oxidized low-density lipoprotein cholesterol is associated with decreases in cardiac function independent of vascular alterations", *Hypertension*, V.52, (2008), 535-541.
- [60] Termini, J. "Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations", *Mutation Research*. V. 450, (2000), 107-124.
- [61] Spiteller, G., "Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products", *Free Radical Biology & Medecine*, V. 41, (2006), 362-387.
- [62] Lim, P., Wuenschell, G. E., Holland, V, Lee, D. H., Pfeifer., G. P, Rodriguez, H., et Termini, J., "Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis", *Biochemistry*, V. 43, (2004), 15339-15348.

- [63] Cerutti, P. A., "Prooxidant states and tumor promotion", *Science*, V. 227, (1985), 375-381.
- [64] Vaca, C. E., Wilhelm, J., et Harms-Ringdahl, M., "Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review", *Mutation Research*, V. 195, (1988), 137-149.
- [65] Esterbauer, H., Eckl, P. et Ortner, A., "Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors", *Mutation Research*, V. 238, (1990), 223-233.
- [66] Esterbauer, H., Schaur, R. J. et Zollner, H., "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes", *Free Radical Biology and Medicine*, V. 11, (1991), 81-128.
- [67] Muzykantov, V. R., "Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium", *Journal of Control Release*, V. 71, n°1, (2001), 1-21.
- [68] Wassmann, S., Wassmann, K. et Nickenig, G., "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells", *Hypertension*, V. 44, n°4, (2004), 381-6.
- [69] Lu, S.C., "Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies", *Faseb Journal*, V. 13, (1999), 1169-83.
- [70] Fernandez-Checa, J. C. et Kaplowitz, N., "Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity", *Toxicology and Applied Pharmacology*, V. 204, (2005), 263-73.
- [71] Gallogly, M. M. et Miessler, J. J., "Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress", *Current Opinion Pharmacology*, V.7, (2007), 381-391.

- [72] Vincent, H. K. et Taylor, A.G., “Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans”, *International Journal of Obesity*, London, V. 30, (2006), 400-418.
- [73] Traber, M.G., Frei, B. et Beckman, L.S., “Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention?”, *Current Opinion in Lipidology*, V. 119, (2008), 30-38.
- [74] Stahl, W. et Sies, H., “Antioxidant activity of carotenoids”, *Molecular Aspects of Medicine*, V. 24, (2003), 345-51.
- [75] Rhodes, M. J. C., “Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems”, *Plant Molecular Biology*, V. 24, (1994), 1-20.
- [76] Graglia, E., Julkunen-Tiito, R. et Shaver, G.R., “Environmental control and intersite variations of phenolics in *Betula nana* in tundra ecosystems”, *New Phytologist*, V. 151, (2001), 227-236.
- [77] Bahourun, T., « Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle », *Food Agriculture journal*, n° special, (1997), 83-95.
- [78] Martin, S. et Andriantsitohaina, R., « Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l’endothélium », *Annales de cardiologie et d’angéologie*, V. 51, (2002), 304-315.
- [79] Bravo, L., « Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance », *Nutrition Review*, V. 56, (1998), 317–333.
- [80] Thilakarathna, S. H. et Rupasinghe, H. P., “Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement”, *Nutrients*, V. 5, n°9, (2013), 3367-87.
- [81] Stevanovic, T., « Automne : Chimie du bois », CHM-22170, Université Laval, Québec, Canada, (2005), 6.6-6.20

- [82] Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., « Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique », 1ere Edition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, (2005).
- [83] Dewick, P. M., « The biosynthesis of shikimate metabolites », *Natural Product Reports*, 1V. 2, n° 6, (1995), 579-607.
- [84] Richter, G., « Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie », Edition Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, (1993), 322-323.
- [85] Cardona, F., Andres-Lacueva, C., Tulipani, S, Tinahones, F. J. et Queipo-Ortuno, M. I., « Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health », *The Journal of nutritional biochemistry*, V. 24, n°8, (2013), 1415-22.
- [86] Daoust, L., Choi, B., Vilela, V., Pilon, G., Lévy, E., Roy, D., Desjardins, Y. et Marette, A., « Transfert du microbiote intestinal par une technique d'adoption croisée pour démontrer les effets métaboliques de la consommation d'un extrait de canneberge riche en polyphénols dans un modèle de souris soumis à une diète obésogène », *Mémoire en Maître ès sciences (M. Sc.)*, Université Laval. Québec, Canada. (2019), 110p.
- [87] Scalbert, A., "Bioavailability and health effects of polyphenols", *International Scientific Council*, Clermont-Ferrand, France, (2001), 8 p.
- [88] Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. et Rémésy, C., "Bioavailability and bio-efficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." *American Journal of Clinical nutrition*, V. 81, (2005), 230S-242S.
- [89] Felgines, C., Texier, O., Garcin, P., Besson, C., Lamaison, J. L. et Scalbert, A., "Tissue distribution of anthocyanins in rats fed a blackberry anthocyanin-enriched diet." *Molecular Nutrition & Food Research*, V. 53, (2009), 1098-1103.
- [90] Ly, C., Yockell-Lelievre, J., Ferraro, Z. M., Arnason, J. T., Ferrier, J. et Gruslin, A., "The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development", *Human reproduction update*. V. 21, n°2, (2015), 228-48.

- [91] Galvano, F., La Fauci, L., Vitaglione, P., Fogalio, V., Vanella, L. et Felgines, C., "Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides." *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, V. 43, (2007), 382-393.
- [92] Häkkinen, S., "Flavonols and phenolic acids in berries and berry products", Thèse doctorale, KUOPIO, (2000), 93 p.
- [93] Bouton, F., « Mise en évidence du potentiel allélopatique de la graminée *Festuca paniculata* dans les prairies subalpines », Rapport de stage de Master 1, Université JOSEPH FOURIER –UFR de biologie, Grenoble, (2005), 18p.
- [94] Naczki, M. et Shahidi, F., "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, V. 31, (2011), 227-249.
- [95] Rolland, R., « Antioxydants naturels végétaux », *Oléagineux Corps Gras et Lipides*, V.11, n°6, (2004), 419-424.
- [96] Tuohy, K. M., Conterno, L., Gasperotti, M. et Viola, R., "Up-regulating the Human Intestinal Microbiome Using Whole Plant Foods, Polyphenols, and/or Fiber", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 60, (2012), 8776–8782.
- [97] Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W. et Lin, Y., "Tannins and human health: a review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V. 38, n°6, (1998), 421-464.
- [98] Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G. et Morozzi, G., « Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil », *Journal of Chromatography A*, (2004), 113-127.

- [99] Biglari, F., Abbas, F., AlKarkhi, M. et Mat Easa, A., « Antioxydant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera L.*) Fruits from Iran”, *Food Chemistry*, V. 107, (2008), 1636–1641.
- [100] Singleton, V. L. et Rossi, J. A., « Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic–Phosphotungstic Acid Reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, V. 16, (1965), 144–158.
- [101] Bahourun, T., « Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle », *Food Agriculture*, (1997), 83-95.
- [102] Talcott, S. T. et Howard, L. R., “Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree”, *Journal of Agriculture and Food chemistry*, V. 47, (1999), 2109-2115.
- [103] Benzie, I. F. F. et Strain, J. J., « The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: the FRAP Assay”, *Analytical Biochemistry*, V. 239, (1996), 70–76.
- [104] Ou, B., Hampsch-Woodill, M. et Prior, R L., “Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.49, n° 10, (2001), 4619-4626.
- [105] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et Berset, C. “Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity”, *LWT-Food and Science Technology*, V. 28, (1995), 25–30.
- [106] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. et Polissiou, M., “Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae)”, *Food Chemistry*, V. 90, (2005), 333-340.

- [107]. Truchado, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A., “Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Reveals the Widespread Occurrence of Flavonoid Glycosides in Honey, and Their Potential as Floral Origin Markers” *Journal of Chromatography A*, V. 1216, (2009), 7241–7248.
- [108] Turoli, D., Testolin, G., Zanini, R. et Bell, R., Determination of Oxidative Status in Breast and Formula Milk”, *Acta Paediatrica*, V. 93, n° 12, (2004), 1569–1574.
- [109] Eid, N. M. S., Al-Awasi, B., Vausour, D., Oruna-Concha, M. J. et Spencer, J. P. E., “Effect of Cultivar Type and Ripening on the Polyphenol Content of Date Palm Fruit”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 61, (2013), 2453–2460.
- [110] Raiola, A., Meca, G., Manes, J. et Ritieni, A. « Bioaccessibility of Deoxynivalenol and Its Natural Co-Occurrence with Ochratoxin A and Aflatoxin B1 in Italian Commercial Pasta”, *Food Chemistry and Toxicology*, V. 50, n° 2, (2012), 280–287.
- [111] Tenore, G. C., Calabrese, G., Stiuso, P., Ritieni, A., Giannetti, D. et Novellino, E., “Effects of Annurca apple polyphenols on lipid metabolism in HepG2 cell lines: A source of nutraceuticals potentially indicated for the metabolic syndrome. *Food Research*, V. 63, (2014), 252-257.
- [112] Brandt, A. P., Gozzi, J. G., Pires, A. D. A., Martinez, G. R., Vinícius, A. S. C., Echevarria, A., Di Pietro, A., Cadena, S. M. S. C., “Impairment of oxidative phosphorylation increases the toxicity of SYD-1 on hepatocarcinoma cells (HepG2)”, *Chemico-Biological Interactions*, V. 256, (2016), 154-160.
- [113] Halliwell, B. et Gutteridge, J. M. C., “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview”, *Methods in Enzymology*, Academic Press, V.186, (1990), 1-85,
- [114] Gomez-Monterrey, I., Campiglia, P., Bertamino, A., Aquino, C., Sala, M., Grieco, P., Dicitore, A., Vanacore, D., Porta, A. et Maresca, B., « A Novel Quinone-Based Derivative (Dtnq-pro) Induces Apoptotic Death via Modulation of Heat Shock Protein Expression in Caco-2 Cells”. *British Journal of Pharmacology*, 160, (2010), 931–940.

- [115] Tenore, G. C., Campiglia, P., Stiuso, P., Ritieni, A. et Novellino, E., « Nutraceutical Potential of Polyphenolic Fractions from Annurca Apple (M. Pumila Miller Cv Annurca) », *Food Chemistry*, V. 140, (2013), 614–622.
- [116] Al-Yahya, M., Raish, M., Al-Said, M. S., Ajaz, A., Mothana, R. A., Al-Sohaibani, M., Al-Dosari, M. S., Parvez, M. K. et Rafatullah, S., « ‘Ajwa’ Dates (*Phoenix Dactylifera* L.) Extract Ameliorates Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy through down Regulation of Oxidative, Inflammatory and Apoptotic Molecules in Rodent Model », *Phytomedicine*. V. 23, (2016), 1240–1248.
- [117] Ottu, O. J., Atawodi, S. E. et Onyike, E. « Antioxidant, hepatoprotective and hypolipidemic effects of methanolic root extract of *Cassia singueana* in rats following acute and chronic carbon tetrachloride intoxication », *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, V. 6, n° 8, (2013), 609-615.
- [118] Satheesh Kumar, R., Challa, S. R. Lal Babu, G., Rekha, K., Renuka Devi, V. Srinu, S., Venkatesh, R., C. et Narendra Babu, S., “Influence of Duloxetine on the in-vivo pharmacokinetics of Metoprolol in rat model”, *Journal of pharmacy research*, V. 7, n° 4, (2013), 362-366.
- [119] Roeschlau, P., Bernt, E. et Gruber, W., « Enzymatic determination of total cholesterol in serum », *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*. V. 12, n° 5, (1974), 226p.
- [120] Fossati, P., Burghen, G. A., Li, H., Hudson, M. M. et Kun, L. E., « Serum triglycerides determined calorimetrically with an enzyme that produce hydrogen peroxide », *Clinical Chemistry*, V. 8, (1982), 2078–2082.
- [121] McGowan, M. W., Artiss, J. D., Strandbergh, D. R. et Zak, B.A., “Peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides », *Clinical Chemistry*, V. 29, (1983), 538–42.

- [122] Dawson, V. H. W., « Récolte et conditionnement des dattes », Food and Agriculture Organisation, Rome, (1963), 18p.
- [123] Akidi, H. K. H., « Technique biotechnologique et les dattes », Bagdad, (1978).
- [124] Al-Beker, P. H. et Jabbar, A., « The date palm : A review of its and present status ; and the recent advances in its culture, industry and trade ». Al-Ani Press, Bagdad, (1972).
- [125] Institut international des ressources phytogénétiques (IPGRI); Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRA); Institut National de la Recherche Agronomique du Maroc (INRAM); Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT); Fonds pour l'Environnement Mondial (FEM); Programme des Nations Unies pour le Développement (PNUD), « Descripteurs du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), Institut international des ressources phytogénétiques, (2005), 71 p. ISBN: 978-92-9043-676-8
- [126] Al-hooti, S., Juan, S., and Quabazard, H., "Studies on the physico-chemical characteristics of date fruits of five UAE cultivars at different stages of maturity". Arab Gulf journal of scientific research, V. 13, (1995), 553-569.
- [127] Ahmed, I. A., Ahmed, A. K. and Robinson, R. K., "Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening", Food Chemistry, V. 54,(1995), 305-309.
- [128] Awad, M.A., "Growth and compositional changes during development and ripening of early summer "Lonet-Mesaed" date palm fruits", Journal of Food Agriculture and Environment, V. 9, n° 1, (2011), 40–44.
- [129] Toutain, G. et Saaidi, M., « Production du palmier dattier, I- Fructification du Palmier dattier dans son jeune âge », Al Awamia, V. 48, (1973), 73-78.

- [130] Booij, A., Piombo, G., Risterucci, J. M., Coupe, M., Thomas, D., Ferry, M., “Étude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*L.) », *Fruits*, V. 47, n° 6, (1992), 667–678.
- [131] Hulme, A. C., “The biochemistry of fruits and their products”, London and New York : Hulme (A. C.), eds, Academic Press, V. 1, (1970).
- [132] Reuveni, O., “In : Handbook of fruit set and development”, Floride (USA: Monselise (S .P.), eds, CRC Press, Inc. Boca-Raton, (1986), 119-144 .
- [133] Açourene S., Tama M. et Taleb B. (1997). Synthèse bibliographique sur la valorisation de dattes. I.N.R.A. Station Sidi-Mehdi, Touggourt. 59-66.
- [134] Kaid, K., « Caractérisation biochimique de rob préparé à partir de deux variétés Mech Degla et Ghars », Mémoire d’ingénieur, Université de Batna, (2007), 39 p.
- [135] Kenfhar, B., « Contribution à l’étude de quelques caractéristiques morphologiques de quatre cultivars de palmier dattier (*Phoenix Dactylifera L.*) dans la région de Droh (Wilaya de Biskra), Mémoire d’ingénieur, Université de Batna, (2004), 87 p.
- [136] Bouhlali, E. D. T., El-Hilaly, J., Ennassir, J., Benlyas, M., Alem, C., Amarouch, M. Y. et Filali-Zegzouti, Y., “Anti-inflammatory Properties and Phenolic Profile of Six Moroccan Date Fruit (*Phoenix Dactylifera L.*) Varieties”, *Journal of King Saud University Science*, V. 30, n°4, (2018), 519–526.
- [137] Sawaya, W. N., Khalil, J. K., Khatchadourian, H. A., Safi, W. M. et Mashadi, A. S. “Sugars, tannins and some vitamins contents of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the khalal (mature color) and tamer (ripe) stages”, *Proceeding of the First International Symposium on the Date Palm*, King Faisal University, Al-Hassa, (1983), 468-478.

- [138] Bousdira, K., « Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : caractérisation morphologique et biochimique des dattes de cultivars les plus connus de la région du Mزاب, classification et évaluation de la qualité », Thèse de Magistère, Département de Technologie alimentaire, Université de Boumerdès, (2007), 149 p.
- [139] Awad, M. A., Adel, D., Al-Qurashia., Saleh, A. Mohamed, C., “ Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening”. *Scientia Horticulturae*, V. 129, (2011), 688–693.
- [140] Shahdadi, F., Mirzaei, H. O., Daraei Garmakhany, A., “Study of phenolics compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *Journal of Food Science Technologie*, V. 52, n° 3, (2013), 1814-1819.
- [141] Travers, I., « Influence des conditions pédoclimatiques du terroir sur le comportement du pommier et la composition des pommes à cidres dans le pays d’Auge », Thèse de doctorat de Cean, (2004), 15-31.
- [142] Khali, M., « Effets de traitements simples et combinés sur la biologie et la biochimie de la datte en cours de conservation », Thèse de doctorat. Institut National Agronomique El-Harach, (2008), 174p.
- [143] Gooding, P. S., Bird, C., et Robinson, S. P. “Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphénols oxidase”, *Planta*, V. 213, (2001), 748-757.
- [144] Ayaz, F. A., Demir, O., Torun, H., Kolcuoglu, Y. et Colak, A. « Characterization of polyphenoloxidase (PPO) and total phenolic contents in medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit during ripening and over ripening”, *Food Chemistry*, V. 106, (2008), 291-298.

- [145] Harris, R. S. et Karmas, E., “Nutritional evaluation of food processing “, 3rd Edition. The AVI Publishing company Inc., New York, (1988), 612 p.
- [146] Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Billot, J., « Fruit phenolics », Boca Raton, CRC Press, (1990), 378 p.
- [147] Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J. et Lee, C. Y. , “Cacao has more phenolics phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine”, Food chemistry, V. 51, (2003), 7292-7295.
- [148] Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. et Lattanzio, V., “A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts”, Microchemical Journal, V. 91, n° 1, (2009), 107-110.
- [149] Cicco, N. et Lattanzio, V., “The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions”, American Journal of Analytical Chemistry, V. 2, n° 7 (2011), 840-848.
- [150] Boizot, N. et Charpentier, J. P., « Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, n° spécial, (2006), 79-83.
- [151] Guizani, N., Rahman, M. S. et Essa, M., “In-vitro antioxidant activities of Three Date Varieties (*Phoenix dactylifera* L.) from Sultanate of Oman at Two Edible Maturity Stages”, Proceedings of the International Conference on Agricultural engineering. CIGR-Ageng. Valencia, Spain- July 8-12, (2012), 5 p.

- [152] Ben meddour, Z. et Mehinagic, E., Le Meurlay, D., Louaileche, H., « Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera L.*) cultivars: A comparative study”, *Journal of Functional Foods*, V. 5, (2013), 346–354.
- [153] Boudries, H., Panagiotis, K. et Dàmaso, H. M., “Carotenoid composition of Algerian date varieties (*Phoenix dactylifera L.*) at different maturation stages”, *Food Chemistry*, V. 101, (2007), 1372- 1377.
- [154] Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., et Shahidi, F. “Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera L.*) varieties grown in Oman”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 53, n° 19, (2005), 7592–7599.
- [155] Johnson, E., “A possible role for lutein and zeaxanthin in cognitive function in the elderly”, *American ournal of Clinical Nutrition*, V. 96, n°5, (2012), 1161S–1165S.
- [156] Bian, Q., Gao, S., Zhou, J., Qin, J., Taylor, A., Johnson, E., Tang, G., Sparrow, J., Gierhart, D. et Shang, F., “Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells”, *Free Radical Biology and Medecine*, V. 53, n°6, (2012), 1298–1307.
- [157] Cao, G. et Prior, R. L., "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum.", *Clinical Chemistry*, V. 44, n° 6, (1998), 1309-1315.
- [158] Ben Abbes, F., “Étude de quelques propriétés chimiques et biologiques d’extraits de dattes « *Phoenix dactylifera L.* », Thèse de magistère, Université de Ferhat Abbas, Sétif, (2011), 79 p.
- [159] Haddadi, H., « Détermination de l’activité antioxydante de quelques fruits », Mémoire de magister, Université de Béjaïa, (2005), 76 p.

- [160] Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L., Araújo, M. E., « The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal”, *Journal of Ethnopharmacology*; V. 108, (2006), 31-37.
- [161] Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F., “Importance of insoluble bound phenolics to antioxidant properties of wheat”, *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, V. 54, (2006), 1256–1264.
- [162] Al-Turki, S., Shahba, M. A. et Stushnoff, C., “Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) fruits as affected by cultivar and location”, *Journal of Food Agriculture and Environment*, V. 8, (2010), 253–260.
- [163] Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. et Vivanco, J. M., « Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions”, *Food Chemistry*. V. 83, (2003), 547–550.
- [164] Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J. et Vavreinova, S., “Buckwheats: the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, V. 35, (2002), 207–211.
- [165] Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Ciz, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. et Trakhtenberg, S., “Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 51, 5(2003), 780–5785.
- [166] Yu, L., Perret J., Davy, B., Wilson, J., Melby, C. L., “Antioxidant properties of cereal products”, *Journal Food Science*, V. 67, (2002), 2600–2603.
- [167] Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M., “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 47, (1999), 3954–3962.

- [168] Yrjönen, T. “Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products”, Faculty of pharmacy, University of Helsinki, Finland, (2004).
- [169] Borochoy-Neori, H., Judeinstein, S., Greenberg, A., Volkova, N., Rosenblat, M. et Aviram, M. “Date (*Phoenix dactylifera* L.) Fruit Soluble Phenolics Composition and Anti-atherogenic Properties in Nine Israeli Varieties”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 61, n°18, (2013), 4278–4286.
- [170] Ge, Y. Z. et Jin, H., “New methods for extraction of tea polyphenols. *Chinese Herbal Medicine*, V. 25, (1994), 124–125.
- [171] Proteggente, A. R., Pannala, S. A., Paganga, G., Buren, L. V., Wagner, E., Wiseman, S., De Put, F. V., Dacombe, C., et Rice- Evans, C. A., « The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition”, *Free Radical Research*, V. 36, (2002), 217–233.
- [172] Gilberto, M. M., Blancas-Benitez, F. J., Velderrain-Rodriguez, G. R., Efigenia, M. G., Gonzalez-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E. S. et yago-Ayerdia, S. G., « Bioaccessibility of Polyphenols Released and Associated to Dietary Fiber in Calyces and Decoction Residues of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.), *Journal of Functional Foods*, V. (2015), 18, 171–181.
- [173] Etcheverry, P., Grusak, M. A., Fleige, L. E., “Application of *in Vitro* Bioaccessibility and Bioavailability Methods for Calcium, Carotenoids, Folate, Iron, Magnesium, Polyphenols, Zinc, and Vitamins B6, B12, D, and E”, *Frontiers in Physiology*, V. 3, (2012), 317.
- [174] Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. et Bitsch, R., “Assessment of Antioxidant Activity by Using Different *in Vitro* Methods”, *Free Radical Research*, V. 36, (2002), 177–187.

- [175] Hulbert, A. J., "On the Importance of Fatty Acid Composition of Membranes for Aging", *Journal of Theoretical Biology*, V. 234, (2005), 277–288.
- [176] Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A. et Barja, G., "Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals", *Mechanisms of Ageing and Development*, V. 112, n°3, (2000), 169-183.
- [177] Marnett, L. J., "Lipid Peroxidation-DNA Damage by Malondialdehyde. Mutation Research, V. 424, (1999), 83–95.
- [178] Poubelle, P., Chaintreuil, J., Bensadoun, J., Blotman, F., Simon, L. et Crastes De Paulet, A., « Plasma lipoperoxides and aging: Critical assessment of the thiobarbituric acid method for the measurement of lipoperoxides and malondialdehyde, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, V. 36, (1982), 164-166.
- [179] Xu, X., Gao, X., Potter, B. J., Cao, J. M. et Zhang, C., « Anti-LOX-1 Rescues Endothelial Function in Coronary Arterioles in Atherosclerotic ApoE Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, V. 27, (2007), 871–877.
- [180] Alderton, W. K., Cooper, C. E. et Knowles, R. G., "Nitric Oxide Synthases: structure, Function and Inhibition", *Biochemistry Journal*, V. 357, (2001), 593–615.
- [181] Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K. et Nozawa, A., « Tea Catechins with a Galloyl Moiety Suppress Postprandial Hypertriacylglycerolemia by Delaying Lymphatic Transport of Dietary Fat in Rats", *Journal of Nutrition*, V. 135, (2005), 155–159.
- [182] Sukla, R., Gupta, S., Gambhir, J. K., Prabhu, K. M., et Murthy, P. S., « Antioxidant Effect of Aqueous Extract of the Bark of *Ficus Bengalensis* in Hypercholesterolaemic Rabbits", *Journal of Ethnopharmacology*, (2004). V. 92, (2004), 47–51.
- [183] Kris-Etherton, P., Krummel, D., Russell, M. E., Dreon, D., Mackey, S., Borchers, J. et

Wood, P. D., “The Effect of Diet on Plasma Lipids, Lipoproteins, and Coronary Heart Disease”, *Journal American Dietetic Association*, V. 88, (1988), 1373–1400.

[184] Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W. et Sacks, F. M., “Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis”, *American Journal of Clinical Nutrition*, V. 69, (1999), 30–42.

[185] Lee, J. S., Lee, M. K., Ha, T. Y., Bok, S. H., Park, H. M., Jeong, K. S., Woo, M. N., Do, G. M., Yeo, J. Y. et Choi, M. S. “Supplementation of Whole Persimmon Leaf Improves Lipid Profiles and Suppresses Body Weight Gain in Rats Fed High-Fat Diet”, *Food Chemistry and Toxicology*, V. 44, n° 11, (2006), 1875–1883.