

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ KASDI MERBAH OUARGLA



FACULTÉ DES SCIENCES APPLIQUÉE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES PROCÉDÉS

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat LMD

Filière : génie des procédés

Spécialité : énergétique et procédés

THEME

*Optimisation de l'extraction des
polyphénols des (*Phoenix dactylifera*) L
par différents solvants et méthodes*

Présenté par:

DIA Ouahida

Soutenu publiquement Le : 14 Avril 2019

Devant le jury composé de :

Mr. SEGNI Ladjel

Mr. SEKHRI Lakhdar

Mr. LEGSEIR Belgacem

Mr. OUAHRANI Mohammed Ridha

Mr. LAOUINI Salah Eddine

Président

Examineur

Examineur

Rapporteur

Invité

Pr. Université d'Ouargla

Pr. Université d'Ouargla

Pr. Université d'Annaba

Pr. Université d'El'Oued

MCA. Université d'El'Oued

REMERCIEMENTS



Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier **Dieu** le tout puissant et miséricordieux pour nous avoir donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. Louanges et remerciements à **ALLAH** qui nous a permis aujourd'hui de nous rassembler pour soutenir ce modeste travail.

Ce travail à été réalisé au sein du Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes de l'université d'El-Oued, sous la direction de Monsieur **LANEZ Touhami**, Professeur à l'université d'El-Oued et directeur du laboratoire que nous tenons à le remercier profondément.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur **OUAHRANI Mohammed Ridha**, mon directeur de thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre les conseils et pour la confiance que vous m'avaient témoigné tout au long de cette étude.

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

Monsieur **SEGNI Ladjel**, Professeur à l'Université d'Ouargla, nous fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueuse gratitude.

Que Monsieur **SEKHRI Lakhdar**, Professeur à l'Université d'Ouargla soit remercié pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail et accepter de le juger.

J'exprime nos respectueux remerciements à Monsieur **LEGSEIR Belgacem**, Professeur à l'Université d'Annaba d'avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Je voudrai exprimer nos sincères reconnaissances à Mr **LAOUINI Salah Eddine**, pour son aide et ses conseils.

Je suis infiniment redevables aux mes collègues : demoiselles et des dames des ingénieurs de laboratoire pédagogique à l'Université d'el-oued, d'avoir acceptés sans hésiter de nous assurer les produits chimiques ; et un merci particulier à Monsieur **TLIBA Ali**, ingénieur de laboratoire **VTRS** pour son aide et ses conseils.

Je n'oublie pas mes parents et mon mari pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

RÉSUMÉ

ملخص

ABSTRACT



Résumé

Le genre Phoenix est un des groupes de palmier le plus largement cultivés dans le monde. Le but de cette étude est d'optimiser des paramètres d'extraction des composés phénoliques d'une variété de palmier dattier algérien (*Phoenix dactylifera* L). Afin d'évaluer l'activité antioxydante, les composés phénoliques totaux en utilisant divers systèmes in vitro et l'analyse des composés marqueurs par Chromatographie liquide a haute performance (HPLC) des extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L, nous avons utilisé trois solvants et trois méthodes d'extraction. Les résultats ont montré que les extraits acétoniques très riche avec des polyphénols, flavanoïdes, flavonols et tannin condensé, les même extraits ont été une activité antioxydante élevée contre DPPH et FRAP. Les résultats ont révélé que l'ultrason est la plus convenable pour l'extraction des composés phénoliques et montrant ainsi les fortes teneurs en polyphénols et des activités antioxydantes très élevées par rapport au soxhlet et à la macération. Les résultats suggèrent que les feuilles de *Phoenix dactylifera* L peuvent être considérées comme une bonne source d'antioxydant naturel, que nous pouvons utiliser ces extraits naturels comme additifs alimentaires en remplacement de composés synthétiques.

Mots clés: *Phoenix dactylifera* L, activité antioxydante, composés phénoliques totaux, solvants, méthodes.

ملخص

صنف Phoenix هو واحد من الأصناف الأكثر زراعا على نطاق واسع من أشجار النخيل في جميع أنحاء العالم. الهدف من هذه الدراسة هو تحسين متغيرات استخلاص المركبات الفينولية من صنف واحد من نخيل التمور الجزائرية (*Phoenix dactylifera L*). من أجل تقدير الفعالية المضادة للأكسدة، ومجموع المركبات الفينولية باستخدام مختلف النظم وبواسطة التحليل النوعي باستخدام كروماتوغرافيا عالية الأداء (HPLC) لمستخلصات أوراق نخيل التمور، استخدمنا ثلاثة مذيبيات و ثلاثة طرق للاستخلاص. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات الأسيون غنية بالمكونات الفيتوكيميائية كمادة البوليفينول، الفلافونيدات، الفلافانول و التانينات المترابطة، كما وضحت النتائج الفعالية الكبيرة المضادة للأكسدة لتثبيت الجذور الحرة لـ DPPH و FRAP. وكشفت نتائج تأثير طرق الاستخلاص إلى أن الاستخلاص في الأحواض ذات الموجات فوق صوتية هي الأنسب و الأكثر فعالية لاستخلاص المركبات الفينولية وبالتالي تظهر مستويات عالية من مادة البوليفينول المضادة للأكسدة وقدرة عالية جدا مقارنة بالاستخلاص بجهاز سوكسلي و طريقة النقع البسيط. أشارت النتائج إلى أن أوراق *Phoenix dactylifera L* يمكن اعتبارها مصدرا جيدا لمضادات الأكسدة الطبيعية، كما يمكن استخدام هذه المستخلصات الطبيعية كمضافات غذائية بدل المركبات الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية: أوراق النخيل، الفعالية المضادة للأكسدة، مجموع المركبات الفينولية، المذيبيات، طرق الاستخلاص.

Abstract

The genus *Phoenix* is one of the most widely cultivated groups of palms around the world. The aim of this study is to optimize extraction parameters of phenolic compounds from one variety of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L). In order to evaluate the antioxidant activity, total phenolic compounds by using various in vitro systems and analysis of marker compounds by High performance liquid chromatography (HPLC) of leaves extracts of *Phoenix dactylifera* L, we used three solvents and three methods of extraction. The results showed that the acetone extract as very rich with polyphenols, flavanoids, flavonols and condensed tannin, the same extract have high antioxidant activity against DPPH and FRAP. The results of the effect of methods revealed that the ultrasonic is most suitable for the extraction of phenolic compounds and thus showing high levels of polyphenols and very high antioxidant capacities relative to soxhlet and simple maceration extraction. The results suggest that the leaves of the *Phoenix dactylifera* L can be considered as a good source of natural antioxidant, that we can use these natural extracts as food additives in replacement of synthetic compounds.

Keywords: *Phoenix dactylifera* L, antioxidant activity, total phenolic compounds, solvents, methods.

Liste des Figures

1^{ère} partie : Revue bibliographique

Figure (I.1) : Photo de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	8
Figure (I.2) : Schéma d'un palmier dattier.....	9
Figure (I.3) : Schéma d'une palme.....	10
Figure (I.4) : Distribution géographique du palmier dattier dans le monde.....	13
Figure (II.1) : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.....	19
Figure (II.2) : Quelques exemples des structures chimiques des comarines.....	20
Figure (II.3) : Structure de base des flavanoides.....	21
Figure (II.4) : Structure de quelque flavanoides.....	22
Figure (II.5) : Structure chimique de l'ion phénoxyde.....	23

2^{ème} partie : Étude expérimentale

Figure (I.1) : Carte géographique montrant la zone de collecte.....	34
Figure (I.2) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des polyphénols totaux.....	41
Figure (I.3) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des flavanoides totaux.....	42
Figure (I.4) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des flavanols totaux.....	43
Figure (I.5) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des tanins condensés.....	44
Figure (I.6) : Courbes d'étalonnages pour la mesure de la capacité antioxydante.....	47
Figure (I.7) : Mécanisme d'action de DPPH.....	48
Figure (I.8) : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).....	49
Figure (I.9) : Courbes d'étalonnages pour le pouvoir réducteur de fer.....	50

3^{ème} partie : Résultats et discussions

Figure (I.1) : Rendement de l'extraction des composés phénoliques dans les différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	54
Figure (I.2) : La teneur des PPT dans les différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	56
Figure (I.3) : La teneur des FVT dans les différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	58
Figure (I.4) : La teneur des FLT dans les différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	60
Figure (I.5) : La teneur des TC dans les différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	62
Figure (II.1) : Profil du chromatogramme du mélange des étalons.....	65
Figure (II.2) : Profil du chromatogramme HPLC des extraits méthanoliques.....	67
Figure (II.3) : Profil du chromatogramme HPLC des extraits éthanoliques.....	69
Figure (II.4) : Profil du chromatogramme HPLC des extraits acétoniques.....	71
Figure (III.1) : La capacité antioxydante des différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	75
Figure (III.2) : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	77
Figure (III.3) : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC ₅₀ des différents extraits en µg/m.....	79
Figure (III.4) : La teneur du pouvoir réducteur des différents extraits des feuilles de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	82

Liste des Tableaux

1^{ère} partie : Revue bibliographique

Tableau (II.1) : Principaux radicaux libres et leur structure chimique.....	29
--	-----------

2^{ème} partie : Étude expérimentale

Tableau (I.1) : Données sur le site d'échantinnage de <i>phoenix dactylifera</i> L.....	34
--	-----------

3^{ème} partie : Résultats et discussions

Tableau (II.1) : Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons.....	66
Tableau (II.2) : Analyse quantitative et qualitative des extraits méthanoliques des feuilles de <i>phoenix dactylifera</i> L.....	68
Tableau (II.3) : Analyse quantitative et qualitative des extraits éthanoliques des feuilles de <i>phoenix dactylifera</i> L.....	70
Tableau (II.4) : Analyse quantitative et qualitative des extraits acétoniques des feuilles de <i>phoenix dactylifera</i> L.....	72
Tableau (III.5) : valeurs des IC ₅₀ et ARP du DPPH pour les différents extraits des feuilles de <i>phoenix dactylifera</i> L.....	78

Liste des Abréviations

- AG** : Acide gallique
- APR** : Puissance anti-radicalaire
- BHA** : Butylhydroxyanisole
- BHT** : Butylhydroxytoluene
- CAT** : Capacité anioxydante totale
- DPPH** : 1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
- EAG** : Équivalent acide gallique
- ECa** : Équivalent catéchine
- EFeSO₄** : Équivalent sulfate de fer
- EQ** : Équivalent quercétine
- ER** : Équivalent rutine
- FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FLT** : Flavanols totaux
- FRAP** : Ferrique Réductrice Antioxydante Puissance
- FVT** : Flavonoïdes totaux
- HPLC** : La chromatographie liquide à haute performance
- IC** : Concentration inhibitrice
- Mac A** : Extrait acétonique obtenus par macération
- Mac E** : Extrait éthanolique obtenus par macération
- Mac M** : Extrait méthanolique obtenus par macération
- MS** : Masse sèche
- OH** : Groupe hydroxyle
- PG** : Gallate propylene

PPT : Polyphénols totaux

Sox A : Extrait acétonique obtenus par soxhlet

Sox E : Extrait éthanolique obtenus par soxhlet

Sox M : Extrait méthanolique obtenus par soxhlet

TBHQ : Tetra-butylhydroquinone

TC : Tanins condensés

TPTZ : 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine

USoni A : Extrait acétonique obtenus par ultrasonique

USoni E : Extrait éthanolique obtenus par ultrasonique

USoni M : Extrait méthanolique obtenus par ultrasonique

UV : Ultra violet

TABLE

DES MATIÈRES



Table des Matières

Remerciements.....	II
Résumé / ملخص / Abstract.....	IV
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
Introduction générale.....	2

1^{ère} partie : Revue bibliographique

Chapitre I : Etude ethnobotanique du Phoenix Dactylifera L

I.1. Histoire et origine.....	7
I.2. Position systématique.....	8
I.3. Nom vernaculaire et synonyme.....	8
I.4. Morphologie du palmier dattier.....	9
I.4.1. Le système racinaire.....	9
I.4.2. Le système végétatif.....	10
I.4.2.1. Le tronc.....	10
I.4.2. 2. La couronne.....	10
I.4.2.3. Les palmes.....	10
I.4.2.4. Les fleurs.....	11
I.4.2.5. Le fruit.....	11
I.5. Exigences du palmier dattier.....	11
I.5.1. Exigences climatiques.....	11

• La température.....	11
• La lumière.....	12
• L'humidité de l'air.....	12
• Le vent.....	12
I.5.2. Les exigences édaphiques.....	12
I.5.3. Les exigences hydriques.....	12
I.6. Répartition géographique du palmier dattier.....	13
I.6.1. Dans le monde.....	13
I.6.2. En Algérie.....	14
I.7. Intérêt et importance des palmiers dattiers.....	14
I.7.1. Écologique.....	14
I.7.2. Économique.....	15
I.7.3. Thérapeutiques et cosmétiques.....	16

Chapitre II : polyphénols et activité antioxydante

II.1. Les composés phénoliques.....	18
II.1.1. Généralités.....	18
II.1.2. Classification.....	18
II.1.2.1. Les non flavonoïdes.....	19
➤ Les acides phénoliques.....	19
➤ Les stilbenes hydroxylés.....	19
➤ Les coumarines.....	20
➤ Les lignines et les lignanes.....	20
➤ Les xanthones.....	20
II.1.2.2. Les flavonoïdes.....	21

➤ Les flavones.....	21
➤ Les flavanes.....	21
➤ Les flavanones.....	21
➤ Les flavonols.....	21
II.1.2.3. Les tanins.....	22
➤ Tanins hydrolysables.....	22
➤ Les tannins condensés.....	23
II.1.3. Propriétés chimiques majeures des polyphénols.....	23
II.1.4. Intérêts des composés phénoliques	24
II.1.4.1. Rôle nutritionnel et thérapeutique.....	24
II.1.4.2. Rôle physiologique.....	25
II.1.4.3. Rôle technologique.....	26
II.1.5. Activité antioxydante des polyphénols.....	26
II.2. Activité antioxydante.....	27
II.2.1. Les radicaux libres.....	28
II.2.1.1. Définition	28
II.2.1.2. Principaux radicaux libres.....	28
II.2.2. Les antioxydants.....	29
II.2.2.1. Définition.....	29
II.2.2.2. Classification des antioxydants.....	29
II.2.2.2.1. Antioxydants synthétiques.....	30
II.2.2.2.2. Antioxydants naturels.....	30
II.2.2.2.3. Antioxydants synergistes.....	30
II.2.2.2.4. Antioxydants primaires.....	30

II.2.2.2.5. Antioxydants secondaires.....	30
II.2.2.3.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	31

2^{ème} partie : Étude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Echantillonnage.....	34
I.2. Méthodologie.....	35
I.2.1. Préparation des échantillons.....	35
I.2.2. Extraction des composés phénoliques.....	35
I.2.2.1.Extraction classique.....	36
I.2.2.2.Extraction par ultrason.....	36
I.2.2.3.Extraction par Soxhlet.....	36
I.3. Méthodes d'analyse physico-chimique.....	37
I.3.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible).....	37
I.3.1.1. Définition.....	37
I.3.1.2. Principe.....	37
I.3.1.3. Appareillage.....	37
I.3.2. Etude par chromatographie.....	38
I.3.2.1. Définition.....	38
I.3.2.2. Principe.....	38
I.3.2.3. La chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	38
I.3.2.4. Appareillage.....	39
I.4. Dosages des composés phénoliques.....	39
I.4.1. Réactifs chimiques.....	39
I.4.2. Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	40

I.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	41
I.4.4. Dosage des flavanols totaux (FLT).....	42
I.4.5. Dosage des tanins condensés (TC).....	43
I.5. Identification des composés phénoliques.....	44
I.5.1. Réactifs chimiques.....	45
I.5.2. Gradient d'élution.....	45
I.6. Evaluation de l'activité antioxydante.....	45
I.6.1. Réactifs chimiques.....	45
I.6.2. Activité antioxydante totale (TAC).....	46
I.6.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil).....	47
I.6.4. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	49

3^{ème} partie : Résultats et discussions

Chapitre I : Dosages des composés phénoliques

I.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques.....	53
I.2. Analyse colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible).....	55
I.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	55
I.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT).....	55
I.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT).....	58
I.2.1.3. Détermination de la teneur en flavanols totaux (FLT).....	60
I.2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés (TC).....	61
I.3. Conclusion.....	63

Chapitre II : Identification des composés phénoliques

II. 1. Analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC.....	65
II.1.1. Chromatogrammes des étalons.....	65
II.1.2. Analyse des extraits méthanoliques.....	66
II.1.3. Analyse des extraits éthanoliques.....	68
II.1.4. Analyse des extraits acétoniques.....	70
II.2. Conclusion.....	72

Chapitre III : Étude des activités anti-oxydantes


III.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	74
III.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT).....	74
III.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).....	77
III.1.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).....	82
III.2. Conclusion.....	83
Conclusion générale et perspectives.....	85
Références bibliographiques.....	88
Annexes.....	107

INTRODUCTION

GÉNÉRALE



Introduction générale

epuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes des maladies, ces plantes représentent un réservoir immense des composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle [1].

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [2].

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source des composés phénoliques (acide phénolique, flavonoïdes, flavonols, tannin condensé...), l'extraction bruts, naturels de ces composés et l'isolation à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prolifiques de nouveaux médicaments [3].

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils y jouent différents rôles, dont celui de moyen de défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante [4].

On retrouve des antioxydants dans toutes les plantes, ils sont qualifiés de métabolites secondaires. Ces composés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques, parmi lesquelles, nous citerons les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anti-cancérigènes, anti-thrombiques, anti-athérogéniques, anti-pyrétiques, analgésiques, etc [5, 6].

Pour cette raison la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle a constitué d'ailleurs un des axes prioritaires de dernière années, la recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers (composés phénoliques), ou encore un criblage systématique des espèces et ou toute combinaison des précédentes [7].

De part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifié. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et autour des points d'eau. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie Algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région. La richesse de la phoeniciculture Algérienne montre la nécessité à des projets ayant pour objet de sauvegarder, et de valoriser le patrimoine des palmiers dattiers. L'évaluation de la qualité physicochimique et microbiologique des dattes est l'un des principaux outils pour parer à cette menace.

[8].

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L., famille des Arecaceae) est une monocotylédone pérenne particulièrement adaptée aux zones arides et semi arides. Il représente pour les populations des oasis sahariennes une espèce indispensable car il constitue leur ressource de base, non seulement pour son fruit, la dattes mais aussi pour tous les sous produits dérivés des différentes parties du palmier dattier. Il est un important arbre fruitier, non seulement à cause de son importance économique, mais aussi par la haute valeur nutritionnelle de ses fruits, qui représentent une excellente source de glucides et antioxydants [9 - 12].

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche, dont le but principal est l'optimisation de la composition phytochimique et quantification des polyphénols des différents extraits des feuilles de *Phoenix dactylifera* L et leurs activités antioxydantes.

Après l'introduction, dans la première partie de ce manuscrit et dans le premier chapitre, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles à l'espèce étudiée *Phoenix dactylifera* L. La deuxième chapitre, a été consacré à une étude bibliographique sur les polyphénols, leur classification, leurs propriétés chimiques, ainsi qu'une mise au point sur les radicaux libres et les antioxydants dans la nature.

Dans la deuxième partie, on a cité les méthodes d'extraction réalisés dans notre travail, leurs rendements d'extraction, leurs teneurs en polyphénols totaux, ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes totales.

La troisième partie, a été composée des trois chapitres. Le premier a été consacré à l'étude de l'effet des méthodes et solvants d'extraction, ainsi d'estimer les teneurs en polyphénols totaux. Dans le deuxième chapitre, nous exposons l'analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC et la dernière a été étudiée l'évaluation des activités antioxydantes.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude ainsi que les perspectives ont été dégagées.

1^{ère} PARTIE

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE



I. ETUDE
ETHNOBOTANIQUE
DE Phoenix
Dactylifera L



Chapitre I : Etude ethnobotanique de *Phoenix Dactylifera L*

Le palmier dattier *phoenix dactylifera L* est un arbre fruitier vivace dioïque des régions arides, tropicale ou semi tropicales dont on consomme le fruit ou datte. Cet arbre semble il originaire du golfe persique, il est cultivé depuis la plus haute antiquité, il fut introduit sur les côtes orientales de l'Afrique au XVe siècle. Le palmier dattier est un arbre thermophile qui exige pour son développement et son production des hautes températures, mais il peut supporter les températures basses, alors il est considéré parmi les plantes qui se caractérisent par une adaptation dans les régions arides et semi arides chaude et peut supporter la sécheresse à long temps.

I.1. Histoire et origine

Les sources traitant l'origine du palmier dattier sont diverses. Le premier vestige du palmier fossile, pouvant être considéré comme l'ancêtre du palmier dattier a été découvert dans une roche qui remonte au triocène inférieur et fut décrit sous le nom de phoenicites palladianisme [13].

Le palmier dattier semble avoir été cultivé pour la première fois dans les zones arides et semi-arides chaudes de l'ancien monde situé entre l'Euphrate et le Nil vers 4500 ans avant Jésus. Christ [14]. Il connut ensuite une extension vers les autres régions dans le monde [15].

Phoenix est le nom donné par les Grecs à cet arbre qu'ils considéraient comme l'arbre des phéniciens. Quant à dactylifera, c'est un adjectif qui décrit les fruits du palmier dattier, en forme de doigts [16].

Sa culture a probablement commencé simultanément en Mésopotamie et dans la vallée du Nil en Egypte. À partir de son aire d'origine ; vers l'est, la culture de palmier dattier progressa de la basse Mésopotamie vers l'Iran puis vers la vallée de l'indus. Vers l'Ouest, à partir de l'Egypte, la culture du palmier dattier gagna la Libye d'où elle progressa dans différentes directions : vers le Maghreb, elle se développa en Tunisie dans le Djerid, en Algérie dans l'Oued Righ, le Tidikelt et le Saoura, au Maroc dans le Tafilalet et en fin en Mauritanie, dans l'Adar mauritanien. Vers le Sud, le palmier gagna le Tassili, le Hoggar, l'Adrar des Iforas (Mali), Djado-Kaouar (Niger), le Borkou-Tibesti (Tchad) [17].

I.2. Position systématique

Phoenix dactylifera L, provient du mot «phoenix» qui signifie dattier chez les phéniciens, et dactylifera dérive du terme grec «dactulos» signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit [17]. C'est une espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbre à palmes produisant des dattes [18 - 20].

Le palmier dattier est une Monocotylédone de la famille des Arécaceae (palmacées) [14]. Il appartient à la sous famille des Coryphoideae et reste le seul genre de la tribu des Phoeniceae [21]. Ce genre comporte au moins douze espèces, la plus connue est l'espèce *Phoenix dactylifera*, dont les fruits « dattes » font l'objet d'un commerce international important [22].

La classification du palmier dattier dans le règne végétal est rappelée ci-dessous [17]:

- **Groupe:** Spadiciflores
- **Ordre:** arecals
- **Famille:** arecaceae
- **Sous Famille:** Coryphoïdées
- **Tribu:** Phoenicées
- **Genre:** Phoenix
- **Espèce:** *Phoenix dactylifera* L.



Figure (I.1) : Photo de *Phoenix dactylifera* L.

I.3. Nom vernaculaire et synonyme

Palmier dattier (Français), Nakhla (Arabe), Tamar (Hébreu), Palmadatilera (Espagnol), Palma daterro (Italien), Manah (Persan), Phoenix (Grecque), Khajur, Pinda (Hinde) [23, 24].

I.4. Morphologie du palmier dattier

C'est un grand palmier de 20 à 30 m de haut, au tronc cylindrique (le stipe), portant une couronne de feuilles, les feuilles sont pennées divisées et longues de 4 à 7 m. L'espèce est dioïque et porte des inflorescences mâles ou femelles, les fleurs femelles aux trois carpelles sont indépendants, dont une seule se développe pour former la datte (le fruit) [25].

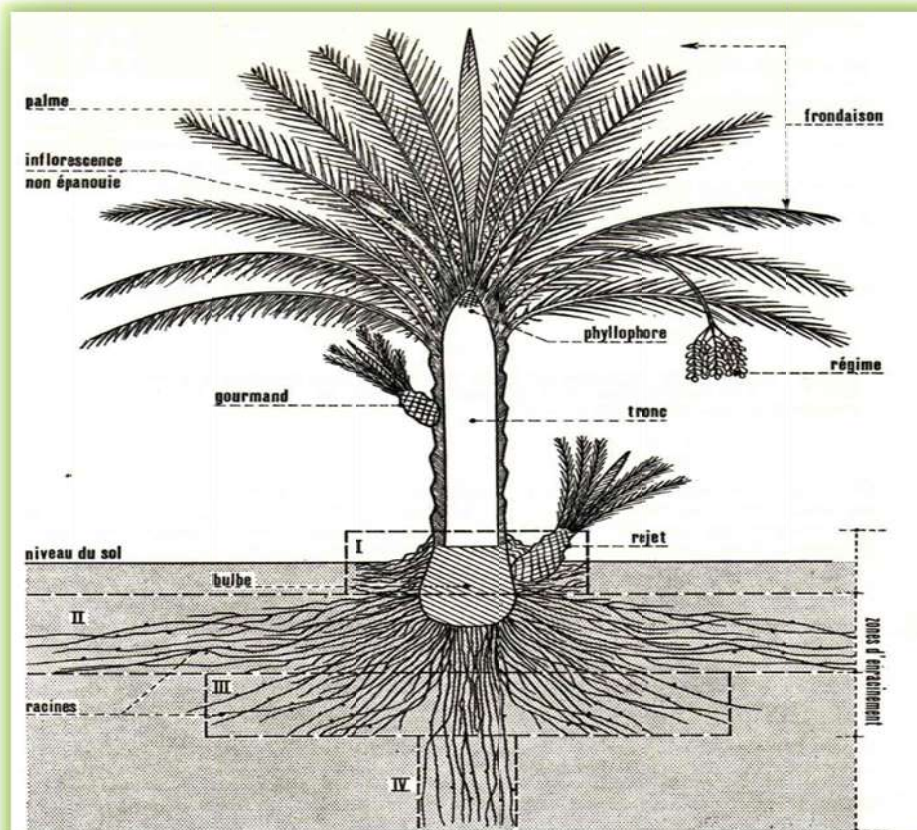


Figure (I.2) : Schéma d'un palmier dattier [21].

I.4.1. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier dattier est fasciculaire, les racines ne se ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicelles. Le bulbe ou plateau racinal est volumineux et émerge en partie au-dessus du niveau du sol. Le système présente quatre zones d'enracinement :

- ➔ **Zone 1:** Ce sont les racines respiratoires, localisées à moins de 0,25 m de profondeur qui peuvent émerger sur le sol.
- ➔ **Zone 2:** Ce sont les racines de nutrition, allant de 0,30 à 0,40 m de profondeur.
- ➔ **Zone 3:** Ce sont les racines d'absorption qui peuvent rejoindre le niveau phréatique à une profondeur varie d'un mètre à 1,8 m.
- ➔ **Zone 4:** Ce sont les racines d'absorption de profondeur, elles sont caractérisées par un géotropisme positif très accentué. La profondeur des racines peut atteindre 20 m, (Figure I.2) [21, 24].

I.4.2. Le système végétatif

I.4.2.1. Le tronc

C'est un stipe, généralement cylindrique, son élancement s'effectue dans sa partie coronaire par le bourgeon terminal ou phyllophore, (Figure I.2) [21].

I.4.2. 2. La couronne

La couronne ou frondaison est l'ensemble des palmes vertes qui forment la couronne du palmier dattier. On dénombre de 50 à 200 palmes chez un palmier dattier adulte. Les palmes vivent de trois à sept ans, selon les variétés et le mode de culture. Elles sont émises par le bourgeon terminal ou «phyllophore», pour cela, on distingue : la couronne basale, la couronne centrale et les palmes du cœur, (Figure I.2) [16].

I.4.2.3. Les palmes

La palme ou « Djérid » est une feuille pennée dont les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis. Les segments inférieurs sont transformés en épines, plus ou moins nombreuses, et plus ou moins longues, (Figure I.3) [14].

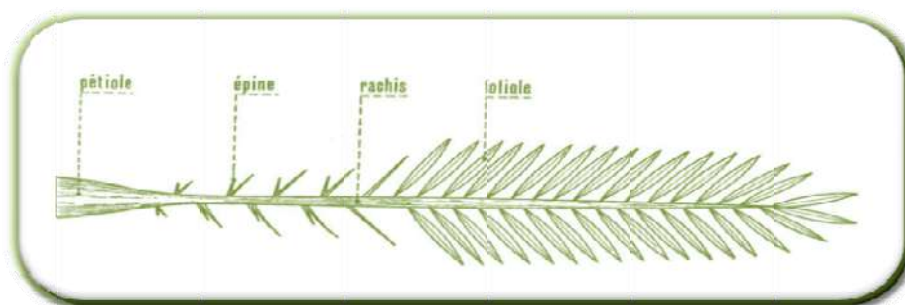


Figure (I.3) : Schéma d'une palme [14].

I.4.2.4. Les fleurs

Le dattier est une plante dioïque, c'est-à-dire qu'il existe des dattiers mâles (*Dokar*) et des dattiers femelles (*Nakhla*). Seuls les dattiers femelles donnent des fruits, donc elles sont à l'origine des multiples variétés des dattes. De façon générale deux des trois carpelles, uniovulés, avortent et les fruits sont monospermes ce qui peut s'expliquer par la grande densité des inflorescences. Les mâles forment une population hétéroclite, mal connue et ne sont pas tous utilisés pour la pollinisation. La protection des fleurs d'une même inflorescence est réalisée par une bractée membraneuse appelée spathe, les nombreuses fleurs ainsi protégées se simplifient : les pétales sont souvent réduits à des écailles et les fleurs unisexuées [26].

I.4.2.5. Le fruit

Le fruit de dattier, la datte est une baie contenant une seule graine, vulgairement appelée noyau. La datte est constituée d'un mésocarpe charnu, protégé par un fin épicarpe, le noyau est entouré d'un endocarpe parcheminé, il est de forme allongée, plus ou moins volumineux, lisse ou pourvu de protubérances latérales en arêtes ou ailettes, avec un sillon ventral ; l'embryon est dorsal, sa consistance est dure et cornée.

La couleur de la datte est variable selon les espèces : jaune plus ou moins clair, jaune ambré translucide, brun plus ou moins prononcé, rouge ou noire [14].

I.5. Exigences du palmier dattier

I.5.1. Exigences climatiques

- **La température**

Le palmier dattier est une espèce thermophile. Son activité végétative se manifeste à partir de 7 à 10°C selon les individus, les cultivars et les conditions climatiques. Elle atteint son maximum de développement vers 32°C et commence à décroître à partir de 38°C. La floraison se produit après une période fraîche ou froide [16, 17]. La somme des températures nécessaire à la fructification (indice thermique) est de 1000 à 1660°C, selon les régions phoenicoles (1854°C à Touggourt et 1620°C à Bechar) [14]. La période de la fructification

début à la nouaison et se termine à la maturation des dattes, elle varie de 120 à 200 jours selon les cultivars et les régions [17].

- **La lumière**

Le dattier est une espèce héliophile, et la disposition de ses folioles facilite la photosynthèse, la faible luminosité favorise le développement des organes végétatifs au dépend de la production de dattes, ainsi les fortes densités de plantation sont à déconseiller [14].

- **L'humidité de l'air**

Les faibles humidités de l'air stoppent l'opération de fécondation et provoquent le dessèchement des dattes au stade de maturité, au contraire les fortes humidités provoquent des pourritures des inflorescences et des dattes, respectivement au printemps et à l'automne. Donc le dattier est sensible à l'humidité de l'air [14]. Les meilleures dattes sont récoltées dans les régions où l'humidité de l'air est moyennement faible (40%) [25].

- **Le vent**

Les vents ont une action mécanique et un pouvoir desséchant. Ils augmentent la transpiration du palmier, entraîne la brûlure des jeunes pousses et le dessèchement des dattes. Les vents ont aussi une action sur la propagation de quelques prédateurs des palmiers dattiers comme *Ectomyelois cératoniae* [7].

I.5.2. Les exigences édaphiques

Le palmier dattier s'accommode aux sols de formation désertique et subdésertique très divers, qui constitue les terres cultivables de ces régions. Il croit plus rapidement en sol léger qu'en sol lourd, où il entre en production plus précocement. Il exige un sol neutre, profond, bien drainé et assez riche, ou susceptible d'être fertilisé [27].

I.5.3. Les exigences hydriques

Malgré que le palmier dattier est cultivé dans les régions les plus chaudes et plus sèches du globe, il est toujours localisé aux endroits où les ressources hydriques du sol sont suffisantes pour subvenir assez aux besoins des racines. Les besoins du palmier en eau

dépendent de la nature de sol, des variétés ainsi que du bioclimat. La période des grands besoins en eau du palmier se situe de la nouaison à la formation du noyau de fruit [28].

Les services agricoles et de l'hydraulique du sud algérien estiment les besoins en eau d'irrigation à 21.344 m³/ha/an, soit 173,45 m³/palmier/an [28], situe les besoins en eau du palmier en sol sableux entre 22 863,6 m³ à 25 859,5 m³/ha/an, soit 183,95 m³ à 210,24 m³/palmier/an [14].

I.6. Répartition géographique du palmier dattier

I.6.1. Dans le monde

Le palmier dattier est localisé dans les régions, là où les conditions climatiques le permettent, entre les latitudes 35° Nord et 15° Nord. Sa culture est localisée sur la rive méditerranéenne de l'Afrique jusqu'au proche-orient, depuis le sud de l'Iran jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du nord et en Asie.

Dès le 18^{ème} siècle, il a été introduit en Amérique, en particulier en Californie. Il ne vit que dans les déserts chauds et s'étale entre les parallèles Nord 9°18' (Cameroun) à 39°44' (Elche en Espagne).

Les plantations les plus récentes et à faible échelle se situent en Argentine, Brésil, Pérou, Australie et au Niger, Mali, et Sénégal [29].

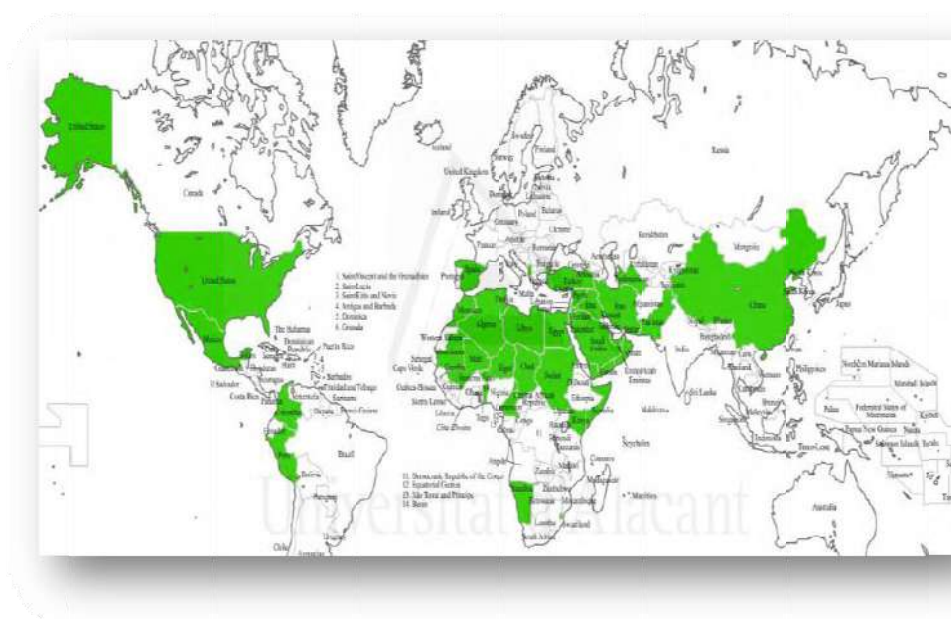


Figure (I.4) : Distribution géographique du palmier dattier dans le monde [30].

I.6.2. En Algérie

Le palmier dattier en Algérie est établi en plusieurs oasis réparties sur le sud de pays ou le climat est chaud et sec (saharien). Sa culture s'étend depuis la frontière Marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière Est Tuniso-Libyenne, et depuis l'Atlas saharien jusqu'à Reggane à l'Ouest, Tamanrasset au centre et Djanet à l'Est [31].

Les principales régions phoénicoles sont :

➔ **À l'Est:** les Zibans (Biskra), Oued Righ (entre Ouargla et Touggourt), Oued Souf, la cuvette de Ouargla et le M'zab (Ghardaïa). Ces palmerais sont constitués principalement de Deglet-Nour, cultivar à très haut valeur commerciale.

➔ **À l'Ouest:** la Saoura (Beni Abess), le Touat (Adrar), le Gourara (Timimoun), Le Tidikelt (Reggane) et le Golea. Ces palmeraies comportent un verger très diversifiée. Ces cultivars produisent des dattes de qualité commerciale très faible [9].

I.7. Intérêt et importance des palmiers dattiers

Le palmier dattier dans les régions arides du monde est la plante la plus importante tant sur le plan écologique, économique et social [32].

I.7.1. Écologique

Le palmier dattier est l'arbre providence des régions chaudes et désertiques où il croît. Il permet aux populations de ces régions de vivre et de se maintenir dans des conditions très sévères.

En outre, le dattier crée des conditions climatiques favorables (protection vis à vis des vents violents, atténuation de l'ensoleillement par tamisage, le maintien d'un certain degré d'humidité) à l'implantation de cultures maraîchères, arboricoles ou fourragères [27].

Un champignon du sol, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, provoque chez le dattier une fusariose (le bayoud) qui entraîne sa mort ; cette attaque cryptogamique a fait disparaître les palmiers dattiers de nombreuses oasis. Le phénomène de désertification s'est ainsi accentué par un déséquilibre profond des écosystèmes de nombreuses palmeraies.

I.7.2. Économique

- La datte constitue la base de l'alimentation des populations oasiennes. Elle est aussi utilisée comme dessert et elle est soit consommée directement, soit transformée en produits alimentaires (pâtes, confiture, crème, farine, sirop, vinaigre et alcool de datte).
- Les noyaux de dattes servent à l'engraissement du cheptel. Les noyaux concassés sont utilisés comme reconstituant pour les dromadaires amaigris. Cette alimentation est tonifiante et très riche en glucides. Les graines torréfiées peuvent fournir un succédané de café.
- Le tronc fournit le bois de chauffage et du matériel pour la construction. La sève qui s'écoule du stipe incisé est utilisée pour la préparation de boisson appelée le vin de palme ou lagmi qui peut être bu frais ou fermenté.
- Les palmes (vertes ou sèches) sont utilisées pour la vannerie (confection des couffins, chapeaux, éventails et nattes). On les trouve aussi en clôture, sous les toitures.
- L'inflorescence est utilisée en balai et la spathe en bois de chauffage.
- Le coeur de palmiers fournit le djemmar qui peut être consommé cru.
- La production mondiale est de l'ordre de 5.960.000 tonnes (année 2004) (données FAO2) dont plus de 4.227.00 Q tonnes produites par les pays arabes soit 71% de la production mondiale.
- En ce qui concerne l'Algérie, le nombre total de palmiers est estimé à plus de 17 millions (année 2006) (données FAO) sur une superficie de plus de 147 900 hectares. La production dattière algérienne est de l'ordre de 550.000 tonnes (année 2006) (données FAO). Dans ce contexte, l'Algérie serait le 6^{ème} producteur mondial de datte et le 5^{ème} exportateur au niveau du monde arabe.

I.7.3. Thérapeutiques et cosmétiques

Choix des cultivars pour leur usage médical [32].

- U'chet, Feggouss : fortifiant pour les femmes après accouchement, sucette pour Bébés.
- Dalt (Algérie) : sucettes pour nouveaux nés.
- Azerza et Ghars (Algérie) : utilisées comme compresses pour le rétablissement des fractures des os.
- Jihl (Maroc) : Régulation de l'hyper tension artérielle.
- Des masques de beautés à base de dattes (Maroc, Algérie, Tunisie).
- Utilisation de pollen pour le traitement des problèmes de stérilité chez l'homme et la femme. (Algérie, Maroc et Tunisie).
- Bourar (Maroc) : utilisés dans les régimes alimentaires pour lutter contre l'obésité.
- Les penes de Timjouhart utilisés contre la toux et les angines.

Dans ce chapitre nous avons donné généralités botanique sur la plante étudiée, et nous avons présenté aussi la répartition et l'importance écologique et économique des palmiers dattiers.

Dans le chapitre II, nous présenterons une synthèse bibliographique sur les polyphénols et qui permettra de décrire les métabolites secondaires principaux et l'activité antioxydante.

***II. POLYPHÉNOLS
ET ACTIVITÉ
ANTIOXYDANTE***



Chapitre II : Polyphénols et activité antioxydante

II.1. Les composés phénoliques

II.1.1. Généralités

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction.

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol.

Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [33].

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [34].

II.1.2. Classification

Selon [35] les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : Les non flavonoïdes et les flavonoïdes, sans oublier les tannins qui sont des polyphénols complexes.

II.1.2.1. Les non flavonoïdes

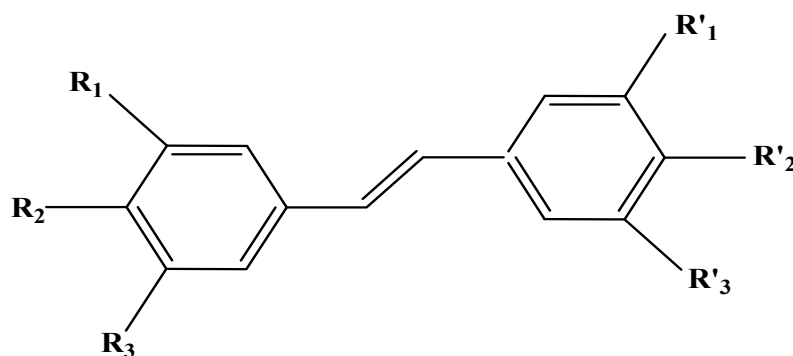
Cette classe contient plusieurs composés chimiques, parmi les quels : les acides phénoliques, les stilbenes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones.

➤ Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres [36]. Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique [37].

➤ Les stilbenes hydroxylés

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés on trouve le resveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales [38].



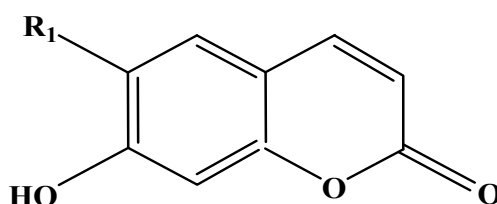
$R_1 = R_3 = R'_2 = OH, R_2 = R'_1 = R'_3 = H$
 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R'_2 = OH$
 $R_1 = \text{glucose}, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R_3 = R'_2 = OH$

Resvératrol
 ptérostilbène
 picéide

Figure (II.1) : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.

➤ **Les coumarines**

Les coumarines sont composées obtenues par lactonisation de l'acide orthocoumarique. Ces coumarines, une fois hydroxylés sur le noyau aromatique, sont des composés phénoliques à structures variables. Elles sont généralement substituées en C7 par un hydroxyle [39]. Ces composés possèdent une structure de base : le benzo-2-pyrone. A présent plus de 1000 composés coumariques sont isolés dont plus de 800 sont isolés à partir des plantes et des micro-organismes. Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [40].



$R_1 = H$ Umbelliférol
 $R_1 = OH$ Aescultol
 $R_1 = OCH_3$ Scopolétole

Figure (II.2) : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.

➤ **Les lignines et les lignanes**

Les lignanes constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétale. Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropènes. Ces derniers sont formés par dimérisation des trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique. Le sécoisolaricirésinol et le matairesinol constituent les principales lignanes d'origine végétale [41].

➤ **Les xanthones**

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1-C6) [42].

II.1.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. À présent plus de 4000 composés ont été identifiés soit environ 50% des polyphénols. Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique [39].

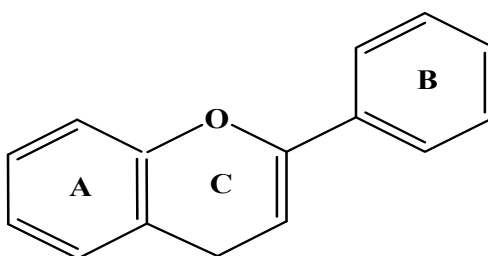


Figure (II.3) : Structure de base des flavonoïdes.

Plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central [39].

➤ **Les flavones**

Caractérisés par une structure C6-C3-C6 avec une liaison C2-C3 est insaturé et une fonction cétone tels que l'apigénine et la vitexine (Figure II.4).

➤ **Les flavanes**

Ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé et qui n'ont pas de fonction cétone. Les flavanes sont réponsus dans les écorces des végétaux [43]. Ces composés sont connus sous forme de monomères ou polymères exemple la catéchine (Figure II.4).

➤ **Les flavanones**

Ce sont des flavones dont l'hétérocycle central C est saturé tels que l'hespértine et la fustine (Figure II.4).

➤ **Les flavonols**

Ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C tels que le kaempférol, la quercétine et la rutine (Figure II.4).

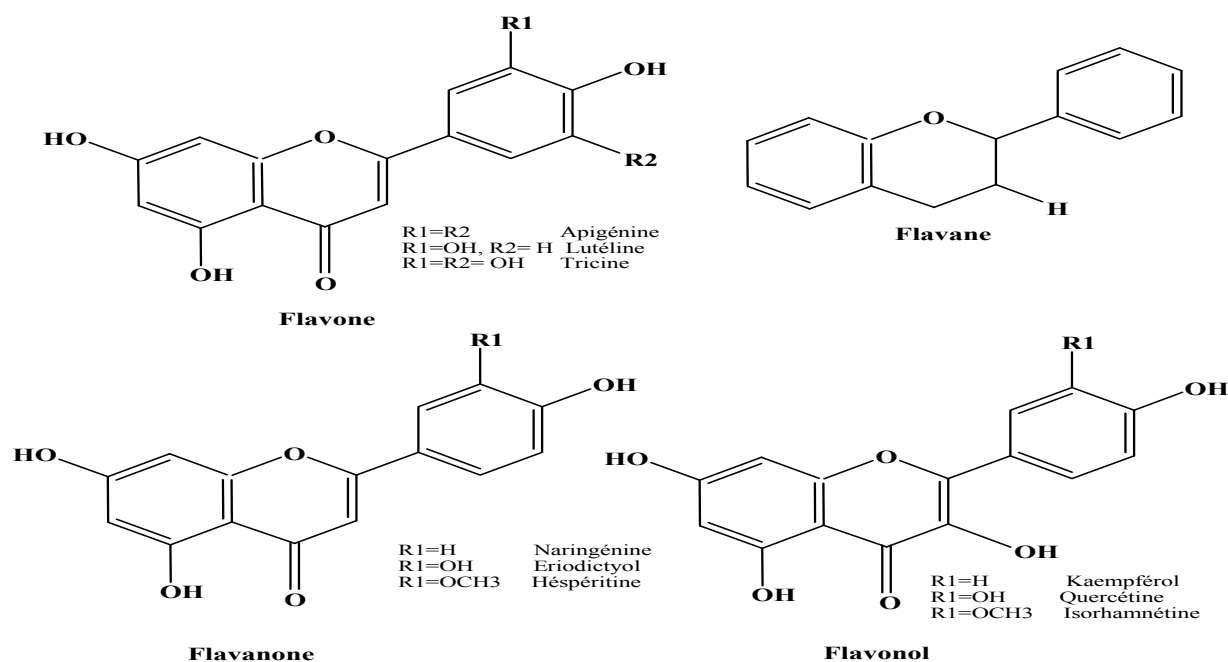


Figure (II.4) : Structure de quelque flavonoïdes.

II.1.2.3. Les tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [44].

Selon leurs structures biochimiques, on distingue deux classes de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

➤ Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein [45]. Ils sont divisés en éllagitannins et gallotannins, les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique [46].

➤ **Les tannins condensés**

Ces composés sont appelés aussi proanthocyanidines. Ces composés possèdent comme structure de base le flavan-3-ol ou le flavan-3,4-diol [47]. Ces tannins ne renferment pas de sucres dans leurs molécules. Ils ne sont pas hydrolysés par les acides comme c'est le cas des tannins hydrolysables. Ils se transforment en présence d'acide fort ou d'agents d'oxydation en substances rouges qui sont les phlobaphènes [48].

II.1.3. Propriétés chimiques majeures des polyphénols

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anions phénoxydes (Figure II.5) stabilisés par résonance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical [49] ; l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical [50]. Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre [51].

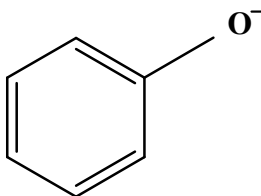


Figure (II.5) : Structure chimique de l'ion phénoxyde.

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel [49].

Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale [36].

II.1.4. Intérêts des composés phénoliques

II.1.4.1. Rôle nutritionnel et thérapeutique

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation animale. À titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10 g de ces composés par jour.

Les polyphénols jouent un grand rôle dans la quantité nutritive et hygiénique des aliments, certains d'entre eux ont des propriétés vitaminiques utilisées par l'industrie pharmaceutique. Ils interviennent également dans la digestibilité des aliments, dans l'utilisation physiologique des protéines (avec lesquelles les tanins se combinent), ...etc. Les décès dus au infarctus du myocarde ou par athérosclérose coronarienne sont associés au taux élevé des cholestérols du type LDL (Low density Lipoprotéines) circulant dans le sang. Des études ont démontré qu'une consommation importante d'antioxydants phénoliques (vitamine E, queucétine...) pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose, en diminuant l'oxydation des LDL [52].

Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumons, peau, vessie,...etc) à tout les stades de cancérogénèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agent bloquant en empêchant l'activation de pro carcinogène. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agent suppresseur de tumeurs. Les mécanismes impliqués peuvent la encore être très variés : prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose et l'inhibition de l'angiogénèse.

Les polyphénols pourraient aussi exercer des effets protecteurs contre les maladies hormono dépendantes telle que l'ostéoporose en modulant la réponse aux oestrogènes endogènes [53]. Enfin, les composés phénoliques et en particulier, l'acide salicylique (acide hydroxybenzoïque) ont également des propriétés antiseptiques.

II.1.4.2. Rôle physiologique

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme général du développement d'un organe végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances.

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaires, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [54].

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques de feuilles, ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV [55].

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plus part de ces pigments sont des anthocyanes, des aures et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et des fruits [56].

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques [57]. Des chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leur mécanisme d'action [58].

Ziouti et al. (1998) ont étudié l'implication des composés phénoliques du palmier dattier dans la réaction de défense de cette plante contre le bayoud, maladie infectieuse due à un champignon tellurique *Fusarium oxysporum f.sp* et ils ont étudiés aussi les résultats relatifs à l'effet de l'inoculation par l'agent pathogène sur la composition phénolique et sur les enzymes d'oxydation des phénols [59]. Ces composés pourraient contribuer dans la défense du palmier puisque l'insolubilisation des phénols dans les parois cellulaires participe au renforcement et à la rigidification de celles-ci qui deviennent alors moins dégradables par les parasites [60].

Le monde animal et lui aussi très concerné par les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes. On trouve par exemple de : la chrysin, la quercétine, la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa, le sapin, le saule, l'orme et la modifient par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent instinctivement en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leur ruche et en colmatant les fentes. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient, entre autre, utilisées par les civilisations égyptienne, romaine, grecque et inca [61].

II.1.4.3. Rôle technologique

Généralement les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols [62].

L'astringence est la capacité des tanins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives et leur astringence, car ils précipitent les protéines salivaires entraînant avec elles leur "cortège" de molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche [33, 63]. L'astringence est liée à la polymérisation des tanins puisque la diminution de l'astringence dans les fruits lors de leur maturation est due à une augmentation de la polymérisation des tanins [64].

Ainsi dans la technologie de certains produits végétaux, les transformations des composés phénoliques jouent un rôle important : ceci est valable aussi bien pour la fermentation des feuilles de thé et des grains de cacao...etc [65].

II.1.5. Activité antioxydante des polyphénols

Les polyphénols possèdent surtout une forte activité antioxydante [66]. L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, pour les flavonoïdes, ce mécanisme est lié à leur structure et à l'arrangement des groupements hydroxyles [67].

Des études effectuées sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montrées que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

À titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [68].

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est dirigée principalement vers HO et O²⁻ aussi les radicaux peroxy et alkoxy. En plus, comme ces composants présentent une forte affinité pour les ions du fer (catalysent plusieurs processus conduisant à l'apparition des radicaux libres), leur activité antiperoxydative peut être aussi attribuée à une capacité concomitante de chélation du fer [66].

Par ailleurs, l'inhibition des enzymes présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains.

Une étude réalisée a montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase [68].

II.2. Activité antioxydante

Radicaux libres 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 toutefois 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 « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement.

La protection contre les effets délétères induits par les radicaux oxygénés s'effectue à l'aide de trois types d'agents différents : les protéines non enzymatiques, Les enzymes tels que les superoxyde-dismutases et les glutathion-peroxydases et enfin les antioxydants d'origine nutritionnelle tels que les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C) et les polyphénols qui sont des antioxydants essentiels pour l'homme.

II.2.1. Les radicaux libres

II.2.1.1. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène [69].

Les radicaux libres sont électriquement neutres ou chargés (ioniques) et comprennent l'atome d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée), etc. (Tableau II.1).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines. L'appellation " dérivés réactifs de l'oxygène " n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxyde d'azote ($ONOO^*$) [71].

II.2.1.2. Principaux radicaux libres

- L'anion superoxyde O_2^* : La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.
- Le radical hydroxyle OH^* : Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- Le radical peroxyde: ROO^* .
- L'oxygène singulet : forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité.

Tableau (II.1) : Principaux radicaux libres et leur structure chimique [70].

Radicaux libres (nomenclature)	Structure chimique
Radical hydroxyle	OH^\bullet
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène*	H_2O_2
Peroxynitrite	$ONOO^\bullet$
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$

* *Espèce active de l'oxygène, non radicalaire.*

II.2.2. Les antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

II.2.2.1. Définition

Il peut être défini comme toute substance qui est capable, concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [71]. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

II.2.2.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

II.2.2.2.1. Antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (**BHA**), le butylhydroxytoluène (**BHT**), la gallate propylée (**PG**) et le tetra-butylhydroquinone (**TBHQ**), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [72].

II.2.2.2.2. Antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [73].

II.2.2.2.3. Antioxydants synergistes

Ce sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence d'autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés (lysine et arginine), de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer et le cuivre qui ont un effet pro-oxydant à faibles doses. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées [74].

II.2.2.2.4. Antioxydants primaires

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques (L^{\bullet} , LOO^{\bullet} , LO^{\bullet}) en produits plus stables (LH, LOOH, LOH) grâce à leur propriété de donneurs de protons actifs. Le radical (A^{\bullet}) dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable [75].

II.2.2.2.5. Antioxydants secondaires

Selon [76], les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- Absorption des radiations ultraviolettes;
- Inactivation de l'oxygène singulet;
- Chélation des métaux
- Décomposition des hydroperoxydes;

II.2.2.3.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire [77].

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés [78]. Une autre méthode a été proposée par [79] qui combinent la méthode précédente avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est reliée avec l'oxydation dans les aliments et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent, le balayage des radicaux de superoxyde (O_2^{\bullet}) ; le balayage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; le balayage d'acide hypochloreux (HOCl) [80] ; le balayage du radical d'hydroxyle (HO^{\bullet}) ou le balayage du radical du peroxyde (ROO^{\bullet}). Parmi ces méthodes, la méthode de PIEGE (paramètre total d'antioxydant de radical en piégeage [81] ; la méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) [82] ; la méthode d'ABTS (le balayage du radical 2,2-azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) [83] ; le balayage du radical stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (la méthode du radical DPPH $^{\bullet}$) [84, 85] ; la méthode de DMPD (le balayage du radical N,N'-p di-méthylque-phénylènediamine) [86] ou la méthode de Photochemiluminescence (PLC) [87].

Dans le chapitre suivant nous présenterons les matériels et les méthodes expérimentales correspondantes dans notre étude.

2^{ème} PARTIE

ÉTUDE

EXPÉRIMENTALE



I. MATÉRIELS ET MÉTHODES



Chapitre I : Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au sein de laboratoire de valorisation et technologie des ressources sahariennes (VTRS) de la faculté de la technologie à l'Université Echahid Hamma Lakhdar d' El Oued. Ce travail comprend l'étude de l'effet des méthodes et solvants sur l'extraction des composés phénoliques et leur activité antioxydante.

I.1. Echantillonnage

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de *phoenix dactylifera* L. Les feuilles de la variété de Ghars ont été récoltées en Décembre 2013 dans la zone Nord-ouest de la wilaya d'El oued.

Les différentes données sur le site d'échantillonnage sont mentionnées dans le [tableau \(I.1\)](#) ci-dessous, et représentées par la [figure \(I.1\)](#) :

Tableau (I.1) : Données sur le site d'échantillonnage de *phoenix dactylifera* L.

Localisation	Nom du site	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Étage bioclimatique	Date de récolte
Nord ouest	Kouinine	Latitude: 33°24'15"N Longitude: 6°49'35" E	76	Aride	19/12/2013



Figure (I.1) : Carte géographique montrant la zone de collecte.

I.2. Méthodologie

I.2.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est d'une importance capitale pour toute analyse fiable. Les échantillons des feuilles ont été d'abord nettoyés, ensuite séchés à l'ombre à l'abri de la lumière, à température ambiante.

Après séchage, les feuilles ont été broyées pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des différents extraits.

Le séchage à l'ombre demande une bonne circulation de l'air. Ce type de séchage ne doit pas s'effectuer dans un bâtiment ordinaire, mais sous un abri spécialement conçu à cet effet, c'est-à-dire ouvert sur un côté. La plupart des aliments à sécher sont coupés en tranches parce que les tranches séchent généralement plus vite que l'aliment entier. Les tranches ne doivent pas avoir plus de 1 cm d'épaisseur, de façon à sécher entièrement et rapidement. Il faut placer les aliments sur des nattes ou des plateaux, bien au-dessus du sol, afin d'éviter qu'ils soient contaminés par la poussière ou par le sol. Il faut les retourner tous les jours pour les faire sécher plus rapidement [88].

I.2.2. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, les intervalles de temps, le nombre et les étapes d'extractions individuelles, jouent également un rôle important dans cette procédure. Des étapes supplémentaires de purification des échantillons peuvent être nécessaires en vue d'éliminer des composés tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles [42].

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des polyphénols. La méthode la plus efficace qui a été choisie dans cette étude c'est l'extraction solide-liquide.

Dans notre étude, pour l'analyse des composés phénoliques et polyphénoliques en utilisant trois méthodes d'extraction qui sont : l'extraction par Soxhlet, macération et par ultrason.

III.2.2.1.Extraction classique

15g de poudre des feuilles sèche est placé dans un erlenmeyer avec 90 ml de solvant (différent solvants utilisées), et sont soumis à une extraction par macération à 25 °C pendant 24h. Les extraits sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif de type BUCHI Heating bath R-210 muni d'une pompe à vide à une température 70°C pour éliminer le solvant. Le résidu sec obtenu ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservé à +4°C pour protéger ses caractéristiques physicochimique.

III.2.2.2.Extraction par ultrason

Appareil ultrason de type H (J.P.SELECTA, s.a) a été utilisé pour l'extraction accélérée. Un bêcher a été partiellement immergé dans un bain d'eau isotherme pour maintenir la température d'extraction à 25 ° C. Quinze grammes (15 g) des feuilles ont été ensuite extraites avec 90 ml de solvant pendant 60 min. L'extrait a été filtré à travers du papier filtre sur un entonnoir de Büchner sous vide. Le filtrat a été évaporé rotatif sous vide à 70° C à sec. Les extraits ont été stockés à +4° C dans l'obscurité jusqu'à l'utilisation.

III.2.2.3.Extraction par Soxhlet

La matière végétale broyée (15 g) et 90 ml de chaque solvant ont été prélevés dans l'appareil Soxhlet, et on a extrait pendant 6 heures. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées) est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température de 70 °C pour éliminer tous le solvant. Les différents extraits sont gardées dans le réfrigérateur à une température de +4 °C jusqu'à l'analyse.

Chaque méthode d'extraction a était répétée trois fois avec les solvants suivant : 70% d'acétone, de méthanol et d'éthanol.

Les résidus obtenus sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible afin de quantifier les teneurs en composés phénolique ensuite ils sont analysés par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols contenus dans les différents échantillons.

I.3. Méthodes d'analyse physico-chimiques

I.3.1. Etude par spectrophotométrie (UV-visible)

I.3.1.1. Définition

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

I.3.1.2. Principe

La spectrophotométrie consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible. Cette absorption est due au passage d'un électron d'un niveau énergétique à un niveau énergétique supérieur avec une modification des états de vibration et de rotation. Ainsi, l'électron passe d'une orbitale moléculaire à une autre [89].

D'une manière générale, la solution dont on désire étudier l'absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, et qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde [90].

I.3.1.3. Appareillage

Pour la plupart des spectrophotomètres UV-visible, les lampes utilisées sont des lampes au deutérium. Ces lampes au deutérium émettent un rayonnement dont les longueurs d'onde sont comprises entre 180 et 400 nm. Pour la partie visible du spectre, les plus utilisées sont les lampes halogène au quartz à filaments de tungstène dont le rayonnement est compris entre 350 et 1300nm. La présence de l'halogène augmente sensiblement la durée de vie de la lampe (1500 à 2000 heures). Ces deux lampes sont donc utilisées de façon complémentaire et simultanée pour couvrir la totalité du spectre UV-visible [91].

I.3.2. Etude par chromatographie

I.3.2.1. Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile [92].

I.3.2.2. Principe

La chromatographie consiste à entraîner les différentes molécules contenues dans un mélange pour les séparer en fonction de leurs vitesses d'élutions. Les molécules sont adsorbées sur un support fixe qui est la phase stationnaire et désorbées par l'éluant. Il y a donc une distribution ou partition des composants du mélange plus ou moins rapide entre ces deux phases. Les différents constituants du mélange sont récupérés séparément dans plusieurs fractions [94].

Au cours de notre étude nous avons utilisé la chromatographie liquide haute performance (HPLC).

I.3.2.3. La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique [93].

Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption.

La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme [93].

I.3.2.4. Appareillage

HPLC est composée des éléments suivants [94] :

- **La colonne** : généralement c'est un tube en acier de 5 à 15 cm de longueur et de diamètre de 5 mm qui contient une phase stationnaire. Il existe plusieurs types de phases stationnaires parmi les quelles on trouve principalement
 - **Les silices non greffées**
 - **Les silices greffées par des groupements polaires** : pour les quelles l'éluant utilisé est apolaire. On parle alors de chromatographie en phase normale.
 - **Les silices greffées par des groupements apolaires (chaines carbonées linaires plus ou moins longues)** : pour les quelles l'éluant utilisé est polaire, dans ce cas il s'agit de chromatographie en phase inverse.
- **Injecteur** : il est constitué d'une vanne haute pression appelé vanne rhéodyne et d'une boucle d'échantillonnage d'une capacité comprise entre 10 et 50 µl. Cette boucle permet une fois remplie de déposer l'échantillon à l'entré de la colonne sans perte de pression.
- **La pompe** : elle permet d'introduire la phase mobile dans l'appareil sous un débit constant et à forte pression.
- **Détecteur** : il existe plusieurs types des détecteurs. Parmi les quels, des détecteurs à absorptiométrie dans l'UV-Visible, des réfractomètres différentiels ou des détecteurs électrochimiques.

I.4. Dosages des composés phénoliques

La détermination des composés phénoliques : polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT), flavanols totaux (FLT) et tannins condensés (TC) présents au niveau des différents extraits a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type Shimadzu UV-Vis 1800.

I.4.1. Réactifs chimiques

Une série des produits chimiques ont été utilisés pour doser les composés phénoliques des différents extraits de la plante. Le réactif de Folin-Ciocalteu est fourni par PROLABO, l'acide gallique, rutine, quercétine et la vanilline sont fournis par Alpha Asear (France), la

catéchine produit par Sigma-Aldrich Chimie (France), le carbonate de sodium (Na_2CO_3), le chlorure d'aluminium (AlCl_3), acétate de sodium (CH_3COONa) et l'acide chlorhydrique (HCl) découlent de Biochem chemopharma Co (Canada).

I.4.2. Dosage des polyphénols totaux (PPT)

➤ Principe

Le dosage des polyphénols est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange de complexes de sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleu. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Ainsi, le dosage des PPT se fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique [95].

➤ Mode opératoire

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante, 0.2 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.02 jusqu'à 0.16 mg/mL, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée est ajouté puis immédiatement. Après 5min, on ajoute 0.8ml d'une solution de Na_2CO_3 (7.5%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 765nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique [96].

➤ Droite d'étalonnage de l'acide gallique

Ces courbes sont établies en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS). Les courbes d'étalonnage sont établies avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.995$, 0.998, 0.999 pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement.

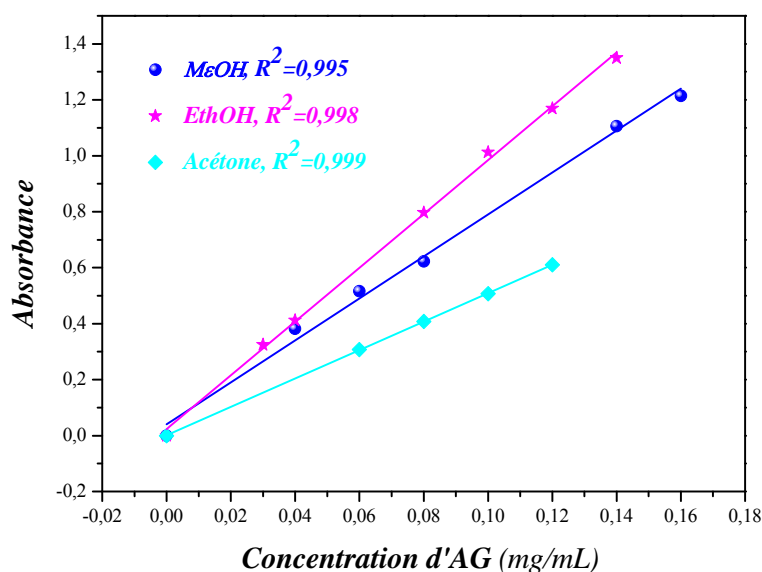


Figure (I.2) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des polyphénols totaux.

I.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

➤ Principe

Le réactif utilisé est : le chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par ce réactif, elle entraîne la formation d'un complexe jaune absorbe à 415 nm [97].

➤ Mode opératoire

Les flavonoïdes totaux sont évalués par colorimétrie, 1 ml de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 2%) préparé dans l'éthanol [98].

Une courbe d'étalonnage est élaborée avec des solutions standards de rutine préparées à de concentrations différentes. L'absorbance du mélange obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 415 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent rutine/ gr de matière sèche (mg ER/g MS).

➔ Droite d'étalonnage de rutine

Dans ce dosage on utilise la rutine pour l'établissement de ces courbes. Les courbes sont établies avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,994$, $0,994$, $0,997$ pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g MS).

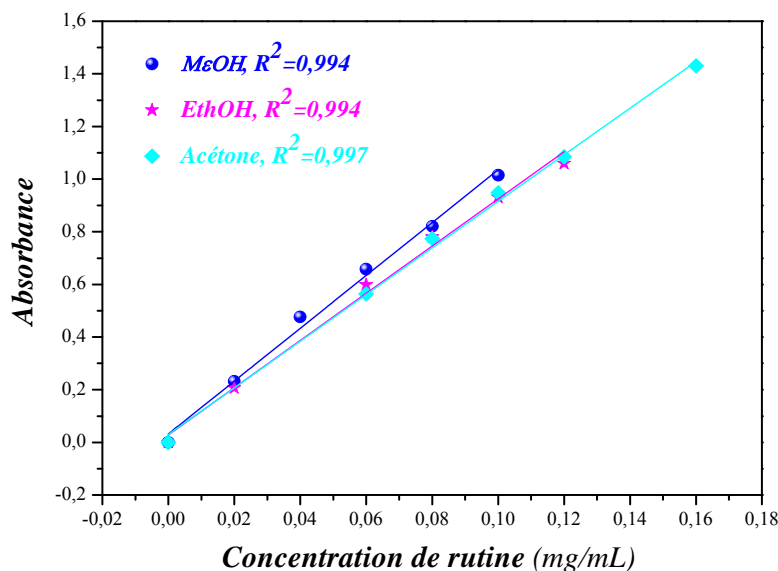


Figure (I.3) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des flavonoïdes totaux.

I.4.4. Dosage des flavanols totaux (FLT)

L'estimation de la teneur en flavanols totaux contenus dans les extraits est réalisée par la méthode de Mbaebie et al.

➔ Mode opératoire

Un volume 400 μ l des extraits des feuilles a été ajouté à 400 μ l $AlCl_3$ (2%) dans 95% d'éthanol. La réaction précédente est mélangée avec 600 μ l d'acétate de sodium (50g/l) et incubée pendant 2,5 h à 20°C. L'absorbance est mesurée à 440 nm. La teneur totale en flavanols exprimée en mg équivalent quercétine (EQ) / g de poids sec à l'aide de la courbe d'étalonnage [99].

➔ Droite d'étalonnage de quercétine

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de cette courbe est la quercétine. Les courbes sont établies avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.997$, 0.99 , 0.99 pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

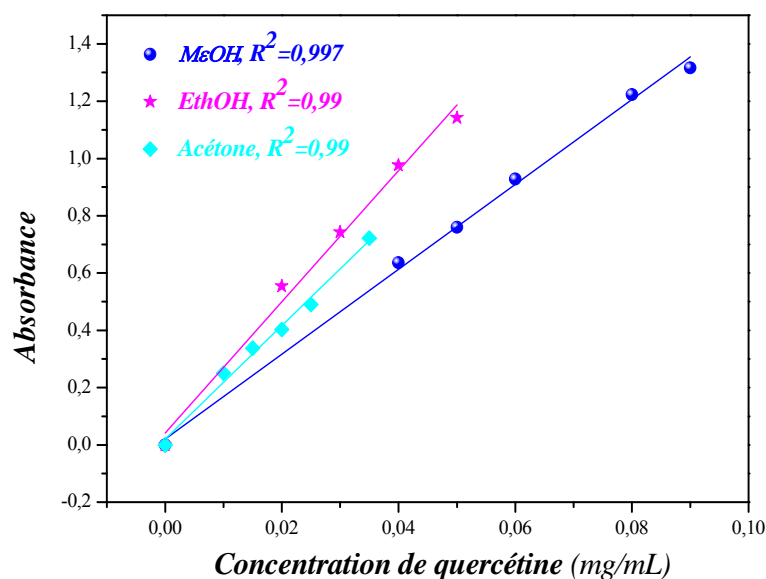


Figure (I.4) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des flavonols totaux.

I.4.5. Dosage des tanins condensés (TC)

➔ Principe

Pour doser les tannins condensés, la méthode de la vanilline a été utilisée [100, 101, 102]. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

➔ Mode opératoire

50 µl d'extrait ou standard (catéchine) a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai de verre, et ajouté 600µl de mélange 4% vanilline et de méthanol (4%, v / v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 300 µl d'acide chlorhydrique concentré (HCl) est additionnés. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesuré à 500 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-

Visible. La teneur totale en tanins condensés est calculée comme étant mg équivalent de catéchine (mg ECa/g MS) en utilisant l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage [103].

➔ Droite d'étalonnage de catéchine

Les courbes sont établies en utilisant la catéchine référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche (mg ECa/g MS). La courbe d'étalonnage établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,998$, $0,993$, $0,997$ pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement.

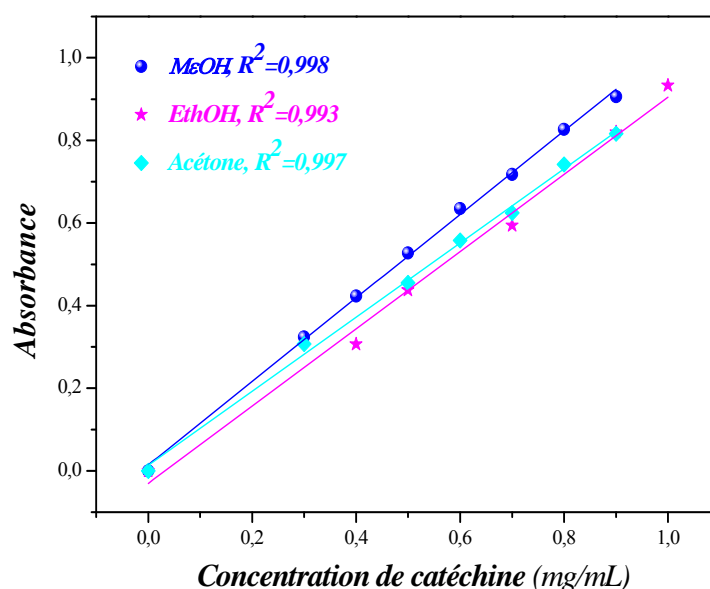


Figure (I.5) : Courbes d'étalonnages pour le dosage des tanins condensés.

I.5. Identification des composés phénoliques

Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé une RP-HPLC (HPLC en phase inverse) de type HPLC-RP-C18 couplé à un détecteur monochrome UV SPD-20A équipé d'une boucle d'injection de 20 μ l. La colonne, de 125 mm de longueur et de 4,6 mm de largeur, est remplie d'une phase de silice greffée C18. La détection a été réalisée à longueurs d'onde 300 nm. La séparation des solutés de nos échantillons a été réalisée en mode gradient d'élution.

I.5.1. Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés pour les analyses par HPLC ainsi que les solvants ont été fournis par Alpha Asear (France). Il s'agit d'une série d'étalons commercialisés et qui sont utilisés en des références : acide gallique, acide chlorogénique, acide caféique, vanilline, quercétine et rutine.

I.5.2. Gradient d'éluion

- Solvant A : composition H₂O acide acétique (0.2%).
- Solvant B : composition acétonitrile.

Avant chaque utilisation, les solvants sont préparés et filtrés sur papier Whatman N°3.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- ✓ Débit : 1 ml/min;
- ✓ Volume d'injection : Volume d'injection: 20 µl;
- ✓ Longueur d'onde : 300 nm;
- ✓ Temps d'analyse : 50min;
- ✓ Concentration des échantillons : 5 mg /ml;

I.6. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité anti-oxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité anti-oxydante trois techniques chimiques à savoir : capacité antioxydante totale (CAT), la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

I.6.1. Réactifs chimiques

Tous les produits chimiques utilisés dans cette étude sont de qualités analytiques et ils sont les suivants: Acide sulfurique (H₂SO₄), ammonium molybdate tetrahydrate (H₂₄MO₇N₆O₂₄ .4H₂O), sodium phosphate monobasic dehydrate (NaH₂PO₄ .2H₂O), chlorure de fer (FeCl₃) et sulfate de fer (FeSO₄) par Biochem chemopharma Co (Canada), DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) et TPTZ (C₁₈H₁₂N₆) produit par (ALFA AESAR).

I.6.2. Activité antioxydante totale (TAC)

➤ *Principe*

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide [104].

➤ *Mode opératoire*

Un volume de 200 μl de chaque extrait est mélangé avec 2 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 60 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 2ml de la solution du réactif et 200 μl du solvant utilisé et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) [105].

➤ *Droite d'étalonnage de l'acide gallique*

Ces courbes sont établies en utilisant l'acide gallique comme référence et les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). Les courbes d'étalonnage sont établies avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.993, 0.999, 0.988$ pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement.

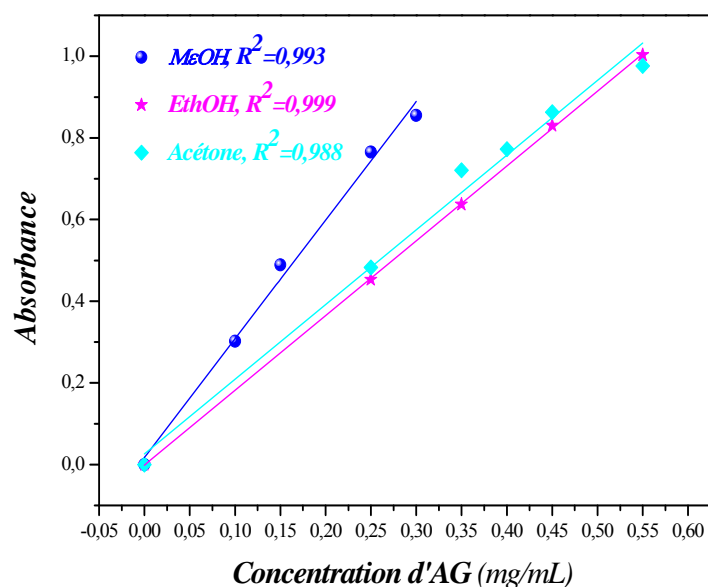


Figure (I.6) : Courbes d'étalonnages pour la mesure de la capacité antioxydante.

I.6.3. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

➔ Principe

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante [106].

Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée bien caractéristique de la solution DPPH. Cette couleur disparaît en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe picryl; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [107]. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm [108 - 110].

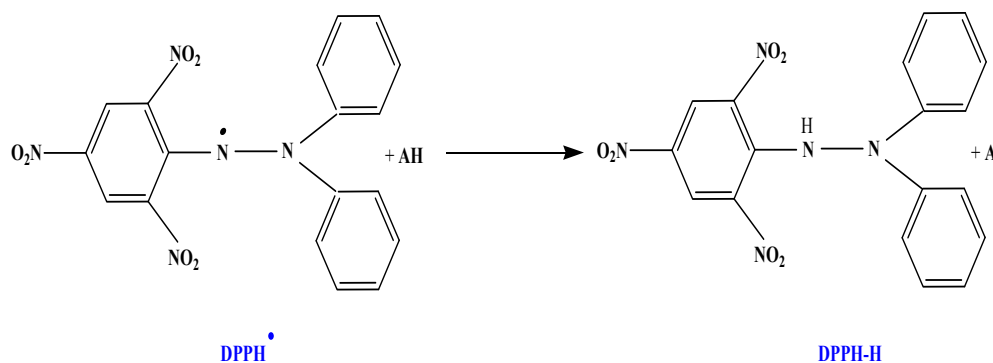


Figure (III.7) : Mécanisme d'action de DPPH.

➔ Mode opératoire

L'évaluation de la capacité antioxydante est réalisée comme suit : à 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.1mM) a été mélangé avec 0.5 ml de l'extrait des feuilles. Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 515 nm contre un témoin composé de 1 ml de la solution de DPPH et de 0.5 ml de méthanol [111].

Les résultats exprimés en IC_{50} qui sont calculés à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC_{50} est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande [112].

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

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Abs_{Control} - Abs_{Extrait}}{Abs_{Control}} * 100$$

Avec :

$Abs_{Control}$: Absorbance du control (ne contenant aucun antioxydant).

$Abs_{Extrait}$: Absorbance des extraits mesurés.

L'activité anti-radicalaire exprimée en IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$), la dose anti-radicalaire nécessaire pour provoquer 50% d'inhibition.

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

À partir de cette régression, nous avons déduit la valeur d'IC₅₀ correspondante.

I.6.4. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

➤ Principe

La méthode FRAP est basée sur la réaction de réduction de fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺) par un antioxydant, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) à la couleur bleu-vert du fer ferreux (Fe²⁺). Le mécanisme réactionnel de la réduction de fer est expliqué dans la figure suivante [113] :

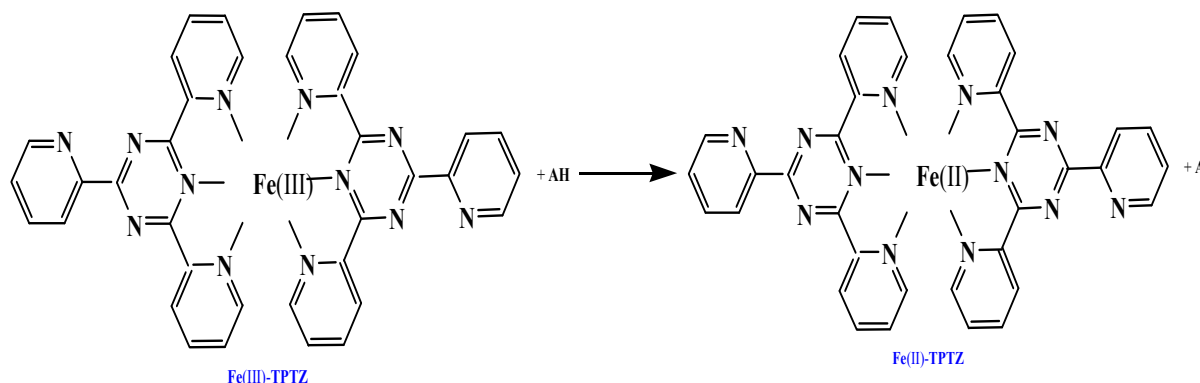


Figure (I.8) : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH).

➤ Mode opératoire

La détermination de la capacité antioxydante par la méthode du FRAP est réalisée comme suit : le réactif FRAP était fraîchement préparée par mélange de 25mL d'une solution tampon d'acétate buffer (3mM, pH 3.6), 2,5mL de TPTZ (10 mM), 2,5mL du chlorure ferrique (20mM) et 3mL d'eau distillée. 30 µL des différents échantillons d'essai ont été ajoutés à 970 µL du FRAP réactif. L'absorbance a été lue à 593 nm après 30 minutes

d'incubation à température ambiante contre une vierge [114]. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de FeSO_4 par 100mg de matière sèche (mg E FeSO_4 /100mg MS).

➤ Droite d'étalonnage du sulfate de fer

Le composé de référence utilisé pour l'établissement de ces courbes est FeSO_4 . Les courbes sont établies avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,998, 0,997, 0,996$ pour MeOH, EthOH, et l'acétone respectivement.

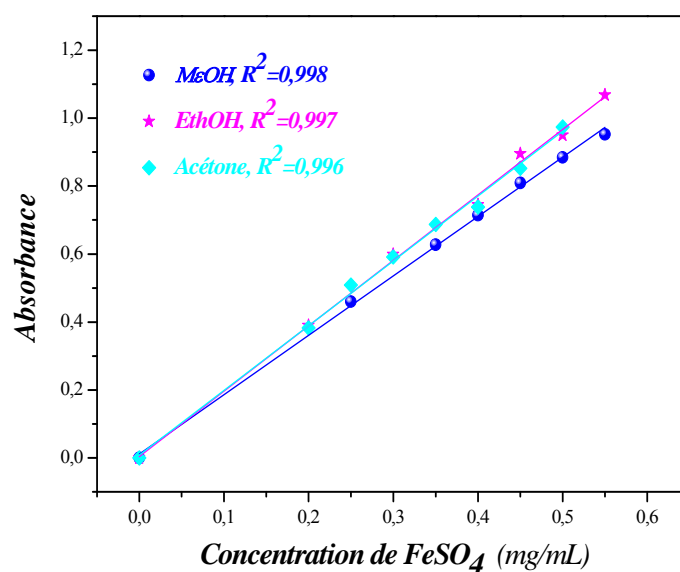


Figure (I.9) : Courbes d'étalonnages pour le pouvoir réducteur de fer.

Dans le chapitre suivant, nous présenterons et discuterons les résultats des dosages, l'identification des composés phénoliques et l'évaluation d'activité antioxydante des feuilles de *Phoenix dactylifera* L.

3^{ème} PARTIE

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS



I. DOSAGES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES



Chapitre I : Dosages des composés phénoliques

I.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques

Les rendements des extractions sont calculés suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse de résidu extrait}}{\text{Masse initial de végétale}} * 100$$

Dans la littérature, plusieurs solvants sont employés pour l'extraction des composés phénoliques et souvent mélangés avec l'eau à la proportion différente [115, 116]. En général, les composés phénoliques aux plantes sont les composés polaires, qui habituellement sont extraits au moyen des solvants polaires tels que l'acétone et le méthanol aqueux [117].

Il est connu que les polyphénols, du fait de leur grande diversité, sont pratiquement impossibles ni à extraire ni à fractionner par une méthode unique [118].

Le choix du solvant pour l'extraction des composés phénoliques, à partir du matériel végétal, dépend de la nature et de ces composés. Généralement, les solvants organiques sont les plus utilisés pour l'extraction des différents constituants des plantes [119].

Les combinaisons de solvants tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone avec l'eau font améliorer l'extraction des composés phénoliques [120 - 124].

Dans la présente étude, le méthanol, l'éthanol et l'acétone sont les solvants de polarité croissante souvent utilisés car ils possèdent l'avantage d'être plus facilement éliminés dans le cas d'une éventuelle concentration de l'extrait sous vide [118].

Les rendements des extractions ont été calculés par rapport au poids total de la poudre végétale sont présentés dans la figure (I.1).

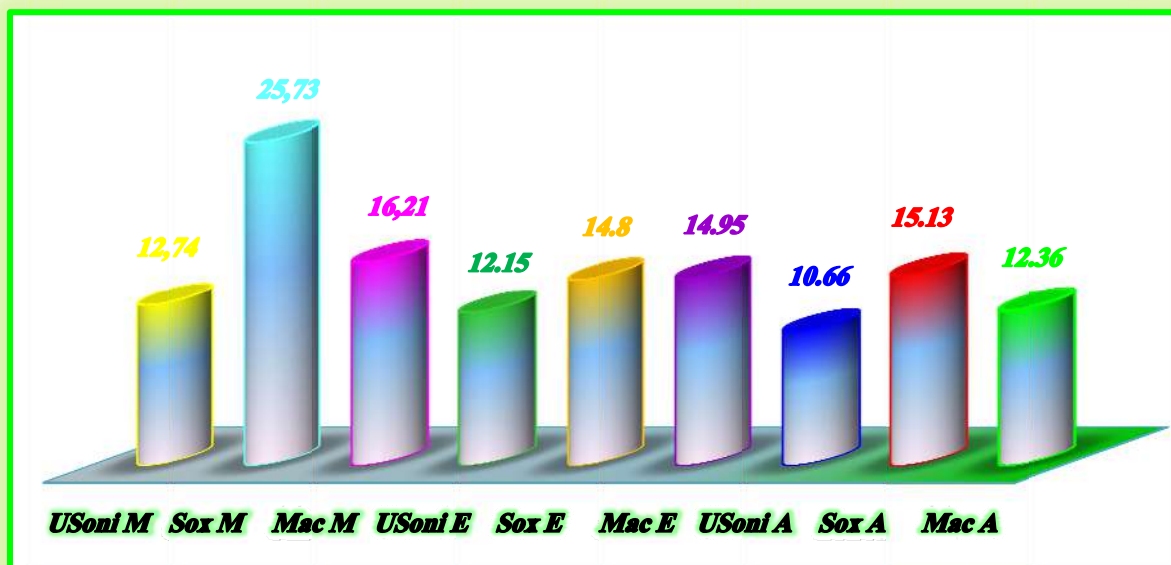


Figure (I.1) : Rendement d'extraction des composés phénoliques dans les différents extraits.

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que les taux d'extraction avec les différents solvants présentent des différences non significatives. Le meilleur rendement est observé avec le méthanol (Sox M et Mac M) : 25,73 % et 16,21% respectivement, suivi par l'acétone (Sox A) et l'éthanol (Mac E et Sox E) avec un taux d'extraction de l'ordre de 15,13%, 14,95% et 14,8% respectivement; le plus faible rendement a été obtenu avec l'extrait d'acétone (USoni A).

Les différences observées pourraient être expliquées par plusieurs facteurs, à savoir : différence de variété, le type de solvant utilisé pour l'extraction ainsi que la technique d'extraction utilisée.

De la grande diversité structurale des polyphénols découle une grande variabilité de leurs propriétés physico-chimiques rendant impossible une présentation unique et générale [118]. D'après [125], l'extraction avec le méthanol donne un rendement en polyphénols plus élevé (7 fois plus) que celle réalisée avec l'eau ; le méthanol étant aussi le solvant qui extrait plusieurs classes de composés phénoliques [126].

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés). Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le

maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante [127].

I.2. Analyse colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

I.2.1. Détermination de la teneur en composés phénoliques

I.2.1.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

L'extraction des composés phénoliques polaires et apolaires est largement dépendante de la polarité des solvants. Ce qui est lié à la différence de polarité des principes actifs [128]. Pour cela, plusieurs combinaisons (solvants/eau) sont réalisées mais il n'y a pas des données publiées sur la composition du solvant type qui extrait tous les composés phénoliques simultanément [129].

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans les différents extraits de *phaenix dactylifera* L sont illustrées dans la figure suivante.



Figure (I.2) : La teneur des PPT dans les différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

Nous remarquons que les 9 extraits aboutissent à des teneurs en composés phénoliques différentes. La variation passe de $172,64 \pm 8,46$ mg EAG/ g MS du feuille (pour l'extrait USoni E) à $625,17 \pm 11,82$ mg EAG/ g MS (pour l'extrait USoni A).

Les extraits d'acétone présentent les valeurs les plus élevées : $625,17 \pm 11,82$ mg EAG/g MS ; $528,81 \pm 29,55$ mg EAG/g MS et $484,44 \pm 4,38$ mg EAG/g MS obtenus par ultrason, soxhlet et par macération respectivement. Ils sont suivis par l'extrait au méthanol avec une teneur de $271,69 \pm$ mg EAG/g MS. Une concentration polyphénolique très faible est relevée pour les extraits à l'éthanol $172,64 \pm 8,46$ mg EAG/ g MS.

Les polyphénols sont connus par leur pouvoir antioxydant et leurs vertus biologiques. Ils contribuent à la prévention des maladies dégénératives et cardiovasculaires ; ils participent à la régénération de certains antioxydants tels que la vitamine E.

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, infection etc.) favorisant le vieillissement cellulaire. Ils seraient impliqués dans la prévention des maladies cancéreuses.

Les défenses antioxydantes des polyphénols sont d'une importance capitale s'agissant de protéger les tissus nerveux contre les atteintes oxydatives telles que celles constatées dans la maladie d'Alzheimer.

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique [130].

L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols [131] par modulation de la polarité du solvant organique [132].

Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses. Elle pourrait également être due à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans de telles solutions [131]. La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base [132].

Ces résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont révélé que les solvants mixtes sont très efficaces à extraire les polyphénols. Selon [132] l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols. La supériorité des solvants mixtes seraient dues à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques dans les extraits obtenus par des solvants mixtes comparés à ceux obtenus par des solvants purs [133].

La macération et le soxhlet sont considérés comme étant des méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques approuvées par divers auteurs pour leurs efficacités [134]. Les ultrasons perturbent la structure de la paroi cellulaire induisant ainsi la lyse des cellules et accélérant la diffusion des molécules à travers les membranes et en brisant les membranes cellulaires. Les ultrasons sont l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant la croissance de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols [135, 136].

La teneur phénolique d'une plante dépend aussi d'un certain nombre de facteurs tels que, les conditions climatiques, le moment de la récolte, le solvant d'extraction, le type de variété, l'environnement, le type de sol et les conditions de stockage [137 - 139].

I.2.1.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FVT)

Une couleur jaune est observée après l'ajout du chlorure d'aluminium à la solution éthanolique de quercétine. Cette couleur est aussi observée dans le cas des extraits des feuilles de *Phoenix Dactylifera* L indiquant ainsi la présence de complexe par chélation des ions d'aluminium par les flavonoïdes [119].

Les résultats d'étude quantitative des teneurs en FVT des différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L sont présentés dans la figure (I.3).

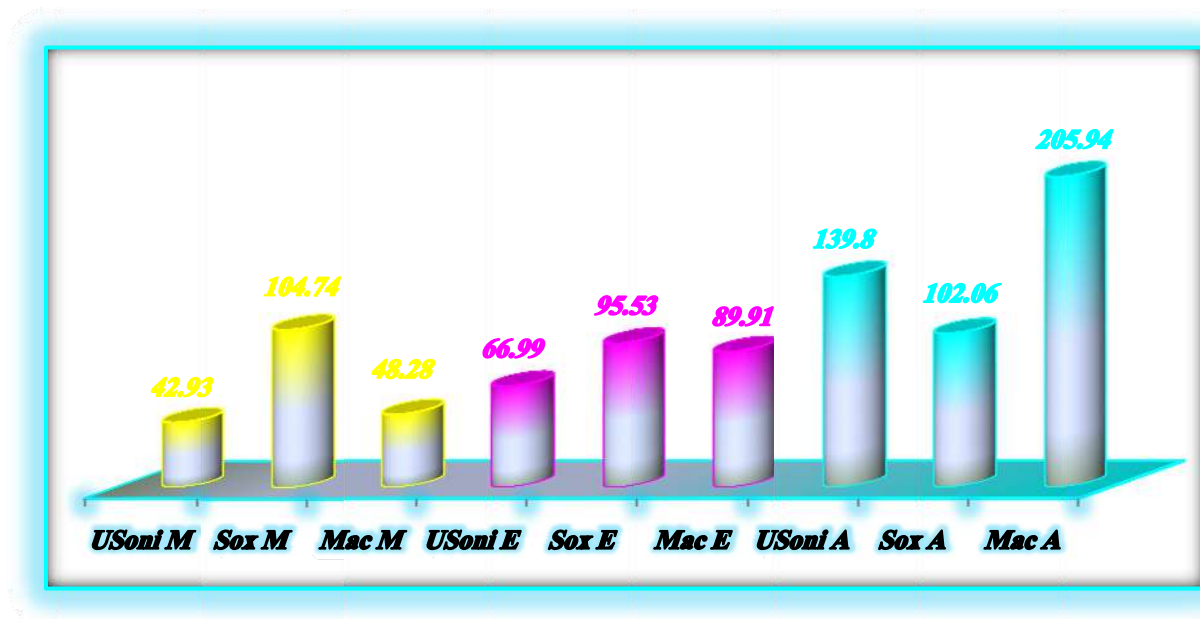


Figure (I.3) : La teneur des FVT dans les différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

D'après ces résultats, nous avons remarqué une variabilité des teneurs en flavonoïdes totaux. La teneur la plus élevée est enregistré dans l'extrait Mac A, elle est de l'ordre de $205,94 \pm 2,39$ mg ER/g Ms suivi par l'extrait USoni A avec une teneur $139,8 \pm 0,45$ mg ER/g Ms, l'extrait USoni M est représenté la teneur la plus faible environ $42,93 \pm 0,45$ mg ER/g Ms.

Les flavonoïdes, reconnus comme d'excellents anti-oxydantes [47], pourraient jouer un rôle important dans le système de défense. Ces métabolismes sont en outre connus pour d'autres propriétés biologiques diverses [8].

Les flavonoïdes sont omniprésents chez tous les végétaux. L'activité des flavonoïdes est exprimée par leur grande affinité biologique avec les polymères, les métaux lourds et surtout pour leur activité antioxydante. Ce sont les plus actifs parmi les antioxydants végétaux alimentaires [140]. Ils ont en outre une action thérapeutique sur certaines pathologies telle le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer [141, 142].

Les flavonoïdes considèrent en tant que composés phénoliques avec l'activité antioxydante la plus élevée due à leur structure chimique. Les flavonoïdes sont une partie importante du régime en raison de leur effet sur la nutrition humaine [143]. Quoiqu'il soit évident que les flavonoïdes aient été les composés phénoliques importants contribuant à l'activité antioxydante du palmier dattier, il est également possible que d'autres composés phénoliques pourraient également contribuer aux propriétés antioxydantes de ces dernières plantes [144].

Dans le cas de *Phoenix dactylifera* L, les quantités les plus élevés des composés phénoliques et flavonoïdes sont trouvés dans les extraits obtenus par l'extraction d'ultrason et l'extraction classique respectivement et la plus basse est obtenue par l'extraction de Soxhlet. Ceci peut être expliqué par oxydation et dégradation de ces composés bioactives sous la température la plus élevée et le temps beaucoup le plus long d'extraction par Soxhlet [145]. Les espèces de la plante et la méthode d'extraction ont une influence statistiquement significative sur tout le contenu phénolique et flavonoïde dans les extraits.

Ouafi et Bounaga, (2008) ont montré que l'équipement phénolique des feuilles de palmier dattier est d'une grande diversité puisque les différentes familles phénoliques sont représentées. Les flavonoïdes, principaux polyphénols des feuilles sont essentiellement des combinaisons avec des sucres : hétérosides de la quercétine, de l'isorhamnétine comme flavonols. De la lutéoline, tricine et chrysoeriol comme flavone quand au niveau des racines, on note l'absence des flavonoïdes. Les dérivés hydroxy cinnamiques (DHCS) ont été signalés dans les feuilles en tant que composés mineurs (3 à 6 % de la composition phénolique), alors qu'au niveau des racines, ils représentent la quasi-totalité de l'extrait phénolique [146].

La composition phénolique soluble de la racine du palmier-dattier est dominée par la présence de l'acide 3- caféoyl shikimique (acide dactyliférique) et ses isomères [147]. Ces substances sont classiquement considérées comme caractéristiques de la datte [9], les acides p- coumariques, hydroxybenzoïques, férulique et sinapique constituent l'essentiel des phénols liés aux différents constituants des parois cellulaires.

I.2.1.3. Détermination de la teneur en flavanols totaux (FLT)

La méthode au trichlorure d'aluminium a été utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits. Les résultats obtenus suite au dosage des FLT des différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L sont reportés dans la figure suivante.

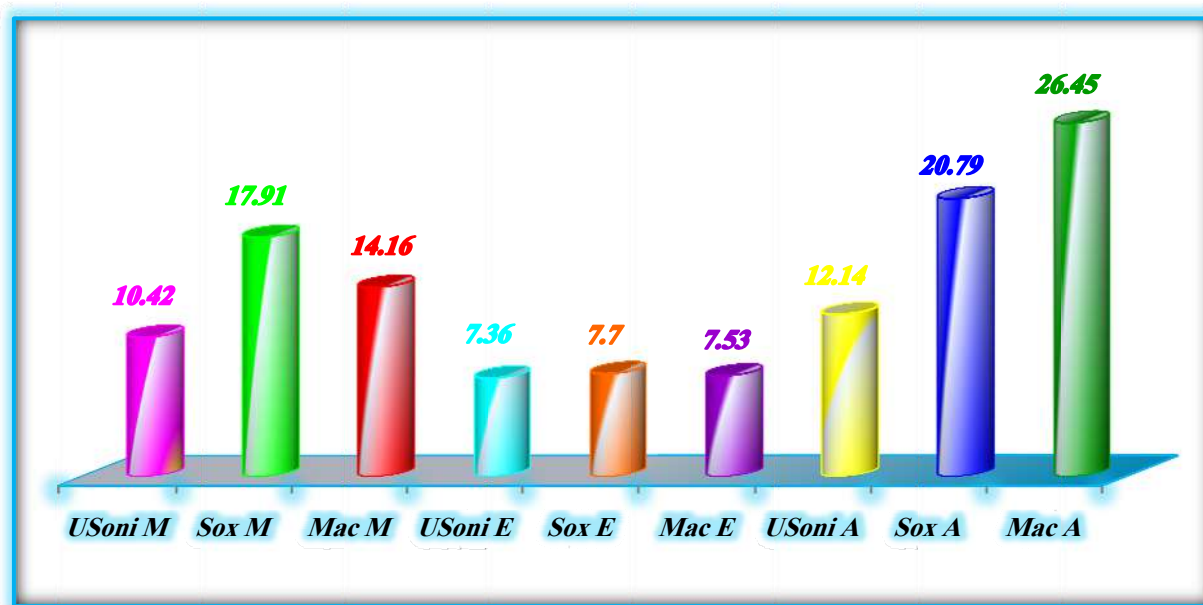


Figure (I.4) : La teneur des FLT dans les différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

Les résultats présentés dans la **figure (I.4)** montrent bien que ces composés sont présents dans tous les extraits avec des concentrations variantes (de $7,36 \pm 0,24$ à $26,45 \pm 0,33$ mg EQ/g MS) selon la méthode et le solvant utilisé pour l'extraction. L'acétone aqueuse possède la teneur la plus élevée pour la macération avec en moyenne $26,45 \pm 0,33$ mg EQ/g MS contre $20,79 \pm 0,6$ et $12,14 \pm 0,4$ mg EQ/g MS pour soxhlet et l'ultrason, respectivement. Par ailleurs, les extraits méthanolique sont enregistrés des teneurs plus élevée en flavonols ($17,91 \pm 0,11$ mg EQ/g MS) que les extraits éthanolique ($7,36 \pm 0,24$ mg EQ/g MS).

Aucun résultat du dosage des flavanols n'a été rapporté par d'autres auteurs utilisées différents solvants et méthodes à notre connaissance pour pouvoir comparer nos résultats.

Le rôle protecteur des flavonoïdes, spécifiquement flavanols et flavonols, des maladies cardiovasculaires et de cancer a précisé [148 - 150].

L'extraction des composés phénoliques à partir des plantes est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction employée, la durée et les conditions de stockage ainsi que la présence des substances interférentes, différents solvants peuvent être utilisés tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, le propanol, l'acétate d'éthyle, l'eau.....etc [151].

L'utilisation de solvants à polarité croissante permet de séparer les composés des extraits selon leur degré de solubilité et donc permet de séparer les flavonoïdes selon leurs degrés de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés) [152].

La méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [127].

Les composés contenus dans les différents extraits et qui peuvent être dissouts dans les solvants polaires sont : les flavonoïdes et coumarines glycosylés, les flavonoïdes sulfatés, les acides phénoliques et les tanins alors qu'avec les solvants apolaires on obtient les flavonoïdes aglycone hautement méthoxylés, les terpènes, les lipides et les acides gars [152].

I.2.1.4. Détermination de la teneur en tanins condensés (TC)

Les tanins condensés, ou proanthocyanidines, ont été déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Les résultats d'étude quantitative des teneurs en TC des différents extraits des feuilles de *phaenix dactylifera* L sont présentés dans la figure (I.5).

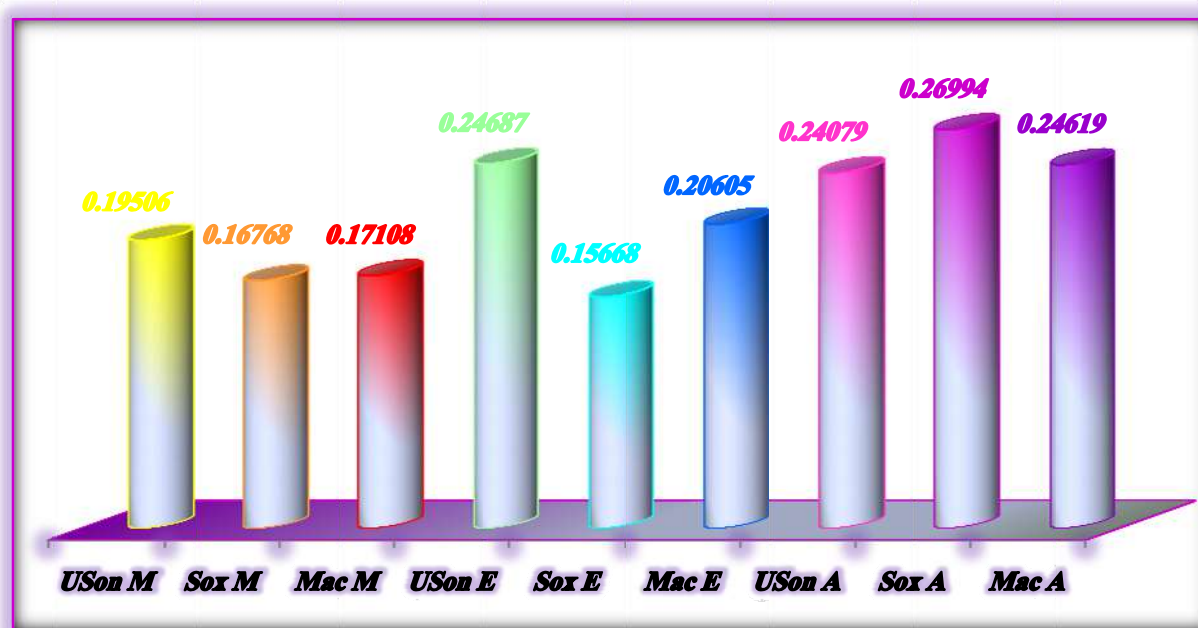


Figure (I.5) : La teneur des TC dans les différents extraits des feuilles de *phoenix dactylifera* L.

L'analyse des résultats de la teneur en tanins condensés consignés dans la **figure (I.5)** révèle que la méthode de soxhlet est plus efficace pour l'extraction des tanins ($269,94 \pm 18,24$ mg ECa/ g MS) que les autres méthodes ($195,06 \pm 17,09$ et $171,08 \pm 9,76$ mg ECa/ g MS par ultrason et macération respectivement). L'augmentation de la température favorise d'une part la diffusion et la solubilité des substances extraites, d'autre part elle détruit certaines substances fragiles [153]. Cette augmentation des teneurs en tanins condensés dans les extraits peut être expliquée par la destruction par la chaleur des polyphénols oxydases (PPO) qui baissent la teneur en polyphénols ; ainsi, la rupture de liaisons entre les polyphénols et d'autres substances (protéines, polysaccharides...) menant à l'accessibilité à ces principes actifs peut expliquer de sa part cette abondance [154].

Quel que soit le mode d'extraction, l'acétone enregistre les teneurs les plus élevées en tanins condensés ($269,94 \pm 18,24$ mg ECa/ g MS) suivie par l'éthanol et le méthanol soient en moyenne $246,87 \pm 10,23$ et $195,06 \pm 17,09$ mg ECa/ g MS respectivement. En revanche, le méthanol extrait faiblement les tanins. Selon [155], l'extraction des tanins est, en règle générale, réalisée par un mélange d'eau et d'acétone ce qui explique nos résultats. [156], ont eux aussi montré que l'acétone à 70% dans l'eau donne un meilleur rendement que l'eau ou le méthanol.

L'acétone possède la capacité de solubiliser les proanthocyanidines qui ne sont pas solubles dans le méthanol [151, 157]. Mais le problème selon [158, 153] est que l'eau et l'acétone, spécialement à hautes températures, extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins. L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires [159].

On a rapporté que des composés phénoliques, les tannins et les flavonoïdes ont des effets biologiques multiples, y compris les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [160]. Les évidences récentes suggèrent que les régimes riches en composés polyphénoliques jouent un rôle significatif contre des désordres reliés par effort oxydant en raison de leurs activités antioxydantes [161].

Au vu des résultats présentés ci-dessus, il ressort que l'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la nature de l'organe étudié. Pour cela, la sélection d'un système de solvant approprié reste l'une des étapes les plus importantes dans l'optimisation d'extraction des polyphénols, des flavonoïdes et d'autres composés antioxydants [162].

I.3. Conclusion

Les dosages par spectrophotomètre UV-visible ont montré que les extraits acétoniques des feuilles de *phaenix dactylifera* L étudiées sont plus riches en composés phénoliques (PPT, FVT, FLT et TC) que les extraits méthanoliques et éthanoliques. Ces résultats ont montré que le *phaenix dactylifera* L peut servir de sources d'antioxydants naturels. Par la suite, il serait intéressant d'identifier et de quantifier les différents composés phénoliques présents dans les extraits testés.

II. IDENTIFICATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES



Chapitre II : Identification des composés phénoliques

II.1. Analyse chromatographique des composés phénoliques par HPLC

II.1.1. Chromatogrammes des étalons

La figure (II.1) montre les profils des chromatogrammes du mélange d'étalons utilisés. Ces analyses sont enregistrées à longueur d'onde 300 nm. Le mélange est composé d'une solution qui contient six étalons : Acide gallique, acide chlorogénique, acide caféique, quercétine, vanilline et rutine. L'identification puis la quantification des composés phénoliques présents dans les extraits testés sont faits par comparaison de leurs temps de rétention et des surfaces des pics obtenus avec ceux des étalons.

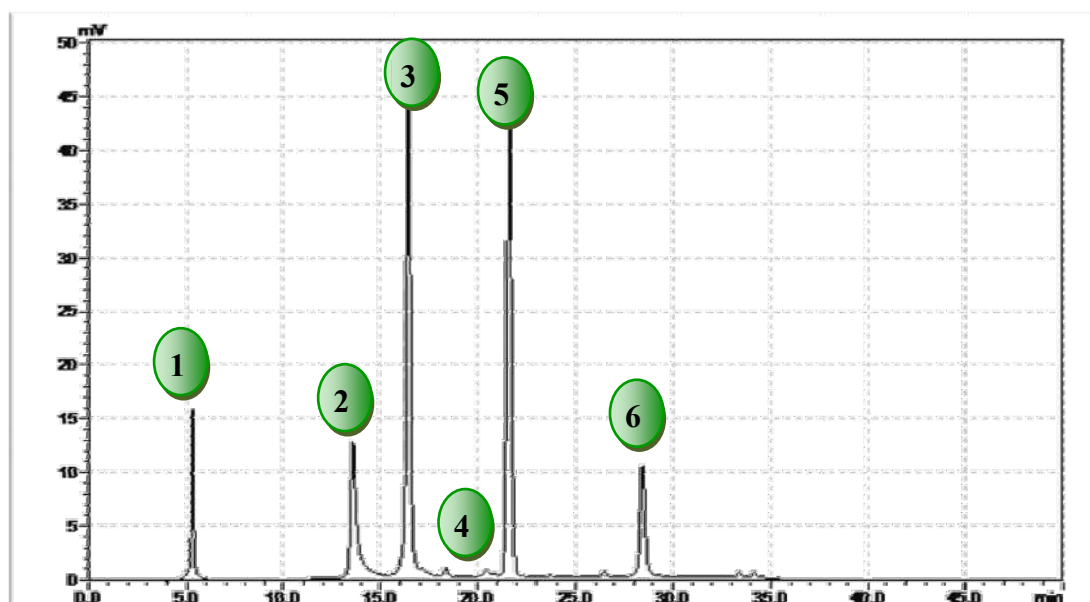


Figure (II.1) : Profil du chromatogramme du mélange des étalons.

1: Acide Gallique; 2: Acide chlorogénique; 3: Acide caféique;
4: Quercétine; 5: Vanilline; 6: Rutine.

Le tableau (II.1) résume le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage pour chaque composé phénolique.

Tableau (II.1) : Le temps de rétention, coefficient de corrélation et l'équation des courbes d'étalonnage des étalons.

Composés	Temps de rétention (min)	Equation de courbe d'étalonnage	Coefficient de corrélation
Acide gallique	5,23	$y = 23616x - 72329$	$R^2 = 0,997$
Acide chlorogénique	13,62	$y = 39728x - 18813$	$R^2 = 0,996$
Acide caféique	16,3	$y = 75728x$	$R^2 = 0,986$
Quercétine	20,37	$y = 548x - 12832$	$R^2 = 0,992$
Vanilline	21,46	$y = 82773x - 14238$	$R^2 = 0,99$
Rutine	28,22	$y = 24113x - 10605$	$R^2 = 0,996$

II.1.2. Analyse des extraits méthanoliques

Les résultats des analyses qualitatives et quantitatives des composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanoliques des feuilles de *phaenix dactylifera* L. sont regroupés dans le [tableau \(II.2\)](#). Les profils chromatographiques sont présentés dans la [figure \(II.2\)](#).

Ainsi, l'analyse des extraits des feuilles a montré que le quercétine est le composé phénolique majoritaire dans tous les extraits étudiés. Ainsi, les teneurs en quercétine varient de 35,15 µg/mg (USoni M) à 57,13 µg/mg (Sox M). L'extrait méthanolique par ultrasonique (USoni M) est riche en composés phénoliques, il contient tous les composés utilisés comme étalons. L'extrait méthanolique par macération (Mac M) montre des teneurs importantes en quercétine (48,63 µg/mg), rutine (6,39 µg/mg). L'extrait méthanolique par soxhlet (Sox M) présente des concentrations élevées de quercétine (57,13 µg/mg) et de rutine (8,12 µg/mg).

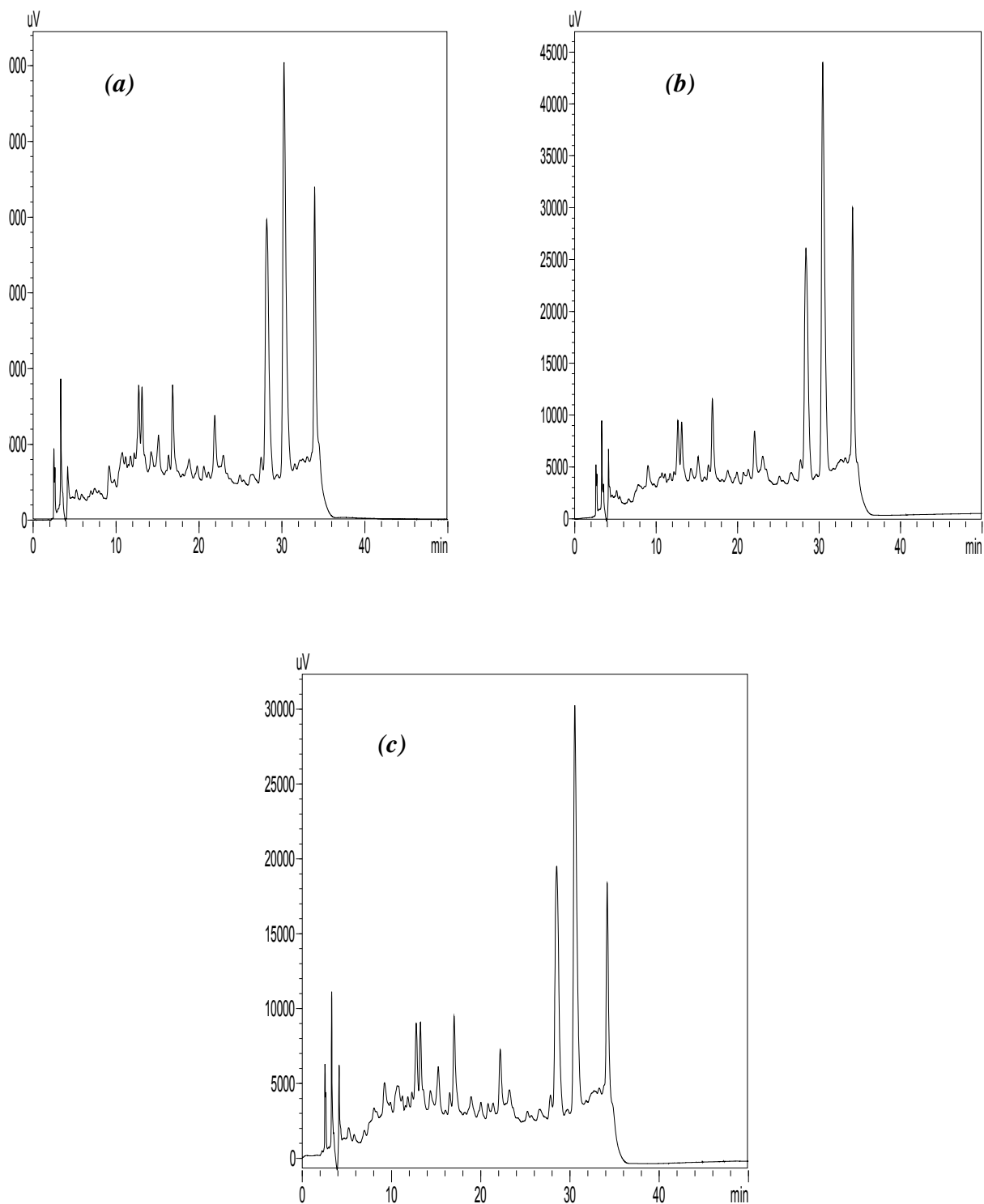


Figure (II.2) : Profil chromatogramme HPLC des extraits méthanoliques.

(a) : par macération, **(b) :** par soxhlet, **(c) :** par ultrasonique.

Tableau (II.2) : Analyse quantitative et qualitative des extraits méthanoliques des feuilles de *phœnix dactylifera L.*

Composés	Concentration (ug/mg)		
	Extrait Mac M	Extrait Sox M	Extrait USoni M
Acide gallique	0,85	1,13	1,13
Acide chloregénique	0,65	1,64	0,54
Acide caféique	0,31	0,32	0,23
Quercétine	48,63	57,13	35,15
vanilline	0,69	0,4	0,29
Rutine	6,39	8,12	6,07

II.1.3. Analyse des extraits éthanoliques

Les profils chromatographiques des extraits éthanoliques des feuilles de *phœnix dactylifera L* représentés au niveau de [figure \(II.3\)](#). Les résultats des analyses qualitatives et quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le [tableau \(II.3\)](#).

L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait Sox E, l'acide gallique (1,35 µg/mg), l'acide chloregénique (1,7 µg/mg), l'acide caféique (0,37 µg/mg), quercétine (59,52 µg/mg), vanilline (0,43 µg/mg) et la rutine (11 µg/mg), tandis que dans l'extrait USoni E, l'acide gallique (1,18 µg/mg), l'acide chloregénique (1,38 µg/mg), l'acide caféique (0,46µg/mg), quercétine (48,57µg/mg), vanilline (0,63µg/mg) et la rutine (6,2 µg/mg), dans l'extrait Mac E, quercétine (59,52 µg/mg) et la rutine (11 µg/mg) sont les composés majoritaires. D'après les résultats obtenus on remarque que quercétine est le plus représentatif dans les différents extraits.

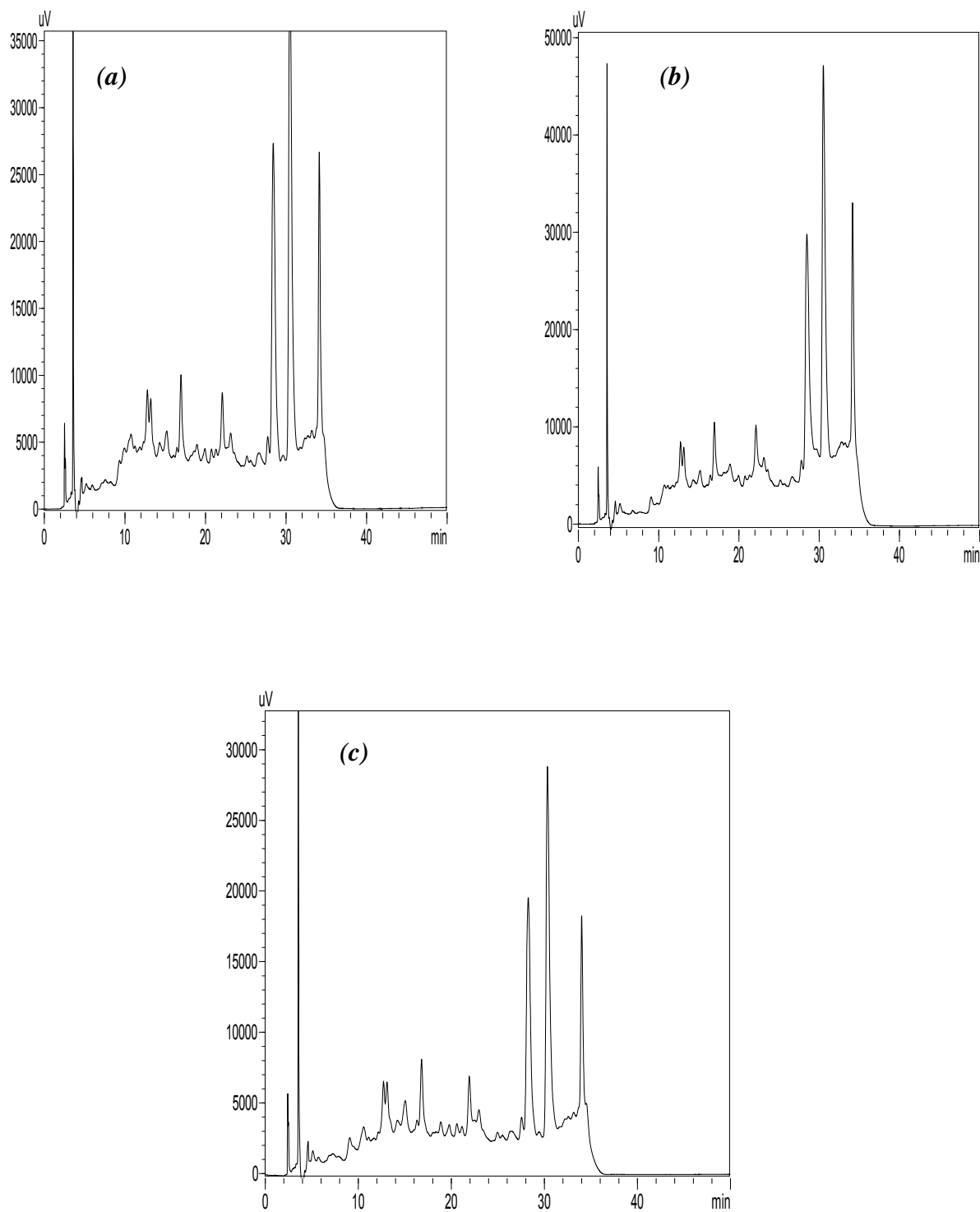


Figure (II.3) : Profil chromatogramme HPLC des extraits éthanoliques.

(a) : par macération, (b) : par soxhlet, (c) : par ultrasonique.

Tableau (II.3) : Analyse quantitative et qualitative des extraits éthanoliques des feuilles de *phœnix dactylifera L.*

Composés	Concentration (ug/mg)		
	Extrait Mac E	Extrait Sox E	Extrait USoni E
Acide gallique	1,08	1,35	1,18
Acide chloregénique	1,32	1,7	1,38
Acide caféique	0,21	0,37	0,46
Quercétine	43,32	59,52	48,57
vanilline	0,29	0,43	0,63
Rutine	7,88	11	6,2

II.1.4. Analyse des extraits acétoniques

Les chromatogrammes des analyses qualitatives et quantitatives de composés phénoliques des extraits acétoniques sont représentés dans la [figure \(II.4\)](#), et l'évaluation quantitative individuelle des composés identifiés est reprise dans le [tableau \(II.4\)](#). À travers ce tableau, on a remarqué que les composés majoritaires identifiés dans l'extrait Mac A sont : le quercétine (60,24 ug/mg) et le rutine (8,37ug/mg), dans l'extrait USoni A, les composés majoritaires sont les mêmes dans l'extrait Mac A : quercétine (8,15 ug/mg) et le rutine (6,44ug/mg), L'extrait acétonique par soxhlet (Sox A) présente de concentration élevée quercétine (92,77 µg/mg). D'après les résultats obtenus on remarque que les différents extraits contiennent tous les composés utilisés comme étalons, sauf l'acide gallique qui est non détecté.

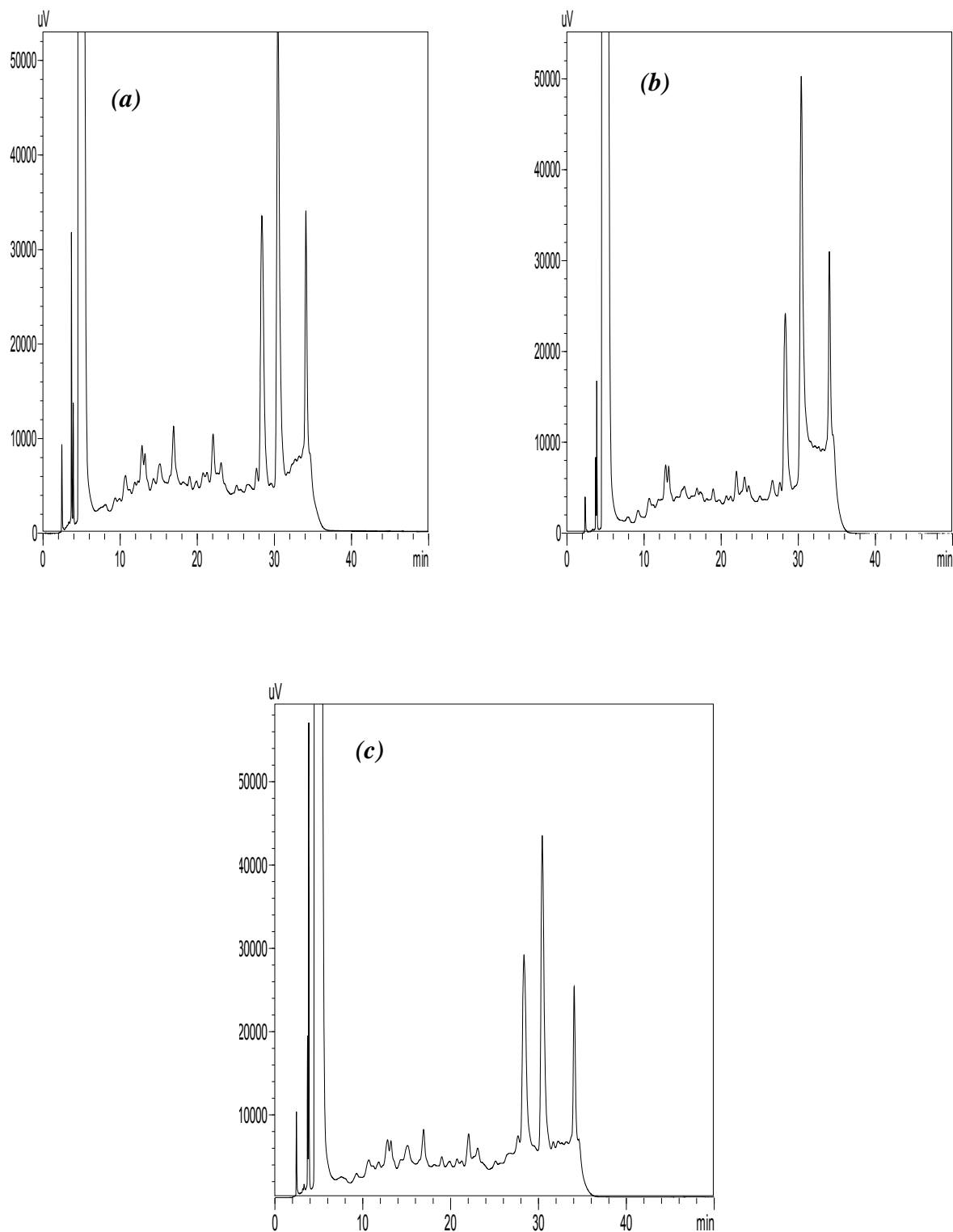


Figure (II.4) : Profil chromatogramme HPLC des extraits acétoniques.

(a) : par macération, (b) : par soxhlet, (c) : par ultrasonique.

Tableau (II.4) : Analyse quantitative et qualitative des extraits acétoniques des feuilles de *phœnix dactylifera L.*

Composés	Concentration (ug/mg)		
	Extrait Mac A	Extrait Sox A	Extrait USoni A
Acide gallique	-	-	-
Acide chloregénique	1,62	0,52	1,11
Acide caféique	1,86	0,079	1,44
Quercétine	92,77	8,15	60,24
vanilline	0,53	0,23	0,36
Rutine	10,40	6,44	8,37

II.2. Conclusion

L'étude phytochimique par HPLC des différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera L* étudiées a montré que les tous extraits présentent tous les composés phénoliques identifiés et quantifiés comparativement aux standards utilisés. Dans le chapitre suivant, nous présenterons et discuterons les résultats d'activités antioxydantes dans les extraits étudiées.

III. ÉTUDE DES ACTIVITÉS ANTI-OXYDANTES



Chapitre III : Étude des activités anti-oxydantes

III.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire [163].

La mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits de la plante testée a été réalisée par trois méthodes : la capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer.

III.1.1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits bruts est exprimée en nombre d'équivalents d'acides gallique à partir d'une courbe d'étalonnage, établie en utilisant l'acide gallique comme référence. À la différence des autres tests, la CAT permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines (C, E,.....) [164].

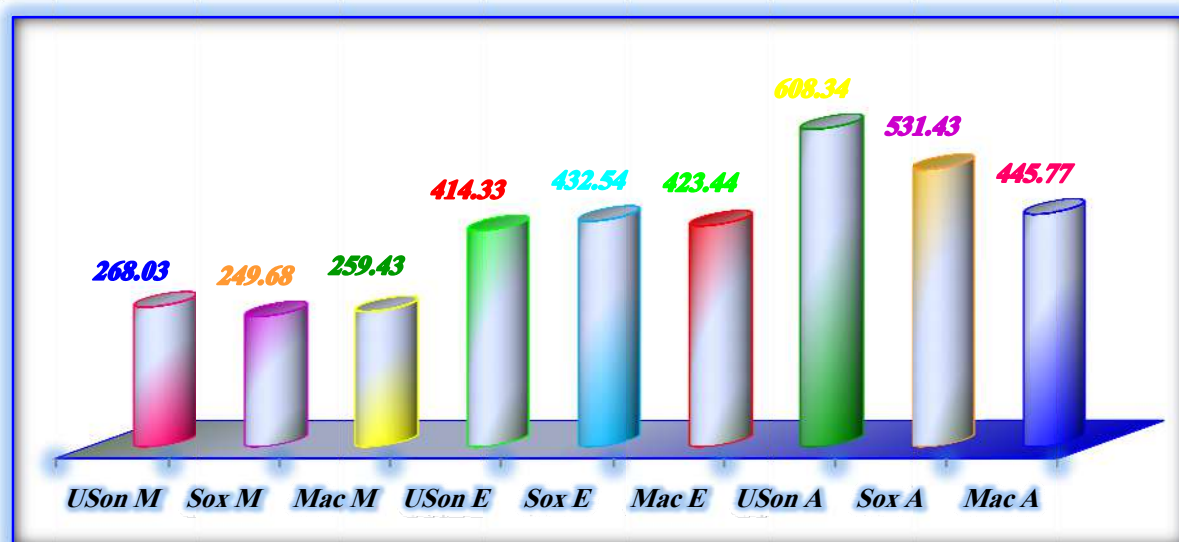


Figure (III.1) : La capacité antioxydant totale des différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits présentent une capacité antioxydante importante. Les extraits acétoniques possèdent les meilleures capacités antioxydante totale de l'ordre de $608,34 \pm 21,32$, $531,43 \pm 16,83$ et $445,77 \pm 14,43$ mg EAG/ g MS pour les extraits USon A, Sox A et Mac A respectivement, suivi par les extraits éthanoliques et méthanoliques qui sont présentés les faibles capacités antioxydantes.

On constate surtout un enrichissement des extraits par extraction par les 2 systèmes l'ultrason et soxhlet que les teneurs obtenues par macération. En effet les teneurs varient de $414,33 \pm 12,53$ à $608,34 \pm 21,32$ mg EAG /g MS pour les extraits éthanoliques (70%) et acétoniques (70%), obtenus respectivement par ultrasonique et $432,54 \pm 24,10$ à $531,43 \pm 16,83$ mg EAG /g MS pour les mêmes extraits obtenus respectivement par soxhlet. Une amélioration de la capacité antioxydante des extraits obtenus par ultrasonique a été révélée par [165] qui ont montré que les meilleures activités antioxydantes sont obtenues par la méthode d'ultrason comparée au soxhlet et à la macération.

Les résultats montrent une amélioration des pouvoirs antioxydants des extraits de *phœnix dactylifera* L et ce en utilisant les méthodes d'extraction par ultrasonique et par soxhlet par rapport à la simple macération avec une légère supériorité de l'extrait d'acétone (70%).

De plus, l'augmentation de l'activité antioxydante s'accompagne d'un net enrichissement en PPT et en FVT et une amélioration du rendement d'extraction. Même si les deux techniques ont présenté des résultats intéressants, on peut considérer que l'ultrason à l'acétone (70%) est la meilleure technique d'extraction des composés antioxydants à partir des feuilles de *phoenix dactylifera* L et ce en se basant sur la comparaison des paramètres de chaque technique. En effet, le soxhlet est une méthode assez lourde qui présente plusieurs inconvénients, y compris : (1) la nécessité d'utiliser des grands volumes de solvants organiques (2) une longue durée d'extraction et (3) la dégradation des composés ciblés en raison de la haute température et des réactions enzymatiques [166]. Alors que l'ultrason est une méthode rapide nécessitant des délais d'extraction relativement courts et une faible consommation de la quantité du solvant [167].

Beaucoup d'études précédentes ont mesuré l'effet des différents solvants dans l'activité antioxydante en utilisant différentes méthodes. [168, 169] ont indiqué que l'extrait du méthanol 70% a montré une activité antioxydante forte mesurée avec différentes méthodes en comparaison avec d'autres solvants. Cependant, [170] ont déclaré que l'extraction dans acétone/H₂O (70:30, v/v) a donné à l'activité antioxydante la plus élevée, tandis que méthanol/H₂O (50:50, v/v) a eu les moyens le plus bas. D'autre part, [171] ont mentionnés que les extraits acétoniques de la fleur de lychee ont eu une activité plus élevée dans des analyses antioxydantes que des extraits de méthanol ou d'eau.

Ces variations significatives ont indiqué que le changement de la polarité du solvant pourrait de manière significative influencer l'activité antioxydante. En outre, les états d'extraction et les procédures peuvent également changer l'activité antioxydante [169].

III.1.2. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le test de DPPH est un test le plus utilisé pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes [172].

Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage de nos extraits à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations [173].

L'activité antiradicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH à 517nm [174]. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires [175].

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), nous avons établi les profils d'activité antiradicalaire présentés dans la figure (III.2).

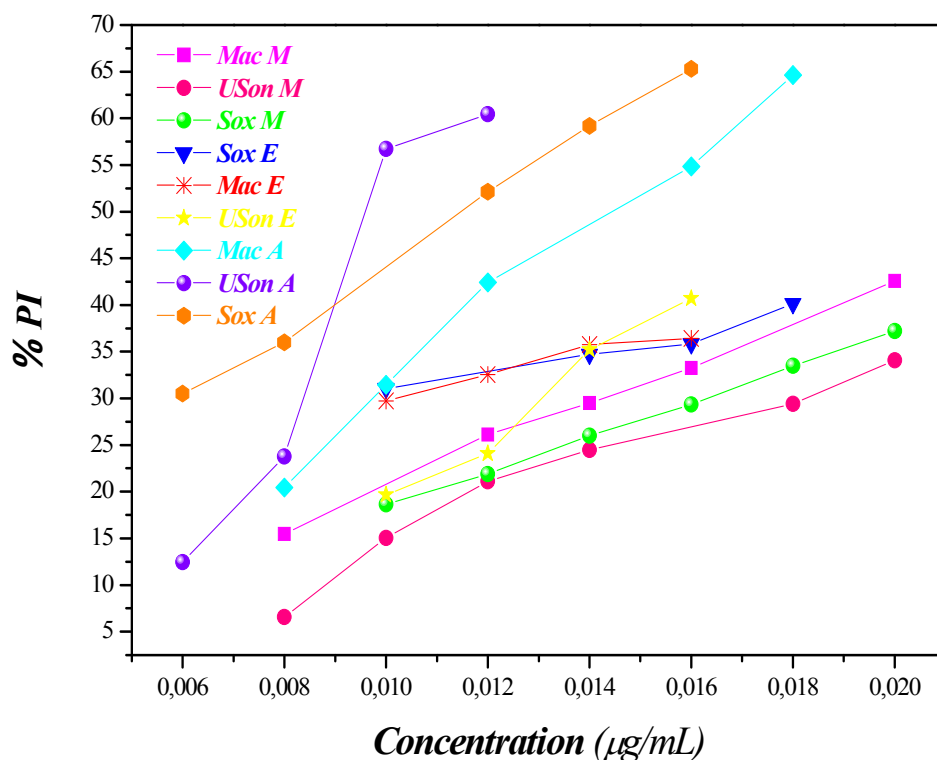


Figure (III.2) : Pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC_{50} .

IC_{50} : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de IC_{50} des différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire: $y = ax + b$.

Les valeurs des IC_{50} , présentées dans le [tableau \(III.1\)](#).

➔ Calcul des IC_{50}

La capacité antioxydante de nos différents extraits est déterminée à partir des IC_{50} , paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d' IC_{50} correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait [176]. Les IC_{50} sont donc calculés à partir des graphes représentées sur la [figure \(III.2\)](#). Un autre paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier paramètre notée: "APR" (puissance anti-radicalaire, égale à $1/IC_{50}$).

La variabilité de l'activité antiradicalaire et de la puissance anti-radicalaire chez *phœnix dactylifera* L trouvées pour tous les extraits testés sont indiquées dans le [tableau \(III.1\)](#) et dans la [figure \(III.3\)](#) sous forme d'histogramme.

Tableau (III.1) : Valeurs des IC_{50} et ARP du DPPH pour les différents extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

Extrait	Valeurs des IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	APR
Mac M	0,0233	42,918
Sox M	0,0272	36,764
USon M	0,0268	37,313
Mac E	0,0282	35,46
Sox E	0,0271	36,9
USon E	0,0184	54,347
Mac A	0,0145	68,965
Sox A	0,0115	86,956
USon A	0,0103	97,087

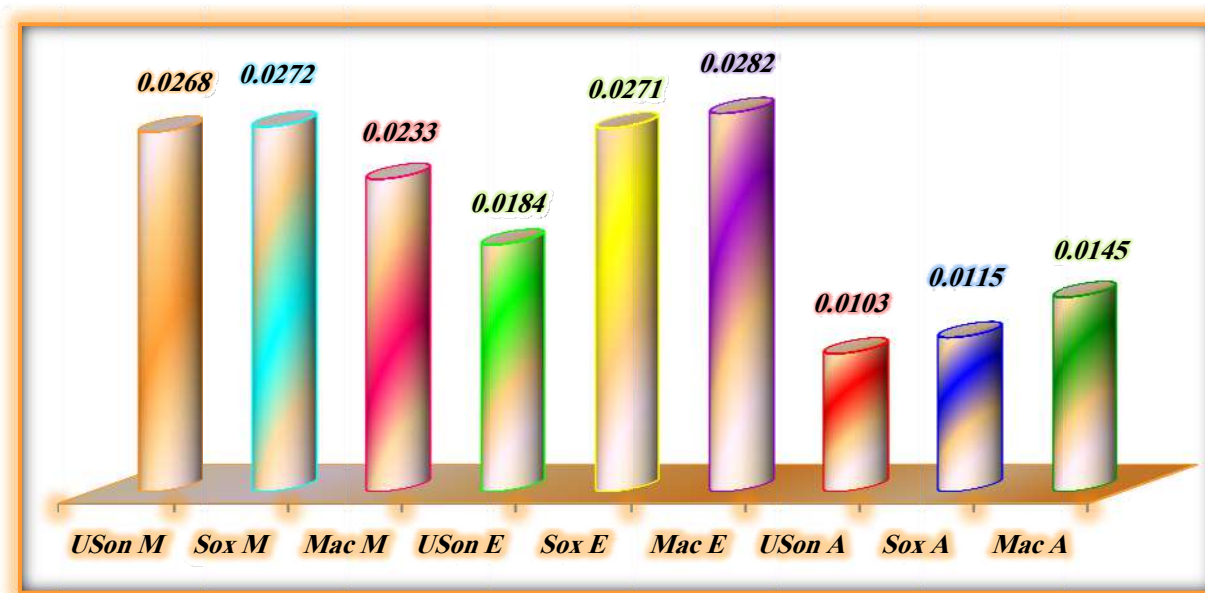


Figure (III.3) : Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en µg/mL.

Les résultats révèlent que l'activité anti-radicalaire chez *phoenix dactylifera* L est significativement influencée par la nature du solvant d'extraction. On remarque que les différents extraits présentent une forte capacité à piéger le radical DPPH avec des valeurs de l'IC₅₀ allant de 0,0103 à 0,0282 µg/ml. Par ailleurs, les extraits à l'acétone (70%) et l'éthanol (70%) ont montré les activités anti-radicalaires les plus importantes en affichant les IC₅₀ les plus faibles de l'ordre de 0,0103 et 0,0184 µg/ml, respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de [177, 178] qui ont montré que l'acétone mixte avait une forte capacité antioxydante. En effet, certains composés non phénoliques peuvent réagir avec le réactif de Folin-Ciocalteu, mais ne sont pas efficaces en tant que piégeurs de radicaux libres (l'acide citrique, le sulfate ferreux, le D-glucose).

En vue de ces différents résultats, les extraits acétoniques à 70% et éthanoliques à 70% apparaissent comme les plus doués d'activités anti-radicalaires et antioxydantes totale tout en étant riches en PPT et FVT, ces deux solvants ont été choisis comme étant les plus appropriés pour l'extraction des composés antioxydants chez *phoenix dactylifera* L. De plus, pour optimiser encore plus la capacité antioxydante de la plante, l'effet de la technique d'extraction a été analysé ; pour cela deux autres techniques couramment utilisées notamment le soxhlet et l'ultrason ont été choisis et comparées à la macération.

Afin d'optimiser encore la méthode d'extraction des composés antioxydants chez *phœnix dactylifera* L, une comparaison des activités antioxydantes des extraits obtenus par les trois techniques décrites précédemment, a été réalisée. Les variations des teneurs en activités anti-radicalaire dans les différents extraits en fonction de la méthode d'extraction sont indiquées dans le [tableau \(III.1\)](#).

Les résultats montrent que l'acétone (70%) obtenu par ultrasonique présente la plus importante capacité à piéger le radical DPPH ($IC_{50} = 0,0103 \mu\text{g/ml}$) suivi du même solvant obtenu par soxhlet ($IC_{50} = 0,0115 \mu\text{g/ml}$) et macération ($IC_{50} = 0,0145 \mu\text{g/ml}$). Ces activités anti-radicalaires sont plus élevées que celles obtenues par l'ultrason pour l'éthanol 70% ($0.0184 \mu\text{g/ml}$). Les extraits méthanolique possèdent la capacité la plus faibles par rapport les autres.

Ces résultats nous permettent d'établir cet ordre :

USon A70% >sox A70% > mac A70% >uson E70%> mac M70% > uson M70%> sox E70% >sox M70%

En accord avec nos résultats, [\[165\]](#) ont révélé que les extraits obtenus par ultrasonique sont les plus efficaces à piéger le radical DPPH comparés à ceux obtenus par macération.

La réaction chimique dans la technique DPPH implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le radical libre DPPH et la réduction de ce dernier en DPPH-H. [\[179\]](#) ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice. Cependant, le pouvoir antioxydant d'un antioxydant n'est pas nécessairement égal à sa capacité de réduire le DPPH.

Le dosage de l'activité antioxydante par DPPH montre que certains cultivars de palmier dattier ont une activité antioxydante équivalente à celle des témoins utilisés. Cette forte activité dénote que les différents extraits renferme des substances réagissantes avec le radical du DPPH, ce qui a été montré dans les tests phytochimiques effectués sur ces extraits.

L'activité antioxydante a été aussi trouvée dans les dattes de palmier dattier [\[180 - 182\]](#).

D'après la bibliographie et les enquêtes sur le terrain, le palmier dattier est utilisé comme plante médicinale [183]. En effet, il est utilisé contre les pathologies oesophago-gastro-intestinales, du système broncho-pulmonaire, de la sphère bucco-odentaire, contre les affections oculaires, comme fortifiants, analeptiques et stimulants.

D'un autre côté, et à travers la recherche bibliographique, nous notons qu'il ya une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC₅₀ et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autres études n'ont pas établie cette corrélation [184, 185]. Par ailleurs, il est bien établi que une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante [186 - 189]. En effet [135] a montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante [190, 191], due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres.

Nous pensons que l'activité antioxydante résulte de la présence des polyphénols et des flavonoïdes qui ont des propriétés médicinales. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'activité antioxydante des plantes qui ont des propriétés thérapeutiques est due à la présence de substances naturelles principalement des polyphénols [192].

III.1.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible [179]. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [193]. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants [176].

Les résultats de l'activité réductrice de l'ion ferrique des nos extraits sont représentés dans la figure (III.4).

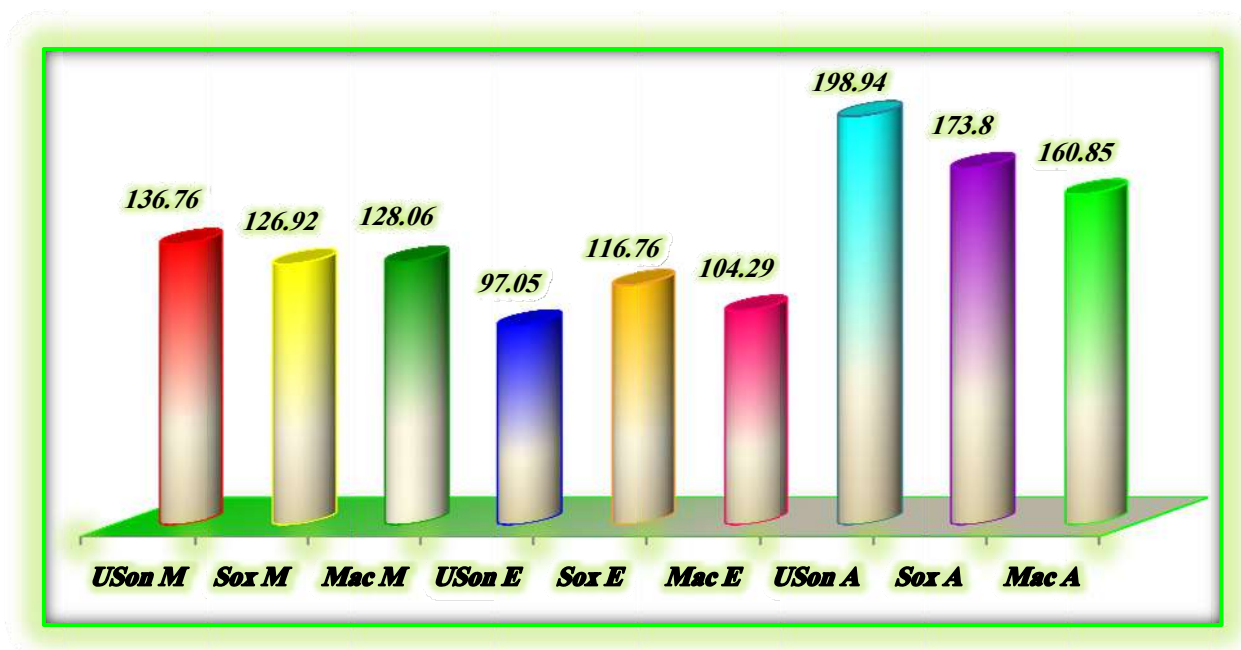


Figure (III.4) : La teneur du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *phœnix dactylifera* L.

D'après les résultats obtenus illustrés par la figure (III.4), on peut constater que tous les extraits testés possèdent une capacité dose-dépendante à réduire le fer mais avec des quantités différentes qui varient de $198,94 \pm 6,83$ mg EFeSO₄/ 100mg MS à $97,05 \pm 5,35$ mg EFeSO₄/ 100mg MS.

Les extraits ayant présentées une activité réductrice la plus élevée sont les extraits acétoniques avec des valeurs de l'ordre de $198,94 \pm 6,83$, $173,80 \pm 9,21$ et $160,85 \pm 3,71$ mg EFeSO₄/ 100mg MS pour l'extrait USon A, Sox A et Mac A respectivement, suivi par les extraits méthanoliques et éthanoliques qui sont présentés les faibles capacités réductrice.

La réduction du fer est une analyse de l'activité antioxydante rapide, reproductible et facile à exécuter. Le pouvoir réducteur de nos extraits est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons.

Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants [194]. Le pouvoir réducteur sert comme indicateur très significatif du potentiel antioxydant proposé pour tester l'activité antioxydante. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [195]. Par ailleurs, [196] indiquent qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes.

L'activité antioxydante attribuée aux polyphénols s'expliquent en partie par leur capacité à capturer des radicaux libres et de complexer des métaux.

En tant que bons donneurs d'électrons, ce type de composés montre la capacité réductrice sur la réduction de Fe⁺³ en Fe⁺². Ainsi, la plante *Phoenix dactylifera* L qui contient une quantité notable de polyphénols et de flavonoïdes peut jouer un rôle majeur dans l'inhibition antioxydante. Les résultats de cette étude ont indiqué que cette plante peut être utilisée comme source naturelle d'antioxydants, facilement accessible.


III.2. Conclusion

Cette étude montrerait le potentiel scavenger de radicaux libres des différents extraits des feuilles de *phoenix dactylifera* L étudiées et pourraient être considérées comme des sources d'antioxydants naturels. L'activité antioxydante observée qui serait due à leur teneur en polyphénols totaux déterminée par colorimétrie et par l'analyse par HPLC.

***CONCLUSION
GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES***



Conclusion générale et perspectives

e nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenu aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires.

L'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques.

Ce travail de thèse visait le choix d'une source riche en principes actifs, la valorisation des ressources végétales dans les zones arides, la mise au point et l'optimisation des conditions opératoires de l'extraction de composés phénoliques en utilisant trois techniques d'extraction et trois solvants.

Les antioxydants naturels apparaissent comme des ingrédients à fort intérêt dans les industries alimentaires pour remplacer les antioxydants synthétiques. Parmi les sources végétales, *phoenix dactylifera* L ressort comme une source encore peu étudiée et très riche en antioxydants, en particulier en tanin.

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes et flavanols par le trichlorure d'aluminium et en tannins par le test de la vanilline. Nos résultats montrent que la plus part des classes de composés phénoliques existent en concentration considérable dans les différents extraits et que l'extrait acétonique obtenu par ultrasonique plus riche par rapport aux autres extraits.

L'analyse qualitative par Chromatographie liquide de haute performance a révélé la présence des principaux composés phénoliques, parmi lesquels l'acide gallique, la catéchine, la rutine et la vanilline.

L'évaluation de l'activité antioxydante in vitro des extraits a été réalisée par différentes méthodes, à savoir : le piégeage du radical libre DPPH•, la capacité antioxydante totale et le pouvoir réducteur des ions ferriques. Nous avons constaté que les différents extraits testés présentent des activités antiradicalaires et antioxydantes intéressantes, dépendantes du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes et plus particulièrement l'extrait acétonique

obtenus par ultrasonique. De plus, une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés polyphénoliques a été établie.

En outre, les résultats obtenus en cette étude indiquent que L'extraction assistée par ultrasons a montré son efficacité pour l'extraction des composés phénoliques à partir de *phoenix dactylifera* L et l'acétone le solvant le plus efficace, par conséquent les feuilles de *phoenix dactylifera* L peut être considérées comme source naturelle des composés phénoliques connus par leur bonne capacité antioxydante.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

Elargir le panel des activités antioxydantes in vitro et in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antibactérien, anticancéreuse et anti-inflammatoire.

RÉFÉRANCES

BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- 1. Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., & Ignacimuthu, S.** (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2: p 43 doi: 10.1186/1746-4269-2-43.
- 2. Ferrari, J.** (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud.ex A. Rich. *Thèse de Doctorat, Université de Lausanne*.
- 3. Karmakar, I., Dolai, N., Saha, P., Sarkar, N, Bala, A. & Kanti, P.** (2011). Scavenging activity of *Curcuma caesia* rhizome against reactive oxygen and nitrogen species. *Orient Pharmacology Experimental medicine*; 11: pp 221–228.
- 4. Donatien, K.** (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes – extraction, identification d'alcaloïdes – caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. *Thèse de Doctorat, Université de Pamako*, p 21.
- 5. Gómez–Caravaca, A. M., Gómez–Romero, M., Arráez–Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A.** (2006). Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis*. 41: 1220 - 34.
- 6. Muanda, N. F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., Younos, C.** (2009). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. *ECAM* doi:10.1093/ecam/ nep109: pp 1 - 8.
- 7. Laouini, S.** (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). *Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider – Biskra*, p1, 22.
- 8. Makhloufi, A.** (2014). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. *Thèse de Doctorat, Université Aboubaker Belkaid*.

- 9. Bengag, A.** (2009). Caractérisation phytochimique et activité antioxydante de quelques cultivars de *Phoenix dactylifera* L. *Thèse de Magister, Université d'Oran Es-Sénia*, p1, 6, 8.
- 10. Biglari, F., Alkarkhi, A., F., M., & Easa, A., M.** (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera* L) fruits from Iran. *Journal of Food Chemistry*, 107: pp 1636-1641.
- 11. Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N., E., & Attia, H.** (2008). Date flesh : chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Journal of Food Chemistry*, 111: pp 676-682,
- 12. Sawaya, W., N., Khalil, J., K., Khatchadourian, H., A., Safi, W., M., & Mashadi, A., S.** (1983). Sugars, tannins and some vitamins contents of twenty-five date cultivars grown in Saudi Arabia at the Khalal (mature color) and Tamer (ripe) stages. Date Symposium. *King Faisal University Al-Hassa*, March 23-25, 1982.
- 13. Chaouch, N.** (2014). Utilisation des sous-produits du palmier dattier dans le traitement physico-chimique des eaux polluées. *Thèse de Doctorat, Université Hadj Lakhdar de Batna*, p 46, 47.
- 14. Munier, P.** (1973). Le palmier dattier. *Ed. Maisonneuve et Larose, Paris*, pp 211-221.
- 15. Wrigley, G.** (1995). Date palm, *Phoenix dactylifera* L. (Palmae) In: Evolution of crop plants. Smartt J. et W Simmonds N. 2nd edition. *Longman Scientific and Technical, UK*, pp 399-403.
- 16. Peyron, G.** (2000). Cultiver le palmier dattier, *G.R.I.D.A.O., Montpellier*, pp 109-129.
- 17. Djerbi, M.** (1994). Précis de phoénici-culture. *Ed .FAO*, p 191.
- 18. Gilles, P.** (2000). Cultiver le palmier dattier. *Ed. Ciras*.
- 19. Mazoyer, M.** (2002). Larousse agricole. Le monde agricole au XXI ème siècle. *Ed Mathilde. Majorel*.
- 20. Zohary, D., Hopf, M. & Weiss, E.** (2012). Domestication of plants in the Old World. 3^{ème} édition. *New York, Oxford University Press*.

- 21. Uhl W. & Dransfield, J.** (1987). *Genera Palmarum. Allen Press. Lawrence. Kansas*, p 610
- 22. Espirad, E.** (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. *Ed. Tec et Doc – Lavoisier*, pp 147 – 155.
- 23. Tirichine, H. S.** (2010). Etude ethnobotanique, activité antioxydants et analyse photochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est Algérien. *Thèse de Magister. Université d’Oran Es-Sénia*, p 106.
- 24. Gourchala, F.** (2015). Caractérisation physicochimique, phytochimique et biochimique de cinq variétés de dattes d’Algérie, *Phoenix dactylifera* L. (Deglet noor, Ghars, H’mira, Tamesrit et Tinissine). Effets de leur ingestion sur certains paramètres biologiques (Glycémie, profil lipidique, index glycémique et pression artérielle). *Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba*, p 6.
- 25. Bouguedoura, N.** (1991). Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. *Thèse de Doctorat, USTHB. Alger*, p 20 l.
- 26. Guignard, J. et al** (2001). Botanique systématique moléculaire, 2^{ème} édition, *Paris*, p 122.
- 27. Toutain, G.** (1979). Eléments d’agronomie saharienne et la recherche au développement. *Marrakech, Maroc*, pp 273-277.
- 28. Lakhdari, F.** (1980). Influence de l’irrigation sur l’évolution de la salinité dans le sol. *Mémoire d’ingénieur en agronomie, INA, Alger*, p 15.
- 29. Jahiel, M.** (1996). Phénologie d’un arbre méditerranéen acclimaté en région tropicale. Le dattier au sud du Niger et son appropriation par la société Manga. *Thèse de Doctorat, Université Montpellier II. Sc. Tech. Languedoc*, p 239.
- 30. Sakin Abdrabo, S.** (2013). Analytical methods applied to the chemical characterization and classification of palm dates (*Phoenix dactylifera* L.). *from Elche’s Palm Grove*. <http://hdl.handle.net/10045/28817>.
- 31. Bouguedora, N., Benkhalifa, A., Bennaceur, M.** (2010). Biotechnologies du palmier dattier. *Ed. IRD, Tunisie*: p 16.

- 32. Bounaga, N.** (1991). Groupe palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) : rappels biologiques et problèmes physiologiques. In *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides* de Riedacker A., Dreyer E., Pafadnam C., Joly H. et Bory G. *Edition John Libbey, Eurotext*, p 476.
- 33. Bravo, L.** (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56 (11): pp 317-333.
- 34. Boubekri, Ch.** (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. *Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider – Biskra*, p 24.
- 35. Corona, G.** (2011). Seaweed polyphenols: bioavailability and Healthy benefits. *Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction*, p 5.
- 36. Manach, C. Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L.,** (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): pp 727-747.
- 37. El Gharras, H.** (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications-A review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44(12): pp 2512-2518.
- 38. Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. & Macheix, J. J.** (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, pp 121-216.
- 39. Lobstein, A.** (2010). Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
- 40. Anderson, C. M., Halleberg, A. & Hogberg, T.** (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxydants. *Adv. drug Res.*, 28: pp 65-180.
- 41. Axelson, M., Sjovall, J., Gustafsson, B. E. & Setchell, K. D.** (1982). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298: pp 659-660.
- 42. Muanda, F. N.** (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz*, p 60.
- 43. Jakupovic, J., Paredes, L., Bohlmann, F. & Watson L.** (1988). Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochemistry*. 27(10): p 3273.

- 44. Alkurd A., Hamed, T. R. & Al-Sayyed, H.** (2008). Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 4: pp 265-274.
- 45. Jarrige, R. & Ruckebusch, Y.** (1995). Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion. *Editions Quae*, p 57.
- 46. Collin, S. & Crouzet, J.** (2011). Agence universitaire de la francophonie. Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. *Edition Lavoisier*, p 13.
- 47. Bruneton, J.** (1999). Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, Paris : *Editions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier*, pp 1120.
- 48. Ngom, N. M.** (2000). Essai clinique randomisé d'*Acacia nilotica* versus fluconazole dans le traitement de la candidose bucco oesophagienne chez les personnes vivantes avec le VIH/SIDA à Dakar. *Thèse en pharmacologie*, p 19.
- 49. Sartori-Thiel, A.** (2003). Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols. *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: p 177.
- 50. Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M.** (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125(2): pp 288-306.
- 51. Korkina, L., De Luca, C. & Pastore, S.** (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1259: pp 77-86.
- 52. Frankel, E. N., Water house, A. L. & Teissedre, P. L.** (1995). *Agric. Food. Chem.* 43: pp 221-235.
- 53. Scalbert, A. & Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphénols. *American Journal of Clinical Nutrition*. 130: pp 2073-2085.
- 54. Alidert, J., Ranjeva, R. & Boudet, M. A.** (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèses des composés phénoliques. *Physiol. Veg.* 15: pp 279-301.
- 55. Hadi, M.** (2004). La quercétine et ces dérivés: molécules à caractères pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur*, p 155.
- 56. Brouillard, R. & Délaporte, B.** (1997). *J. Am. Chem. Soc.* 1999. pp 8461-8468.

- 57. Rees, S. & Harbone, G.** (1985). The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochimie*. 24: pp 2225-2231.
- 58. Sun, G., Khtan, B., Huang, S., Whiteman, M. & Zhu, Y.** (2002). Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco*. 23: pp 1142-1151.
- 59. Ziouti, A., El Madafar, C. & Boustani, E.** (1998). Rôle des composés phénoliques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) dans sa défense contre le bayoud (*Fusarium oxysporum F.sp. albedinis*). *Université Cadi Ayad, Maroc*.
- 60. Tan, K. S., Tosont, T., Masuda, Y. & Kamisaca, S.** (1992). Involvement of cell wall-bound ferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza coleoptiles*. *Plant cell physiol*. 30: pp 103-108.
- 61. Ghazi, F. & Sahraoui, S.** (2005). Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes Tantboucht et Hamraia. *Mémoire d'ingénieur en agronomie, El Harrach*.
- 62. Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K. V. & Biro, L.** (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedensis*. 1-4: pp 119-125.
- 63. Vergé, S., Soulet, S., Lacan, F., Mas, T., Arnaudinaud, V. & Nay, B.** (1999). Les polyphénols du vin: de la chimie pour la vie. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 138: pp 75-90.
- 64. Peronny, S.** (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le Maki (*Lemure Catta*). *Thèse de Doctorat, Muséum national d'histoire naturelle, France*. p 22.
- 65. Ribereau, G. P.** (1964). Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. Veg., I.N.R.A.*
- 66. Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F. & Castelli, F.** (1995). Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine*, 19: pp 481-486.

67. Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J. & Wojdylo, A. (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, 103: pp 853-859.

68. Marfak, A. (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de depsides. *Thèse de doctorat, Université de Limoges*, p187.

69. Favier, A. (2003). Le stress oxydant intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, pp 108-115.

70. Haton, C. (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat, Université de Paris VI, France*, p 43.

71. Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220: pp 472- 477.

72. Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L. & Wul, M. J. (2003). Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn). *Journal of food and Drug Analysis*. 11(1): pp 60-66.

73. Svoboda, K. P. & Hampson, J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidants, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, U.K., KA6 5HW*.

74. Morelle, J. (1988). Peroxydes lipidiques, radicaux libres, vieillissement et lipoaminés acides: Parfums, Cosmétiques, Arômes, 79: pp 71-78.

75. Kim, D. k. & Lee, C.Y. (2004). Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44: pp 253–273.

76. Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant in vitro. "*Food antioxidants*": Ed. HUDSON B.J.F. pp 1-18.

77. Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20: pp 458-463.

78. Li, P., Hopia, A., Jaris, S., Teijo, Y. & Heikki, V. (1999). TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. *Chemistry and Nutrition*, 10: pp 123-187.

79. Glavind, J. & Holmer, G. (1967). Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 44(9): pp 539-542.

80. Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: pp 121-137.

81. Brasseur, L., Yherond, P., & Legrand, A. (1995). Pouvoir antioxydant total du plasma. *Act. Pharm. Bid. Clin.* 8: pp 239-244.

82. Cao, G. H., Alessio, H. M. & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 14: pp 303-311.

83. Maamri, S. (2008). Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. *Thèse de Magister, Université M'Hamed Bougara Boumerdes*, p 108.

84. Himed, L. (2011). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de Citrus limon : application à lamargarine. *Thèse de Magister, Université Mentouri-Constantine*, p 13.

85. Uchiyama, M., Suzuki, Y. & Fukuzawa, F. (1968). Etude biochimique de la fonction physiologique du tocopheronolactone. *Yakugazu Zasshi*. 88: pp 678-683.

86. Li, C., Oldham, C. D., & May, S. W. N. (1994). N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as alternative reductant for peptidylglycine-amidating mono-oxygenase catalysis. *Journal of Biochem.* 300: pp 31-36.

87. Magin, D .V., Lewin, G., Popov, I. N., Izmailov, Y. D. & Vladimirov, Y. A. (2000). Photochemi-luminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems, Mathematic modeling. *Lavoisier*, p 419.

88. Fao. (2002). Améliorer la nutrition grâce aux jardins potagers: Module de formation à l'intention des agents de terrain en Afrique. *Food and Agriculture Org*, p 272.

89. Galez, P. (2011). Mesures Physiques Annecy: Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible, pp 1-17.

90. Ludovic, J. (2006). De la substance à la structure: Exemples en chimie organique, pp 16-17.

91. Clark, B .J., Frost, T., Russell, M .A. (1993). UV spectroscopy techniques, instrumentation, data handling. Techniques in visible and ultraviolet spectrometry, 4, Chapman and Hall, London, UK, pp 1-143.

92. Lavallaz, P., Délétröz, R. (1994). Chromatographie, pp 1-14. <http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf> Site accédé le 02/12/2015.

93. Panaiva, L. (2006). Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. *Conférence Eurocopter*, pp 2-24.

94. Ghnimi, W. (2015). Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: Ricinus communis Ricinus et Jatropha curcas. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. *Thèse de Doctorat, Université de la Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie)*.p 50, 51.

95. Waterhouse, A. (1999). Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. *Food Anal. Chem.*, 299: pp 152-78.

96. Yogita, C., Rekha, S., Singhal. (2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17: pp 106-113.

97. Lagnika, L. (2005), Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. *Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur. Strasbourg*, p 249.

98. Abdurrahman, A., Gokhan, Z., Gokalp, O. G., Yavuz, S. C., Ahmet, D. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology*, 55: pp 290-296.

- 99. Mbaebie, B. O., Edeoga, H. O., Afolayan, A. J.** (2012). Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp 118-124.
- 100. Scalbert, A.** (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Plenum Press, New York.
- 101. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I.** (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.* 46: pp 4267-4274.
- 102. Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N.** (2001). Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91: pp 21-40.
- 103. Thomas, M., Emilie, D., Gaëtan, L. F., Marie, E. L., Claire, E.** (2012). Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*, 131: pp 754-760.
- 104. Belyagoubi Née Benhammou, N.** (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.
- 105. Durre, S., Muhammad, A. R.** (2012). Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp 547-550.
- 106. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaft und –Technologie*, 28: pp 25–30.
- 107. Sanchez-Moreno, C.** (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. 8: pp 121-137.
- 108. Gulcin, I., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R.** (2003). Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70: pp 561-563.
- 109. Molyneux, P.** (2004). The use of the stable free radical diphenyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of science technology*. 26(2): pp 211-219.
- 110. Roginsky, V., & Lissi, E. A.** (2005). Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 92: pp 235-254.

111. Selma, D., Imed, H., Saloua, F., Yassine, M., Hervé, C., Belgacem, H., Karim, H. (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of functional foods*, 4: pp 423-432.

112. Popovici, C., Saykova, I. & Tylkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* 4: pp 25-39.

113. Djahra, A. B. (2013). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. *Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar de Annaba*, p 54.

114. Rivero-Pérez, M. D., Muniz, P., González-Sanjosé, M. L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46: pp 2815–2822.

115. Naczk, M. & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: pp 95–111.

116. Hismath, I., Wan Aida, M. & Ho, C.W., (2011). Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem, (*Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*, 18(3): pp 931-939.

117. Wissam, Z., Bashour Ghada, B., Wassim, A. & Warid, K. (2012). Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3): pp 675 - 682.

118. Ribéreau-Gayon, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Ed: DUNOD, Paris*, pp 173 - 201.

119. Velickovic, D. T., Milenovic, D. M., Ristic, M. S. & Veljkovic, V. B. (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrasonic Sonochemistry*, 13: pp 150 - 156.

120. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujić, I., Bilić, M. & Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3): pp 195-199.

- 121. Caunii, A., Pribac, G., Grozea, I., Gaitin, D. & Samira, I.** (2012). Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from six varieties of *Medicago sativa*. *Chemistry Central Journal*, 6: pp 1-8.
- 122. Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, M. & Ho, C. W.** (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4): pp 1427-1435.
- 123. Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. & Larondelle, Y.** (2007). Optimisation of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Journal of Separation and Purification Technology*, 55: pp 217-225.
- 124. Tabart, J., Kevers, C., Sipel, A., Pincemail, J., Defraigne, J. O. & Dommes, J.** (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and stability during storage. *Journal of Food Chemistry*, 105: pp 1268-1275.
- 125. Laponik, B., Prosek, M. & Golc, W. A.** (2005). Comparaison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food engineering*. 71: pp 214-222.
- 126. Cowan, M. M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
- 127. Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J. & Lee, C. Y.** (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chemistry*. 51: pp 7292-7295.
- 128. Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y. & Perry, N. B.** (2006). Extraction of Phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*. 5489: pp 1-30.
- 129. Baskan, S., Oztekin, N. & Erim B.** (2007). Determination of carnosic acid and rosmarinic acids in sage by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*. 101: pp 1748 - 1752.
- 130. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. & Vidal, N.** (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: pp 654-660.

- 131. Sripad, G., Prakash, V. & Narasinga Rao, M. S.** (1982). Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *J. Biosci.* 4: pp 145-152.
- 132. Mohammedi, Z. & Atik, F.** (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter J Pharma Bio Sci.* 2: pp 609-615.
- 133. Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H. & Abdelly, C.** (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech.* 43: pp 632-639.
- 134. Liu, J. B., Chen, F., Chen, J., Xu, Q., Xia, D., Wang, Z. & Li, Y.** (2013). Magnetic signature of environmental change reflected by lacustrine sediments from the Ningwu Gonghai Lake. Shanxi. China: a record of Humid Medieval Warm Period. *Chinese Sci Bull.* 49: pp 447-464.
- 135. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. & Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331: pp 372-379.
- 136. Zaouali, Y., Bouzaine, T. & Boussaid, M.** (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48: pp 3144-3152.
- 137. Podsedek, A.** (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT.* 40: pp 1-11.
- 138. Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S. & Pasakdee, S.** (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114: pp 955-961.
- 139. Raigón, M. D., Prohens, J., Julio E. Muñoz-Falcón & Nuez, F.** (2008). Comparison of eggplant landraces and commercial varieties for fruit content of phenolics, minerals, dry matter and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: pp 370-380.
- 140. Graille, J.** (2003). Lipides et corps gras alimentaires. *Ed.Tec et Doc-Lavoisier*, p 389.

- 141. Ndhlala, A. R., Kasiyamhuri, A., Mupure, C., Chitindingue, K., Benhura, M. A. & Muchuweti, M.** (2006). Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*.
- 142. Morelle, J.** (2003). L'oxydation des aliments et la santé. *Ed. Nouvelle Imprimerie Laballery, Paris*, p 250.
- 143. Lekbir, A., Alloui-Lombarkia, O., Mekentichi, S., Noui, Y. & Baississe, S.** (2013). Optimization of Deglet-Nour date (*Phoenix dactylifera* L.) phenol extraction conditions. *International Journal of Food Science and Engineering*, 7(11).
- 144. Foroogh, B., Abbas, F. M. A. & Azhar, M. E.** (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107: pp 1636–1641.
- 145. Stojievi, S., Stanisavljevi, I., Velikovi, D., Veljkovi, V. & Lazi, M.** (2008). Comparative screening of antioxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *J. Serb. Chem. Soc.*, 73 (6): pp 597-607.
- 146. Ouafi, S. & Bounaga, N.** (2008). Les glycosides flavoniques marqueurs de cultivars algériens du palmier-dattier *Phoenix dactylifera* L. *Acta Bot. Gallica*, 155 (2): pp 307-315.
- 147. Ziouti, A., El Modafar, C., El Boustan, L. & Macheix, J.** (1996). Identification des acides cafeoylshikmiques des racines du palmier dattier, principaux composés fongitoxiques vis-à-vis du *Fusarium oryспорium* f.sp *albedinis*. *J. Phytopathology*, 144: pp 197- 202.
- 148. Hertog, M. G. L., Kromhout, D., Aravanis, C., Black-burn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S., Toshima, H., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H. & Katan, M. B.** (1995). Flavonoid Intake and Long-Term Risk of Coro-nary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Archive International Medicine*, 155(5): pp 381-386.
- 149. Ebtesam, A. S., Manal, S. T. & Hamza, M. A.** (2011). Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Various Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Fruits from Saudi Arabia. *Food and Nutrition Sciences*, 2: pp 1134-1141.

- 150. Hassimotto, N. M. A., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M.** (2005). Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruits Pulps. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (8): pp 2928- 2935.
- 151. Naczk, M. & Shahidi, F.** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 41: pp 1523-1542.
- 152. Ciulei, J.** (1982). Methodology for analysis of vegetable drugs. *Ed. Ministry of Chemical Industry. Romania.* p 67.
- 153. Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M. & Tomas, S.** (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Sciences.* 28: pp 206- 212.
- 154. Lutz, M., Henri'quez, C. & Escobar M.** (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J. of Food Compos. Anal.* 24: pp 49-54.
- 155. Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 4ème édition, Paris, Tec et Doc Lavoisier.
- 156. Seigler, D. S., Seilheimer, S., Keesy, J. & Huang, H. F.** (1986). Tannins from four common Acacia species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic botany*, 40(2): pp 220-232.
- 157. Wiley, J.** (2002). Proanthocyanidins: Extraction, Purification and Determination of Subunit Composition by HPLC. *Cur. Prot. Food Anal. Chem.* Doi: I1.4.1-I1.4.11.
- 158. Rosales, R. B.** (1999). Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. *Thèse de Doctorat. Royaume-Uni: The University of Reading*, p 400.
- 159. Chavan, U. D., Shahidi, F. & Naczk, M.** (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Journal of Food Chemistry.* 75: pp 509-512.
- 160. Farnad, N., Heidari, R. & Aslanipour, B.** (2014). Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Food Measure*; 8: pp 113–121.
- 161. Amarowicz, R.** (2007). Tannins: the new natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 109: pp 549–551.

- 162. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W. & Gu, G.** (2006b). Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19): pp 7277-7286.
- 163. Athamena, S.** (2009) .Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. *Thèse de Magister, Université El-Hadj Lakhdar-Batna*.
- 164. Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2): pp 337-341.
- 165. Annegowda, H. V., Bhat, R., Tze, L. M., Karim, A. A. & Mansor, S. M.** (2011). The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard) - an underutilized legume. *J Food Sci Technol*, 50: pp 535-541.
- 166. Santana, A. L. B. D., Maranhão, C. A., Santos, J. C., Cunha, F. M., Conceição, G. M., Bieber, L. W. & Nascimento, M. S.** (2010). Antitermitic activity of extractives from 368 Biodegradation - Life of Science three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. *Inter Biodet Biodeg*. 64: pp 7-12.
- 167. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H.** (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*.18: pp 2328- 2375.
- 168. Sahreen, S., Khan, M. R. & Khan, R. A.** (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem*. 122: pp 1205–1211.
- 169. Zhou, K. & Yu, L.** (2004). Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT – Food Sci. Technol*. 37: pp 717–721.
- 170. Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Barron, M. & Shahidi, F.** (2005b). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Agric. Food Chem*. 53: pp 7592–7599.
- 171. Liu, S. C., Lin, J. T., Wang, C. K., Chen, H. Y. & Yang, D. J.** (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chem*. 114: pp 577–581.
- 172. Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L., Lecomte, J., Pina, M. & Villeneuve, P.** (2007). Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *Oxford College of London*, 14 (5): pp 278-292.

- 173. Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng B.** (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT.*, 41: pp 597-603.
- 174. Maisuthisakul, P., Suttajit, M. & Pongsawatmanit, R.** (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*. 100: pp 1409-1418.
- 175. Majhenic, L., kergel, M. S. & Knez, Z.** (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104: pp 1258–1268.
- 176. Kholkhal, F.** (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. *Thèse de Doctorat, Université Aboubaker Belkaid*, p 111.
- 177. Trabelsi, N., Falleh, H., Jallali, I., Ben Daly, A., Hajlaoui, H., Smaoui, A., Ksouri, R. & Abdelly, C.** (2012). Variation of phenolic composition and biological activities in *Limoniastrum monopetalum* L. organs. *Acta Physiol Plant*, 34: pp 87–96.
- 178. Bourgou, S., Seraiti-Beji, R., Medini, F. & Ksouri, R.** (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 28 (12): pp 1649-1655.
- 179. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: pp 70-76.
- 180. Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E. & Kefalas, P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *Food Chemistry*, 89: pp 411–420.
- 181. Biglari, F., Alkarkhi, A. F. & Easa, A. M.** (2009). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107: pp 1636-1641.
- 182. Allaith, A. A.** (2008). Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: pp 1033-1040.
- 183. Bellakhdar, J.** (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*, p 247.

- 184. Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. & khebri, S.** (2010) activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits *CUMINUM CYMINUM* L. *Lebanese Science Journal*, 11(1): 69-81.
- 185. Mariod, A.A., Ibrahim, R.M. & Ismail, N.** (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monchema ciliatum*) and white mahlab (*Prenus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118: pp 120-127.
- 186. Hua, L., Xiaoyu, W., Peihong, L., Yong, L. & Hua, W.** (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera* L) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6): pp 67-73.
- 187. Angelov, G., Boyadzhiev, L. & Georgieva, S.** (2008). Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*, 3(1): pp 143-150.
- 188. Makris, D. P., Boskou, G. & Andrikopoulos, N. K.** (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98: pp 2963-2967.
- 189. Berrin, B., Goksel, T. & Derya, O.** (2008). Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food chemistry*, 209: pp 426-430.
- 190. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. & Bobilya, D. J.** (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13: pp 572-584.
- 191. Torres de pinedo, A., Pen alver, P. & Morales, J. C.** (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 103: pp 55-61.
- 192. Pokorny, S. B., Jason, L. A., Schoeny, M. E., Townsend, S. M. & Curie, C. J.** (2001). Do participation rates change when active consent procedures replace passive consent? *Evaluation Review*, 25(5): pp 567-580.
- 193. Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W. & Feng, C.** (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 41(3): pp 385-390.
- 194. Siddhuraju, P. & Becker, K.** (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1): pp 10-19.

195. Yang, J., Guo, J. & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin, *LWT*, 41: pp 1060-1066.

196. Yildirim, A., Mavi, A. & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: pp 4083–4089.

ANNEXES



ANNEXE I



➤ Résultats des courbes d'étalonnages des polyphénoles standards par HPLC

➤ La quercétine

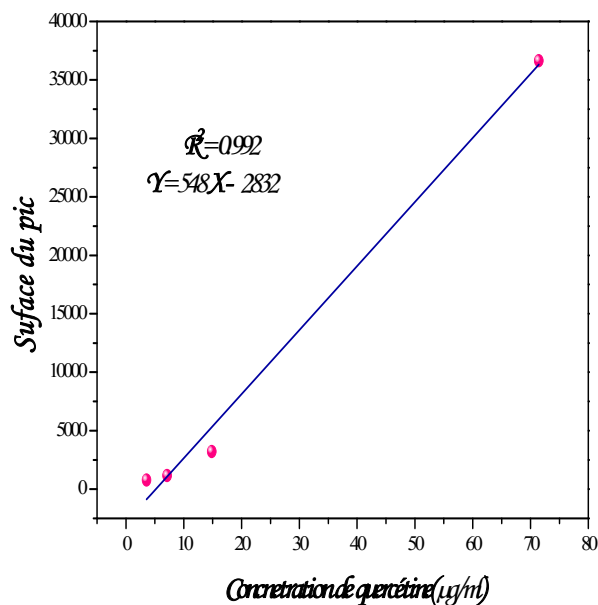


Figure (L1) : Courbe d'étalonnage de quercétine

➤ L'acide gallique

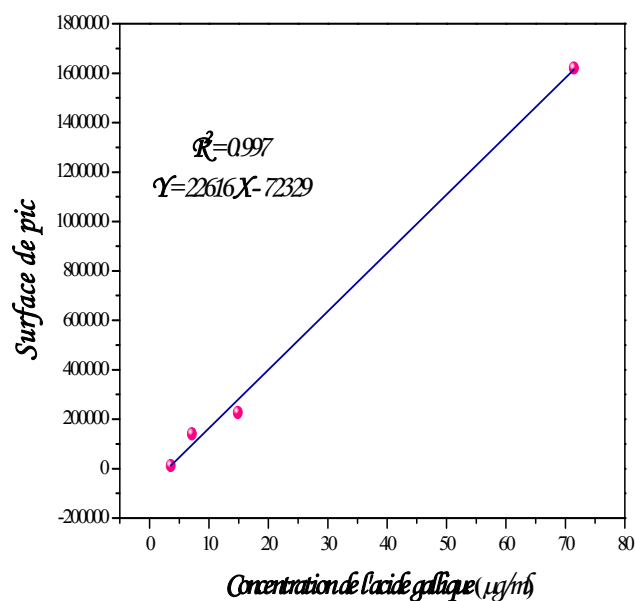


Figure (L2) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

➤ L'acide chlorogénique

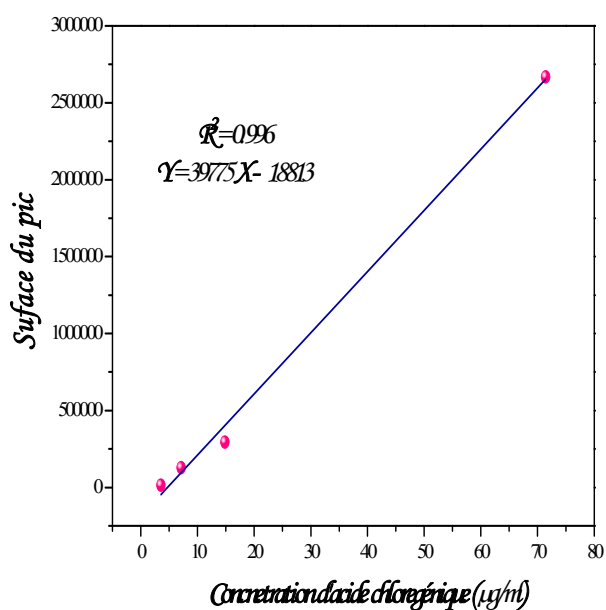


Figure (L3) : Courbe d'étalonnage d'acide chlorogénique

➤ L'acide caféique

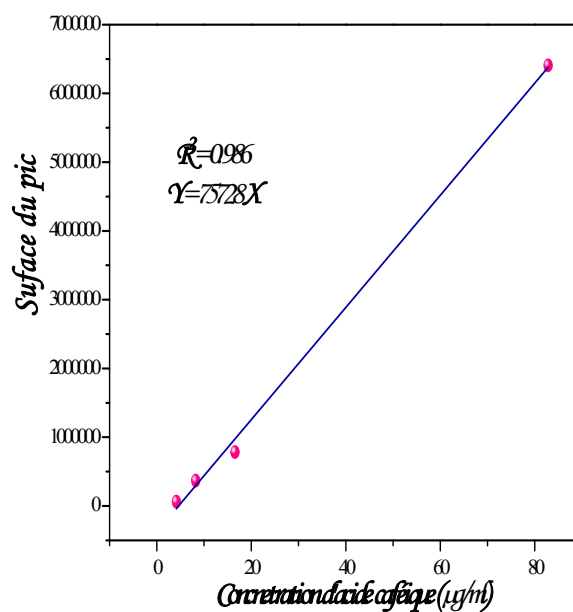
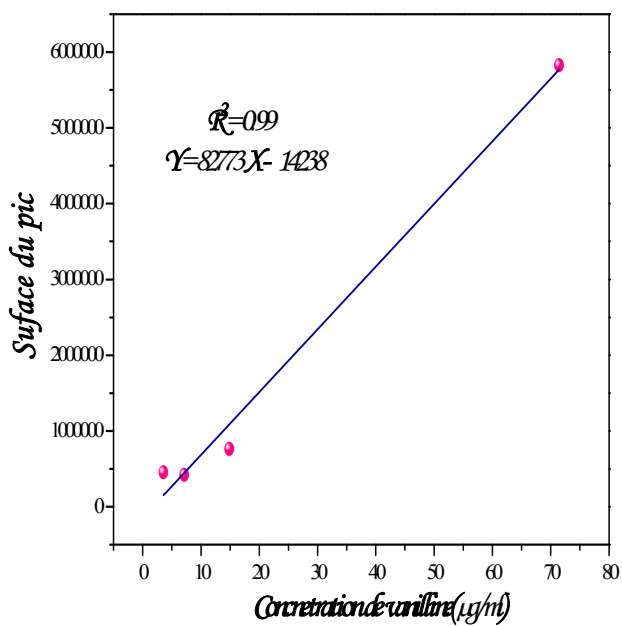
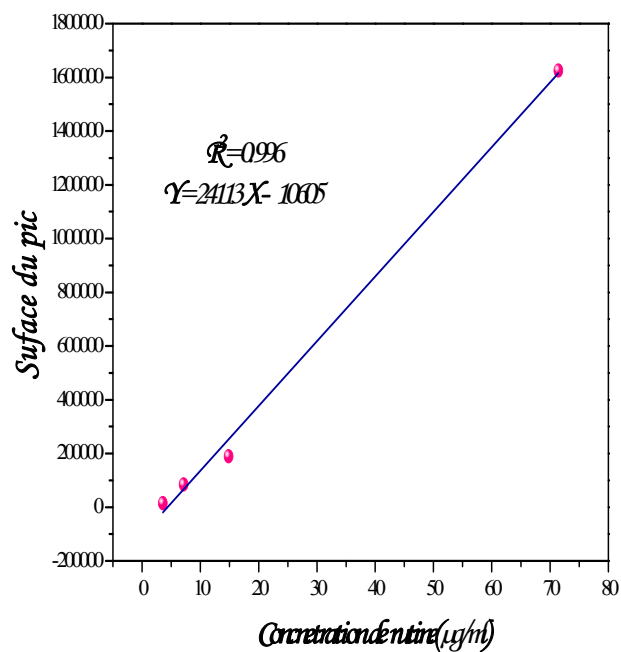
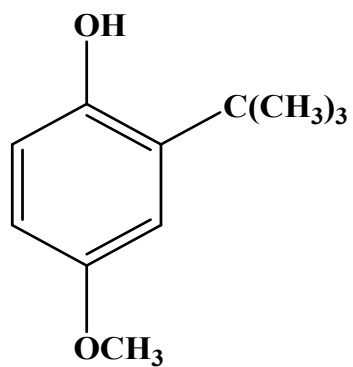


Figure (L4) : Courbe d'étalonnage d'acide caféique

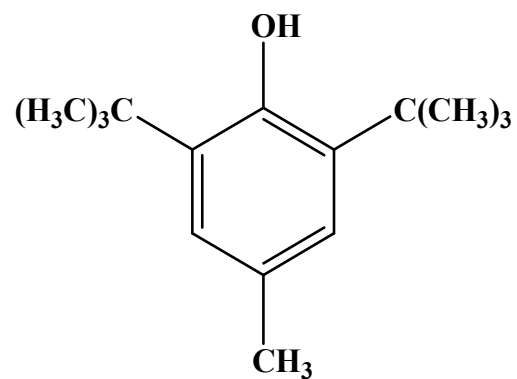
↘ *La vanilline**Figure (I.5):* Courbe d'étalonnage de vanilline↘ *La rutine**Figure (I.6):* Courbe d'étalonnage de rutine

➤ *Structure chimique de quelques Antioxydants synthétiques*

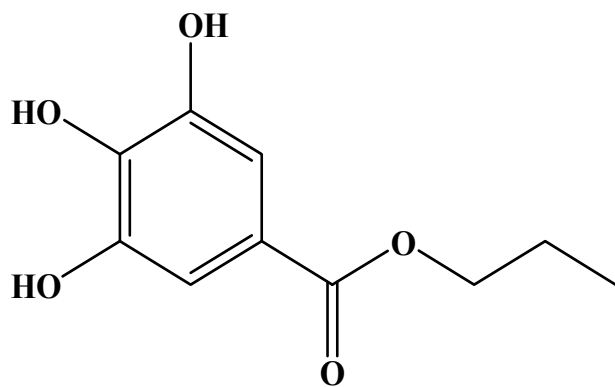
➤ *Butylhydroxyanisole (BHA)*



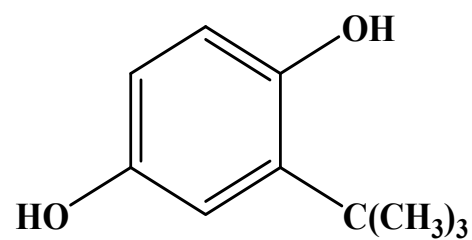
➤ *Butylhydroxytoluène (BHT)*



➤ *Gallate propylène (PG)*



➤ *Tetra-butylhydroquinone (TBHQ)*



ANNEXE II



Influence of Extraction Method on Phytochemical Composition and Antioxidant Activity from Leaves Extract of Algerian Phoenix dactylifera L.

Dia Ouahida¹, Ouahrani Mohammed Ridha², Laouini Salah Eddine²

¹University of Kasdi Merbah Ouargla, Faculty of Science applied, Department of Process engineering, PO Box 511, Ouargla 30000, Algeria.

²Laboratory of Valorization and Technology of Saharian resources, Hamma Lakhdar University, PO Box 789, El Oued 39000, Algeria

Available Online: 17th January, 2016

ABSTRACT

The genus Phoenix is one of the most widely cultivated groups of palms around the world. In this study, we have evaluated the antioxidant activity and total phenolic compounds by using various in vitro systems and analysis of marker compounds by High performance liquid chromatography (HPLC) of leaves extracts of Phoenix dactylifera L obtained by classical, ultrasonic assisted and Soxhlet method. The total phenolic content, flavonoids and tannin were determined by a spectrophotometric method. Total antioxidant activity expressed by reducing Mo (VI) to Mo (V) and DPPH radical-scavenging methods were applied to test the antioxidant activities. The results indicated that the extract obtained by the ultrasonic assisted method extraction showed the highest total contents of phenolic. The antioxidant activities also found to be highest with the ultrasonic assisted method extract followed by other extraction techniques (Soxhlet and classical method). The results suggest that the leaves of the Phoenix dactylifera L can be considered as a good source of natural antioxidant, that we can use these natural extracts as food additives in replacement of synthetic compounds

Keywords Antioxidant activity, DPPH, technique extraction, phenolic, Phoenix dactylifera L, HPLC.

INTRODUCTION

Free radicals are chemically unstable atoms that cause damage to lipid cells, proteins and DNA as a result of imbalance between the generation of reactive oxygen species (ROS) and the antioxidant enzymes¹. They are known to be the underlying cause of oxidative stress which is grossly implicated in the pathogenesis of various diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular diseases, aging and metabolic syndrome. Examples of these radicals include superoxide anions, hydroxyl, nitric oxide and hydrogen peroxide radicals². An antioxidant, which can quench reactive free radicals, can prevent the oxidation of other molecules and may have health-promoting effects in the prevention of degenerative diseases³. The interest in antioxidants has been increasing because of their high capacity in scavenging free radicals related to various diseases⁴. Many plants contain substantial amounts of antioxidants and can be utilized to scavenge the excess free radicals. The protection offered by different edible plants against oxidative stress in several diseases has been attributed to various antioxidants and vitamins. Potential antioxidant properties of the dietary phenolic compounds and flavonoids present in various fruits and vegetables have recently been recognized in a number of investigations^{5,6}. The date palm (Phoenix dactylifera L., Arecaceae) is one of mankind's oldest cultivated plants. It is highly popular worldwide,

particularly in the Middle East and North Africa⁷. Different extraction techniques, such as classical, Soxhlet and ultrasonic extraction, are widely used for obtaining extractive substances from Phoenix dactylifera L. As a novel technique, ultrasonic extraction has recently been shown to be very promising and effective for obtaining bioactive substances. The main benefits of the use of ultrasound are the increase of the extraction yield, a faster process and even the improved quality of the extracts⁸. The aim of present works is to study in vitro antioxidant activities of the acetone extracts of Phoenix dactylifera L obtained by different methods extraction, using PPM and DPPH radical scavenging assays. In addition, the total phenolic content, flavonoids and condensed tannin from plant extracts were also measured.

MATERIALS AND METHODS

Origin of plant material

The Phoenix dactylifera L were collected from southeast of Algeria, state of El Oued on December 2013. The leaves then separated from each other, washed and dried at room temperature. All these organs were ground to a powder with a basic electric grinder and stored in the dark at room temperature before use.

Extraction of plant material

Classical extraction

*Author for Correspondence

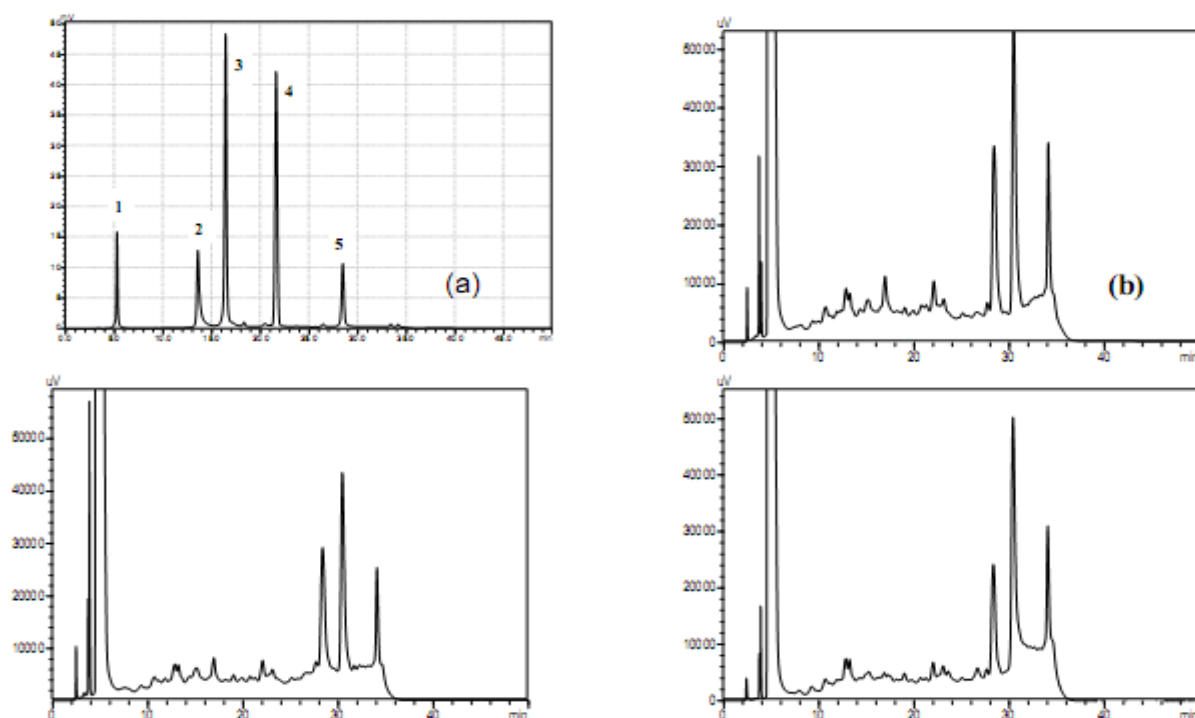


Figure 1: Chromatograms of standard mixture (a), classical extraction (b), ultrasound extraction (c) and rotary vacuum extraction (d). Peak 1: Ascorbic acid; Peak 2: Gallic acid; Peak 3: Caffeic acid; Peak 4: Vanillin; Peak 5: Chlorogenic acid.

Ground plant material (15 g) and 70% Acetone (90 ml) were put in a series of the Erlenmeyer flasks (150 ml), and the ratio of plant material mass (g) to solvent volume (ml) was 1:8. No additional stirring was applied. The extraction was performed at 25°C for 24h. At the end of the extraction cycle the liquid extract was separated from the solid residue by vacuum filtration. The solid residue was washed twice with fresh solvent (20 ml). The filtrates were collected and the solvent was evaporated in a rotary vacuum evaporator at 40°C. Extracts were stored at +4 °C in dark until use.

Ultrasound extraction

Ultrasonic apparatus from Branson (40 kHz, 1500W, dimension 49 cm×14 cm×15 cm) was used for accelerated extraction. A beaker was partially submerged in an isothermal water bath to maintain the extraction temperature at 25°C. Fifteen grams (15 g) leaves were then extracted with 70% Acetone (90 ml) for 60 min. The extract was filtered through Whatman paper on a Büchner funnel by vacuum; the solids were washed with an additional 60 ml of ethanol. The filtrate was rotary-evaporated under vacuum at 40°C to dryness. The crude extracts were dried in a vacuum oven at 40 °C. Extracts were stored at +4°C in dark until use.

Soxhlet extraction

The ground plant material (15 g) and 70% Acetone (90 ml) were taken into the Soxhlet apparatus, and were extracted for 6 hours. Previously, we found that the yield of extractive substance was not increased after that time. The liquid extract was evaporated under vacuum at 40 °C to constant mass. Extracts were stored at +4 °C in dark until use.

Evaluation of antioxidant activity

Determination of total antioxidant activity

The total antioxidant activity of the extracts was estimated by the phosphomolybdenum method. This method was based on the reduction of MO (VI) to MO (V) by the extract and the formation of a green phosphate/MO (V) complex at acid pH⁹. An aliquot of 0.2 mL of the sample solution was mixed with 2.0 mL of the reagent solution (600 mM sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). The reaction mixture was incubated at 95°C for 60 minutes and absorbance was

measured at 695 nm against a blank contained 2 mL of reagent solution. Total antioxidant activity was expressed equivalent to gallic acid¹⁰.

DPPH radical scavenging activity

The radical scavenging activity using free-radical DPPH assay was carried out using the spectrophotometric method¹¹. An aliquot (1mL) of each extract was added to 2 mL of daily prepared acetone DPPH solution (0.1mM). The mixture was shaken gently and left to stand at room temperature in the dark for 15min. Thereafter, the absorbance was read at 515 nm. The scavenging activity was measured as the decrease in absorbance of the samples versus DPPH standard solution. Results were expressed as radical scavenging activity percentage (%) of the DPPH radical according to the formula:

$$\% \text{DPPH radical scavenging} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

Where A_0 is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the sample. The effective concentration having 50% radical inhibition activity (IC_{50}), expressed as mg extract/mL, was determined from the graph of the free radical scavenging activity (%) against the extract

Table 1: Total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents of different extract of *Phoenix dactylifera* L.

phytochemical	Method		
	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction
phenols	484.44 ± 4.38	625.17 ± 11.82	528.81 ± 29.55
flavonoids	205.94 ± 2.39	139.8 ± 0.45	102.06 ± 1.90
tannins	246.19 ± 21.34	240.79 ± 20.37	269.94 ± 18.24

Values are expressed as means ± SD of triplicate measurements.

Table 2: Total antioxidant activity and capacity (PPM and DPPH assays) of different extract of *Phoenix dactylifera* L.

Method	Antioxidant activity	
	PPM (mg AAE/g DW)	DPPH. IC ₅₀ (µg/ml)
Classical extraction	445.77 ± 14.43	0.0144 ± 0.0002
Ultrasound extraction	608.34 ± 21.32	0.0104 ± 0.0001
Soxhlet extraction	531.43 ± 16.83	0.0132 ± 0.0004

Values are expressed as means ± SD of triplicate measurements.

concentration¹². All results are means ± SD.

Phytochemical investigation

Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic contents in all organs were determined by the Folin-Ciocalteu method¹³. Diluted acetone extracts (0.2 ml) was mixed with 1 ml of (10%) Folin-Ciocalteu reagent. After 5 min, 0.8 ml of 7.5% sodium carbonate solution was added to the mixture and incubated for 30 min at the 27±2 °C. Absorbance was measured at 765 nm on spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). Total phenolic content was standardized against gallic acid and expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram of the sample¹⁴.

Determination of total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content in extracts was determined spectrophotometrically¹⁵. Briefly, 1 mL of 2% aluminum trichloride (AlCl₃) acetone solution was mixed with the same volume of extract solution. The absorbance values of the reaction mixtures were determined at 415 nm after 10 min duration against a blank. Rutin was used as the standard and the total flavonoids content of the extracts was expressed as mg rutin equivalents per gram of extract (mg RE g⁻¹ extract)¹⁶.

Determination of condensed tannin content (CTC)

CTC was determined by a miniaturised procedure¹⁷. Firstly, a 10 µl acetone solution of samples, catechin or blank were introduced in wells. After wards a 4% vanillin acetone solution (120 µl) was added, followed by addition of concentrated HCl (60 µl). The red mixture was allowed to stand for 15 min and the absorbance was measured at 500 nm using a microplate spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan). Results were expressed in mg of catechin equivalents/g of dry extract (mg CE/g). All samples were analysed at least three times¹⁸.

HPLC analysis

The composition of the extracts was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC)¹⁹. We used a Shimadzu (LC 20A, Japan). System comprised of a 2LC-10AT pump (A&B), a CTO-20A column oven, a SPD-20A UV-DAD detector and CBM-20A interface. A LC-18 column (150 mm x 4.6 mm i.d. x 5 mm) was employed. Samples were injected. The components of the samples were separated by gradient elution at at 30 °C. The mobile phases were: A, 98:2 (v/v) acetic acid, and B, acetonitrile

and the elution gradient was: 0–5 min, 5% B; 10 min, 10% B; 11 min, 20% B; 20 min 20% B; 30 min 40% B; 40 min 50% B; 50 min 80% B. The flow rate was 1 ml/min and the detection wavelength was 300 nm. Phenolic compound standards Ascorbic acid, Chlorogenic acid, Vanillin, Caffeic acid and Rutin were dissolved in solvents extraction and used for identification of the phenolic acids present in different extracts of *Phoenix dactylifera* L. Peak identification in HPLC analysis was achieved by comparison of retention time and UV spectra of reference standards. Quantification of individual phenolic compounds in the extracts was done using the peak area of reference compounds and reported as mg/g of extract.

Statistical analyses

The data obtained in this study were expressed as the mean of three replicate determinations plus or minus the standard deviation (SD). Statistical comparisons were made with Student's test. P values <0.05 were considered to be significant.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, three extraction methods were used to evaluate the total phenolic contents, total flavonoids, condensed tannin contents and antioxidant activity of leaves extracts from *Phoenix dactylifera* L. Among the different solvent extraction methods, successive Soxhlet extraction could provide comparable or even better results than the maceration and ultrasonic assisted for extracting phenolic compounds and showed a significant antioxidant activity over the other two methods. Nowadays, several novel extraction techniques such as sonication and microwave-assisted have been developed and employed along with conventional extraction techniques for the extraction of bioactive compounds and nutraceuticals from plants²⁰.

Total phenolic, flavonoid and condensed tannin contents. Phytochemicals are increasingly accepted as health promoting, maintaining and repairing agents in cells, tissues, or the whole human body. The phytochemicals that are frequently associated with human health are polyphenols, carotenoids and tocopherols. Polyphenols are the major secondary metabolites in most plants reported to possess antioxidant and free radical scavenging activity. There are several studies on dietary polyphenol use to

Table 3: Constituents content analysed by HPLC.

Method	Ascorbic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Chlorogenic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Caffeic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Vanillin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Rutin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Classical extraction	190	1.62	1.86	0.53	10.40
Ultrasound extraction	190	1.11	1.44	0.36	8.37
Soxhlet extraction	200	0.52	0.079	0.23	6.44

Values are mean \pm standard deviation of three separate determinations (n=3). All results are significantly at $p < 0.05$

decrease the risk of coronary heart disease¹⁶. Phenolic compounds, tannins and flavonoids have been reported to have multiple biological effects, including antioxidant and anti-inflammatory properties²¹. Recent evidences suggest that diets rich in phenolic compounds play a significant role against oxidative stress related disorders because of their antioxidant activities²². The total phenolic, flavonoid and tannin contents in the Phoenix dactylifera L extracts are summarized in Table 1.

Results of the total phenolic content showed that maximum phenolic content was obtained with ultrasound extraction (625.17 mg GAE/g of fw) and the minimum phenolic content was obtained with Classical extraction (484.44 mg GAE/of fw).

Total flavonoid content (TFC) of different extracts was measured using aluminum chloride colorimetric methods (Table 1). The results showed that the TFC of Phoenix dactylifera L varied considerably from 102.06 to 205.94 mg in terms of rutin equivalents/ g fw of sample. The total flavonoid in increasing order was: CE > UAE > SE. Flavonoids are considering as phenolic compounds with

highest antioxidant activity due to their chemical structure. Plant flavonoids are an important part of the diet because of their effect on human nutrition²³. Even though it is apparent that the flavonoids were an important phenolic compounds contributing to the antioxidant activity of date palm, it is also possible that other phenolic compounds could also contribute to the antioxidant properties of these plant³. In the case of both Phoenix dactylifera L the highest amounts of the total phenolic compound and flavonoids are found in the extracts obtained by ultrasound extraction and classical extraction respectively, and the lowest one is obtained by the Soxhlet extraction. This may be explained by oxidation and degradation of these bioactive compounds under higher extraction temperature and the much longer extraction time of the Soxhlet extraction²⁴. The plant species and the extraction method have a statistically significant influence on the total phenolic and flavonoid content in the extracts. The analysis of the results of tannins condensed consigned in table 1, reveals that the Soxhlet extraction is more effective for the extraction of the tannin (269.94 mg Ca/g of fw) than the other techniques extraction (classical extraction and ultrasound extraction respectively). The increase in the temperature supports on the one hand the diffusion and the solubility of the extracted substances; on the other hand, it destroys certain substance fragile²⁵. This increase in the contents of tannin condensed in this extract can be explained by the destruction by the heat of the polyphenols oxidases (PPO which lower the content polyphenols; thus, the rupture of connections between polyphenols and other substances (proteins,

polysaccharides...) driving with accessibility with this active ingredient can explain its share this abundance²⁶.

Antioxidant activity

For evaluating the effectiveness of antioxidants, different methods specific to their chemical properties have been used. In this study two complementary methods were followed to evaluate the antioxidant activity due to their simplicity, stability and accuracy.

Total antioxidant activity

The phosphomolybdenum method is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compounds and the formation of green Mo (V) complexes with a maximal absorption at 695 nm^{27,28}. Using this method, the result indicated that the UAE extract of Phoenix dactylifera L had the highest antioxidant capacity with a value of 608.34 \pm 21.32 mg ascorbic acid equivalent/g dry weight; this activity may be due to the presence of phenolic compounds²⁹. The SE and CE extracts showed lower activity with values of 531.43 \pm 16.83 and 445.77 \pm 14.43mg ascorbic acid equivalents/g dried extract, respectively (Table 2).

DPPH radical-scavenging activity assay

The DPPH is a stable free radical and has been widely accepted as a tool for estimating free radical scavenging activities of antioxidants³⁰. Results in Table 2, demonstrated that all samples exhibited dose-dependent DPPH radical scavenging activities. The interaction of a potential antioxidant with DPPH depends on the extraction technique and the plant species⁸. For the plant The UAE exhibited the strongest antioxidant activities against DPPH radicals IC_{50} = 0.0105 $\mu\text{g}/\text{ml}$, followed by SE IC_{50} = 0.0115 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the lowest value in CE IC_{50} = 0.0145 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In previous investigations of Phoenix dactylifera L varieties, evaluation of the antioxidant activity and the presence of polyphenol compounds were reported³¹.

HPLC analysis

HPLC fingerprinting provides the chemical characterization of the crude extract. It is known that the polyphenols and flavonoids, being secondary metabolites, are present in several plants and can serve as markers of the crude extract. Therefore, phytochemical analysis of the crude extract was assessed by analysis³².

The constituents in the different extracts were analyzed by HPLC. Figure 1 showed the chromatograms of three extracts sample and standard markers mixture. Peaks 1, 2, 3, 4 and 5 were ascorbic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillin and rutin, respectively. The contents of these components in different extracts were determined according to the calibration curves of ascorbic acid $y = 2260.81x$ ($r^2 = 0.998$), chlorogenic acid $y = 39728x - 18813$ ($r^2 = 0.996$), caffeic acid $y = 75728x$ ($r^2 = 0.986$), vanillin

$y = 82773x - 14238$ ($r^2 = 0.99$) and rutin $y = 24113x - 10605$ ($r^2 = 0.996$), where y was the peak area and x was the concentration of analytes. The quantitative results are summarized in Table 3. As shown, ascorbic acid was the most dominant constituent and similar in the different extracts. All The extracts obtained by different techniques are contains five compounds.

CONCLUSION

In this study, in vitro antioxidant activities, phenolic, flavonoids and tannin contents of leaves extracts from *Phoenix dactylifera* L obtained by classical, Soxhlet and ultrasonic assisted methods have been evaluated. The results indicated that ultrasound extract exhibited strongest antioxidant activities and the contents of polyphenols. The highest content of flavonoids was obtained by classical extract than those by other extraction methods. This study explained the advantage of the ultrasound, compared to the conventional extraction methods both for polyphenols, was similar since polyphenols yield obtained with a lower solvent consumption and a shorter extraction time.

REFERENCES

- Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* 2008; 107(3):1000-1007.
- Mbaebie BO, Edeoga HO, Afolayan AJ. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012; 2(2): 118-124.
- Forough B, Abbas F.M.A, Azhar M.E. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry* 2008; 107: 1636–1641.
- Silva E. M, Souza J. N. S, Rogez H, Rees J. F, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 2007; 101: 1012–1018.
- Mondal SK, Saha P, Mondal NB, Mazumder UK. Free radical scavenging property of *Annona reticulata* leaves. *Oriental pharmacy and experimental medicine* 2008; 8(3):260-65.
- Bhaumik UK, Ashokkumar D, Selvan VT, Saha P, Gupta M, Mazumder UK. Antioxidant and free radical scavenging property of methanol extract of *Blumea lanceolaria* leaf in different in vitro models. *Pharmacology online* 2008; 2:74-89.
- Mohammad R.S.A, Mahnaz K, Mannan H, Maryam J, Abbas H. Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenol Contents of some Date Seed Varieties from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010, 9 (2): 141-146
- Ivana K, Milena N, Dragan V, Sasa S, Vlada V, Miodrag L. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2011; 19(3) 504-511.
- Wissal K, Fatma A, Christophe B, Hamadi A, Souhail B. Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products* 2013; 45: 262–269.
- Durre S, Muhammad A. R. Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012; 2(7):547-550
- Hanato T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1988; 36: 2090-2097.
- Selma D, Imed H, Saloua F, Yassine M, Hervé C, Belgacem H, Karim H. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of functional foods* 2012;4: 423-432.
- Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, Zhu F, Qu M, Yang Q. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Mutschulsky extracts. *Food Chemistry* 2012; 134:1885-1891.
- Yogita C, Rekha S. Singhal. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2013;17:106-113.
- Slinkard K, Singleton V.L. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 1977; 28: 49–55.
- Abdurrahman A, Gokhan Z, Gokalp O. G, Yavuz S. C, Ahmet D. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food and Chemical Toxicology* 2013;55: 290-296.
- Singleton V.L, Rossi J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1955;16(3): 144–158.
- Thomas M, Emilie D, Gaëtan L.F, Marie E.L, Claire E. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry* 2012; 131:754-760
- Tevfik Ö. Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *International Journal of Fats and Oils* 2010; 61: 86-94.
- Karabegovića IT, Sasa Stojičevića S, Veličkovićb DT, Todorovića ZB, Miodrag NČ. Lazića ML. The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products* 2014; 54:142–148.
- Famad N, Heidari R, Aslanipour B. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Food Measure* 2014; 8:113–121.

22. Amarowicz R. Tannins: the new natural antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2007; 109: 549–551.
23. Lekbir A, Alloui-Lombarkia O, Mekentichi S, Noui Y, Baïssisse S. Optimization of Deglet-Nour date (*Phoenix dactylifera* L.) phenol extraction conditions. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 2013;7(11), 685 - 688.
24. Stojievi S, Stanisavljevi I, Velikovi D, Veljkovi V, Lazi M. Comparative screening of antioxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2018; 73 (6): 597-607.
25. Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of food science* 2010; 28: 206-212.
26. M. Lutz, C. Henri quez, M. Escobar. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and analysis* 2011; 24:49-54.
27. Upadhyay NK, Yogendra Kumar M.S, Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. *Food Chemical and Toxicology* 2010; 48: 3443–3448.
28. Kaur G, Arora DS. Antibacterial and phytochemical screening of *Anythum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complementary Alternative Medicine* 2009; 9:30–39.
29. Klanckin A, Guzy B, Kolar MH, Abramovic H, Mozina SS. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulation. *Journal of Food Protection* 2009; 72:1744–1752
30. Wen X.B, Miao F, Zhou L, Zhang M, He Q.L. In vitro antioxidant activity of *Parnassia wightiana* W. extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2012, 10(3): 0190-0195.
31. Mohamed DA and Al-Okbi SY. In vitro evaluation of antioxidant activity of different extracts of *Phoenix dactylifera* L. fruits as functional foods. *Deut. Lebensm.Rundsch* 2005; 101: 305-308.
32. Sasipawan M, Natthida W, Sahapat B. Anticancer effect of the extracts from *Polyalthia eveccta* against human hepatoma cell line (HepG2). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012; 2(5): 368-374.

**SOLVENT AND TECHNIQUES EXTRACTION INFLUENCE ON
PHYTOCHEMICAL PROFILE AND FREE RADICALS INHIBITION OF PHEONIX
DACTYLIFERA L**

O. Dia¹, M. R. Ouahrani², S. L. Laouini²

¹Department of Process Engineering, Faculty of applied sciences, University of
Kasdi Merbah Ouargla, 30000, Algeria

²Department of process engineering and petrochemical, Faculty of technology, Hamma
Lakhdar University, El-Oued, 39000, Algeria

Received: 06 May 2018 / Accepted: 25 August 2018 / Published online: 01 September 2018

ABSTRACT

The main of this investigation was to compare the extraction efficiency of different methods with various solvents from Phoenix dactylifera L extracts. The antioxidant activity and total phenolic compounds of extracts were evaluated using the various method. The highest extraction yield was founded in 70% methanol. Acetone extract exhibited a higher total antioxidant activity, ferric reducing antioxidant power and DPPH radical scavenging activity. The same extract also exhibited the highest phenolic, flavonoid, flavanol and condensed tannins contents. The results revealed that the ultrasonic is most suitable for the extraction of phenolic compounds and thus showing high levels of phenolic content and very high antioxidant capacities relative to the soxhlet and maceration technique. The results propose that Phoenix dactylifera L leaves extract can be considered as a rich source of natural bioactive compounds.

Keywords: Phoenix dactylifera L, Technique, Solvents, Antioxidant activity, Phenolic compounds, HPLC.

Author Correspondence, e-mail: diaouahida39@gmail.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v10i3.25>



1. INTRODUCTION

Phytochemicals, particularly antioxidants from natural sources such as fruits, vegetables, and herbs have gained popularity due to their protective properties against several chronic diseases such as cancer and cardiovascular diseases [1,2]. Antioxidants from aromatic were studied to develop natural antioxidant for food, cosmetic, and other applications [3]. The plant is rich in phenolic compounds; the type and content of polyphenols differ substantially between different parts of the plant. Many foods containing phenolic compounds, they may be known best for the one with the highest quantity. Polyphenols are spliced into family groups based on their chemical structure [4-6]. Polyphenols contained very classes: phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans [7]. Extraction is an important step in the itinerary of phytochemical for obtained of bioactive constituents. Selection of a suitable extraction technique is also principal phase for the standardization of herbal products [8].

The extraction parameters presented the important step for the quality and quantity of antioxidant activity [9]. There are many techniques to recover antioxidants from plants, such as classical, Soxhlet and ultrasonic extraction, are widely used for obtaining extractive substances from *Phoenix dactylifera* L. Ultrasonic extraction has recently been shown to be very promising and effective for obtaining bioactive substances. The main benefits of the use of ultrasound are the increase of the extraction yield, a faster process and even the improved quality of the extracts [10]. However, extraction yield and antioxidant activity not only depend on the extraction method but also on the solvent used for extraction. The presence of various antioxidant compounds with different chemical characteristics and polarities may or may not be soluble in a particular solvent [11]. Polar solvents are frequently used for recovering polyphenols from plant matrices. The most suitable solvents are aqueous mixtures containing ethanol, methanol and acetone. Ethanol has been known as a good solvent for polyphenol extraction and is safe for human consumption. Methanol has been found to be more action in the extraction of lower molecular weight polyphenols, whereas aqueous acetone is better for extraction of higher molecular weight [12]. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is one of mankind's oldest cultivated plants, are an *Arecales* species widely distributed in North Africa and Southeast Asia. *Phoenix dactylifera* L. is an evergreen tree and

can grow in the high region of course in well-drained soils [13]. This tree involves many varieties, depending on the shape and the organoleptic properties of the fruits. It is estimated that there are more than 600 varieties of this species worldwide. The aim of present work was to examine the effects of solvents and methods on the extraction of polyphenol and in vitro antioxidant activities of the extracts from *Phoenix dactylifera* L. leaves.

2 RESULTS AND DISCUSSION

Soxhlet and maceration demand long extraction time, high volume of solvents and very experience sometimes complicated [14]. Non-conventional extraction techniques such as ultrasonic-assisted extraction (UAE) have been developed, for their advantage (improved: efficiency, extract quality, extraction time or cost and volume of solvent) over conventional systems [15,16]. These methods were employed for the extraction and isolation of phenolic compounds from plants [17]. Biologically active compounds naturally existed in very small quantity in plants extracts. The composition of herbal extracts dependent on the extraction technique, the nature of phytochemicals, particle size, composition, nature of the solvent, and the presence of interfering substances [18,19]. Therefore, it is necessary to select the suitable extraction method as well as solvent based on sample matrix properties, chemical properties of the analytes, matrix analyte interaction, efficiency and desired property.

2.1. Extraction yield and phytochemical composition

Many techniques using to obtaining phytochemicals from plants such as milling, grinding, homogenization, and extraction. Among these steps, extraction is the main step for recovering and isolating phytochemicals from plant materials. Extraction efficiency is affected by the chemical nature of phytochemicals, the extraction method used, sample particle size, the solvent used, as well as the presence of interfering substances [20]. The yield of extraction depends on the solvent with varying polarity, pH, temperature, extraction time, and composition of the sample. Under the same extraction time and temperature, solvent and composition of the sample are known as the most important parameters. The yields of crude extracts from the leaves of *Phoenix dactylifera* L., obtained by diverse methods using a different type of aqueous solvents, were calculated and the results were shown in Table 1. The recovery percentage of extractable compounds of the extracts is ranged from 10.66% for

aqueous acetone extract to 25.73% for aqueous methanol extract. This difference may be attributable to the higher solubility of extractable bioactive components such as carbohydrates and proteins in methanol than in ethanol and acetone [21,22]. Differences in the structure of phytochemical compounds also determine their solubility in solvents of different polarity [23]. Therefore, the addition of water to methanol proved that the extraction efficiency can be increased significantly. This observation is consistent with other reported results [24,25], as the water tends to increase the polarity of the extract. The combined use of water and organic solvent may facilitate the extraction of chemicals that are soluble in water and/or organic solvent [26].

Table 1. Extraction yield, Total phenolic, total flavonoid, total flavanol and condensed tannin contents of *Pheonix Dactylifera* L extracts.

Extract	Methanol			Ethanol			Acetone		
	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction
Extraction yield (%)	0.74 ± 0.05	25.73 ± 0.47	16.21 ± 0.01	12.15 ± 0.8	14.8 ± 0.54	14.95 ± 0.13	10.66 ± 0.01	15.11 ± 0.32	12.36 ± 0.12
TPC (mg GAE/g)	24688 ± 9.73	228.29 ± 4.59	271.69 ± 1.37	182.2 ± 2.9	187.19 ± 3.84	172.64 ± 8.46	48444 ± 4.38	53.81 ± 29.55	62517 ± 11.82
TFC (mg RE/g)	24619 ± 21.3	240.79 ± 20.4	269.94 ± 18.24	89.91 ± 0.1	95.53 ± 0.97	66.99 ± 0.67	20594 ± 2.39	102.06 ± 1.90	139.8 ± 0.45
TFLC (mg QE/g)	14.16 ± 0.09	17.91 ± 0.11	10.42 ± 0.2	753 ± 0.3	370 ± 0.24	7.36 ± 0.24	25.45 ± 0.33	20.79 ± 0.6	12.14 ± 0.4
CTC (mg CE/g)	17108 ± 9.76	195.06 ± 17.1	167.68 ± 6.63	216.05 ± 15.8	246.87 ± 10.23	156.68 ± 10.2	246.19 ± 21.34	240.79 ± 20.37	269.94 ± 18.24

Previously Methanol, ethanol and acetone have been commonly used as solvents at different concentrations in water for extraction of phenolic content from plant materials [27, 28]. The recovery of phenolic content from the plant is influenced by the solubility of the phenolic compounds in the solvent used for the extraction process. Furthermore, the polarity of solvent plays a crucial role in increasing the phenolic compounds' solubility [29].

2.2. Total phenolic content

In the literature, several solvents are used for the extraction of phenolic compounds and often

mixed with water at a different proportion [30,31]. In general, phenolic compounds in plants are polar compounds, which usually are extracted with polar solvents such as aqueous acetone and methanol [32]. The ability of different solvents to extract phenolic compounds was compared using the method of Folin-Ciocalteu assay. The results were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/ g DW). Table 1 shows that the different results on TPP content and they were able to extract phenolic compounds, but aqueous acetone 70% was the most effective solvent as methanol and ethanol at the same concentration. Ultrasonic allows extracting the highest quantity TPP which is 625.17 ± 11.82 , followed by soxhlet 528.81 ± 29.55 and ethanol classical extraction 484.44 ± 4.38 mg GAE/ g DW.

2.3. Total flavonoids content

Total flavonoid content (TFC) of different extracts was measured using aluminum chloride colorimetric methods (Table 1). The results showed that the TFC of *Phoenix dactylifera* L. varied considerably from 42.93 to 205.94 mg in terms of rutin equivalents/ g DW of the sample. Flavonoids are considering as phenolic compounds with the highest antioxidant activity due to their chemical structure .Plant flavonoids are an important part of the diet because of their effect on human nutrition [9]. Even though it is apparent that the flavonoids were important phenolic compounds contributing to the antioxidant activity of date palm, it is also possible that other phenolic compounds could also contribute to the antioxidant properties of these plant [33]. In the case of both *Phoenix Dactylifera* L the highest amounts of the total phenolic compound and flavonoids are found in the extracts obtained by ultrasound extraction and classical extraction respectively, and the lowest one is obtained by the Soxhlet extraction. This may be explained by oxidation and degradation of these bioactive compounds under higher extraction temperature and the much longer extraction time of the Soxhlet extraction [34]. The plant species and the extraction method have a statistically significant influence on the total phenolic and flavonoid content in the extracts.

2.4. Total flavanol contents

Table 1 represents the total flavanol content (TFLC) of different extracts estimated using aluminum chloride colorimetric methods and expressed as quercetin equivalents (QE). The TFLC of *Phoenix Dactylifera* L extracts ranged from 7.36 to 26.45 mg of quercetin / g FW.

The classical extract prepared with 70% acetone showed highest TFLC when compared to other solvents and methods extracts.

2.5. Condensed tannin content

The analysis of the results of the content of tannins condensed consigned in table 1, reveals that the Soxhlet extraction is more effective for the extraction of the tannins (269.94 mg CE/g of fw) that the other techniques extraction (classical extraction and ultrasound extraction respectively). The increase in the temperature supports on the one hand the diffusion and the solubility of the extracted substances; on the other hand it destroys certain substance fragile [35]. This increase in the contents of tannin condensed in this extract can be explained by the destruction by the heat of the polyphenols oxidases (PPO which lower the content polyphenols; thus, the rupture of connections between polyphenols and other substances (proteins, polysaccharides...) driving with accessibility with this active ingredient can explain its share this abundance [36]. Whatever the method of extraction, acetone records the highest contents of tannins condensed (269.94 ± 18.24 mg CE / g DW) followed by ethanol and methanol are on average 246.87 ± 10.23 and 195.06 ± 17.09 Mg CE / g DW respectively. On the other hand, methanol extracts the tannins slightly. According to [37] the extraction of the tannins, in general, is carried out by a mixture of water and acetone what explains our results. [38] they are showed as acetone a 70% in water gives a better output than water or methanol.

2.6. Antioxidant activity

Large varieties of different antioxidants present in fruits, it is very difficult to measure the all the antioxidants of plant extract through a single method. Different methods have been established to measure the antioxidant capacity of different plant materials [39, 40]. Table 2 shows the antioxidative activity of *Phoenix dactylifera* L. leaves extracts in different solvents measured by different methods.

Table 2. Total antioxidant activity, IC₅₀ in DPPH radical scavenging activity and Ferric reducing/antioxidant power of different extract of Pheonix Dactylifera L.

Extract	Methanol			Ethanol			Acetone		
	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction
PPM	259.43 ± 1.1	288.68 ± 3.97	249.68 ± 6.12	423.44 ± 4.38	414.33 ± 12.53	42.54 ± 24.01	445.77 ± 14.43	608.34 ± 21.32	511.43 ± 16.83
DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	0.0233 ± 0.0002	0.0272 ± 0.0004	0.0268 ± 0.0001	0.0282 ± 0.0002	0.0271 ± 0.0005	0.0184 ± 0.0003	0.0144 ± 0.0002	0.0104 ± 0.0001	0.0132 ± 0.0004
FRAP	128.06 ± 3.83	136.76 ± 9.72	126.92 ± 5.51	104.29 ± 2.61	97.05 ± 5.352	116.76 ± 3.54	16085 ± 3.71	198.94 ± 6.83	173.80 ± 9.21

2.7. Total antioxidant activity

The phosphomolybdenum method is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compounds and the formation of green Mo (V) complexes with a maximal absorption at 695 nm [41,42]. Using this method, the result indicated that the ultrasound extract in 70% acetone of Phoenix dactylifera L had the highest antioxidant capacity with a value of 608.34±21.32 mg gallic acid equivalent/g fresh weight; this activity may be due to the presence of phenolic compounds [43]. The soxhlet extract in methanol showed lower activity with values of 249.68±6.12 and 445.77±14 mg gallic acid equivalent/g dried extract (Table 2). An improvement in the antioxidant capacity of extracts obtained by ultrasound was revealed by [44], which showed that the best antioxidant activities are obtained by the ultrasound method compared to soxhlet and maceration. Many of the preceding studies measured the effect of various solvents on the antioxidant activity by using different methods. [45,46] indicated that the extract of methanol showed a strong antioxidant activity measured with various methods in comparison with other solvents. However, [47] declared that the extraction in acetone gave to the most raised antioxidant activity, while methanol had the means low. In addition, [48] mentioned that the acetone extracts of the flower of lychee had an activity more raised in antioxidant analyses than of the water or methanol extracts.

2.8. DPPH radical-scavenging activity assay

The DPPH is a stable free radical and has been widely accepted as a tool for estimating free radical scavenging activities of antioxidants [49]. It was one of the most widely used methods

for screening the antioxidant activity of vegetable materials and plant extract [50,51]. The interaction of a potent antioxidant with DPPH depends on the extraction technique and the plant species [10]. Table 2 shows the DPPH scavenging activities of the different extracts. For the plant The ultrasound extract in 70% acetone exhibited the strongest antioxidant activities against DPPH radicals $IC_{50} = 0.0105 \mu\text{g/ml}$, followed by soxhlet extract in 70% acetone with $IC_{50} = 0.0115 \mu\text{g/ml}$ and the lowest value in classical extract in 70% ethanol with $IC_{50} = 0,0282 \mu\text{g/ml}$.

2.9. Ferric reducing/antioxidant power assay (FRAP assay)

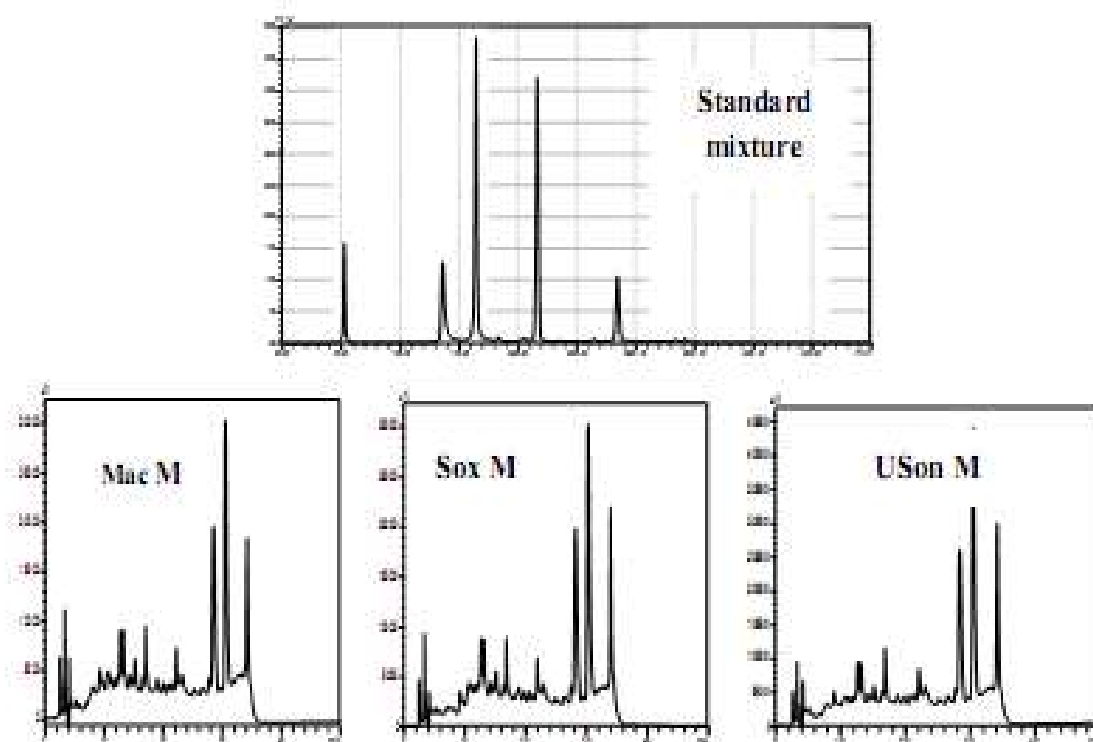
Table 2 presented the results of FRAP assay. The highest reducing power was found in ultrasound extract in 70% acetone (198.94 mg). The antioxidant activity of FRAP assay was correlated with the amount of total phenolic content. According to phenolic content ultrasound extract in 70% acetone extract showed the highest reducing activity and classical extract in 70% ethanol showed least reducing activity and they were significantly different.

2.10. HPLC analysis

HPLC fingerprinting provides the chemical characterization of the crude extract. It is known that the polyphenols and flavonoids, being secondary metabolites, are present in several plants and can serve as markers of the crude extract. Therefore, phytochemical analysis of the crude extract was assessed by analysis [52]. The constituents in the different extracts were analyzed by HPLC. Figure 1 showed the chromatograms of extracts sample and standard markers mixture. Peaks 1, 2, 3, 4 and 5 were ascorbic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, vanillin and rutin, respectively. The contents of these components in different extracts were determined according to the calibration curves and the concentration of analyses (0–80 $\mu\text{g/ml}$). The quantitative results are summarized in Table 3. As shown, ascorbic acid was the most dominant constituent and similar in the different extracts.

Table 3. Constituents content analyzed by HPLC.

Extract	Methanol			Ethanol			Acetone		
	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction	Classical extraction	Ultrasound extraction	Soxhlet extraction
Ascorbic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.26	0.45	0.31	0.2	0.51	0.39	190	190	200
Chlorogenic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.65	1.64	0.54	1.32	1.7	1.38	1.62	1.11	0.52
Caffeic acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.31	0.32	0.23	0.21	0.37	0.46	1.86	1.44	0.079
Vanillin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.69	0.4	0.29	0.29	0.43	0.63	0.53	0.36	0.23
Rutin ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	6.39	8.12	6.07	7.88	11	6.2	10.4	8.37	6.44



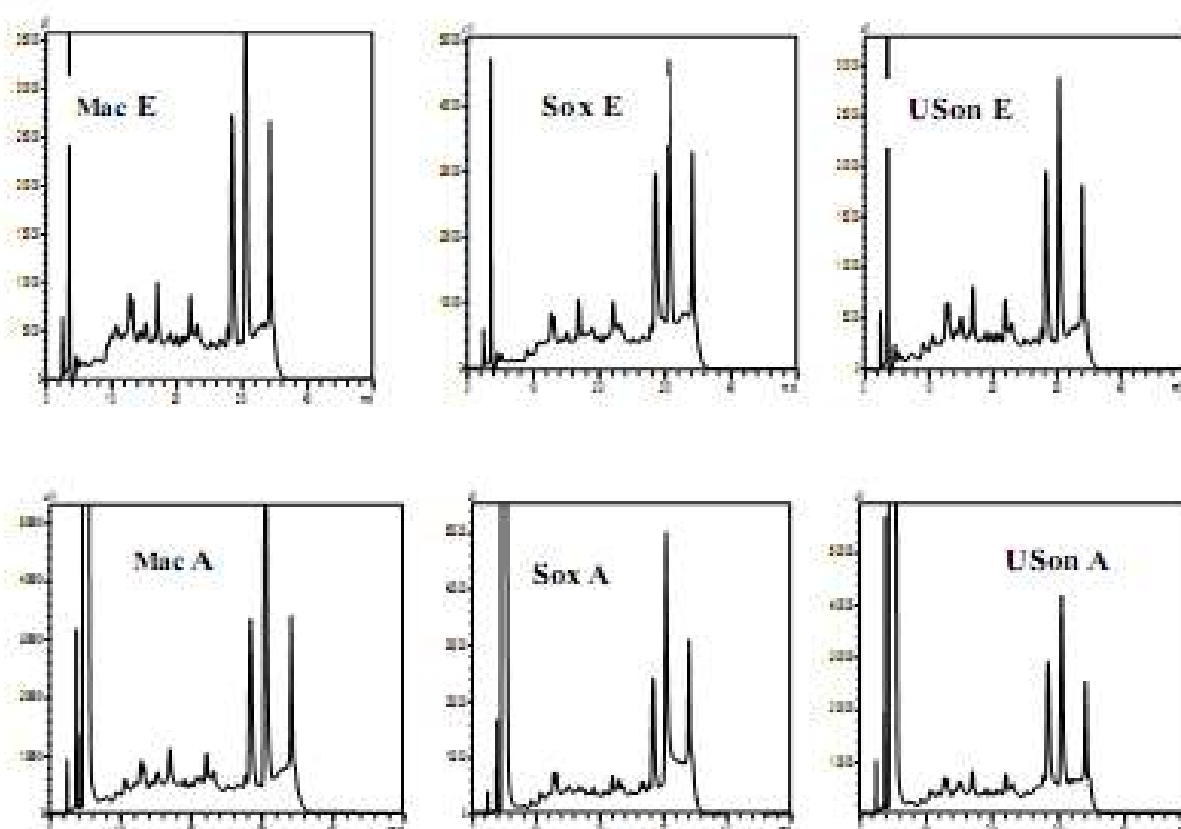


Fig.1. Chromatograms of the standard mixture and different extracts of *Phoenix Dactylifera L.* leaves. Peak 1: Ascorbic acid; Peak 2: Chlorogenic acid; Peak 3: Caffeic acid; Peak 4: Vanillin; Peak 5: Rutin

3 EXPERIMENTAL

3.1. Chemical and reagents

Folin Ciocalteu (FC) reagent was purchased from PROLABO, gallic acid, rutin, quercetin, vanillin, 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ) were purchased from Alpha Aesar (France). Sodium carbonate anhydrous, ferric chloride, aluminium chloride, sulfuric acid and hydrochloric acid were obtained from Biochem chemopharma Co (Canada). Whereas ammonium molybdate tetrahydrate and catechin, HPLC-grade methanol, ethanol, and acetone were supplied by Sigma-Aldrich.

3.2. Plant material

The *Phoenix dactylifera L.* plant used in this study were collected from southeast of Algeria, state of El Oued on December 2013. The leaves then separated from each other, washed and

dried at room temperature. These leaves were ground to a powder with a basic electric grinder and stored in the dark at room temperature before use.

3.3. Preparation of plant extracts

3.3.1. Classical extraction

15 g of powder plant material was mixed with 90 ml of 70% methanol, ethanol and acetone (1:8) separately in round bottom flasks for 24 h. Liquid extracts obtained were separated from the solid residue by vacuum filtration, concentrated using a rotary evaporator.

3.3.2. Soxhlet extraction

15 g of powder plant material was extracted successively with 70% methanol, ethanol and acetone (1:8), each 90 mL in a Soxhlet apparatus for 6 hours. All the extracts were filtered through Whatman filter paper. Then the extracts were concentrated in a rotavapor.

3.3.3. Ultrasound extraction

Ultrasonic apparatus from Ultrasons-H (40 kHz, 1500W, dimension: 15cm×50cm×14cm) was used for accelerated extraction. A beaker was partially submerged in an isothermal water bath to maintain the extraction temperature at 25 °C. Fifteen grams (15 g) leaves were then extracted with 90 ml of different solvent for 60 min. The extract was filtered under vacuum through Whatman paper, and the solvent was removed with a rotary vacuum evaporator.

3.4. Determination of polyphenol content

The total phenolic contents in each extract were determined by the Folin-Ciocalteu method [53,54]

3.5. Total flavonoids content

The total flavonoid content (TFC) of each extract was investigated using the aluminum chloride colorimetric method [55].

3.6. Total flavanol content

Total flavanol content was determined using the method of Mbaebie BO and al [56].

3.7. Condensed tannin content (CTC)

Tannin content was determined by using a method described by Thomas M [57].

3.8. Total antioxidant activity

The phosphomolybdenum method applied for estimating the total antioxidant capacity

using the method described by Durre and Muhammad [59].

3.9. DPPH radical scavenging activity

The capacity of extracts to inhibition the DPPH radical was calculated using the method described by Rivero-Pérez et al [60].

3.10. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The method described by using for determination of ferric reducing antioxidant power (FRAP) [61].

3.11. HPLC analysis

The individual component extracts were analyzed by HPLC [62]. A LC-18 column (250 mm x 4 mm i.d. x 5 mm) was employed. Samples were injected. The components of the samples were separated by gradient elution at 30 °C. The mobile phases were: A, 98:2 (v/v) acetic acid, and B. The flow rate was 0.8 ml/min and the detection wavelength was 300 nm. Phenolic compound standards Rutin, Ascorbic acid, gallic acid, Chlorogenic acid, Vanillin, Quercetin and Caffeic acid. Peak identification in HPLC analysis was realized by collation of retention time and standards reference. The mass of phenolic compounds in the extracts was done using the peak area.

3.12. Statistical analyses

The data obtained in this investigation were presented as the mean of three replicate determinations \pm the standard deviation (SD).

4 CONCLUSION

The present work, presented solvents extract effect in phenolic profile, in vitro antioxidant activities of leaves extracts from *Phoenix dactylifera* L obtained by methanol, ethanol and acetone with different technique extraction. The results indicated that ultrasound extract displays high antioxidant capacity and phenolic content. The contents of flavonoids, flavanols content, and condensed tannins of the extract were decreased: acetone > ethanol > methanol. The extraction of *Phoenix dactylifera* L with different techniques revealed ultrasound to be the finest to recover the antioxidant capacity, followed by Soxhlet, and classical extraction. This research case explained the advantage of the ultrasound, compared to the conventional extraction methods both for polyphenols. These results suggest that this plant has potent

bioactive compounds and natural preservative therapeutic resources for treating various diseases.

5 REFERENCES

- [1] Temple NJ. Antioxidants and disease: More question than answers. *Nutrition Research*. 20, 2000, 449–459.
- [2] Selma D, Imed H, Saloua F, Yassine M, Hervé C, Belgacem H, Karim H. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *J. Func Foods*. 4, 2012, 423-432.
- [3] Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*. 85, 2004, 231-237.
- [4] Myburgh KH. Polyphenol supplementation: benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sports Medicine*, 44(1), 2014, 57-70.
- [5] Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56(11), 1998, 317-333.
- [6] Manach C, Scalbert A, Moran C. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 79(5), 2004, 727–747.
- [7] Manach C, Williamson G, Morand C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I: Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 81, 2005, 230S–242S.
- [8] Tushar D, Sonal S, Gajbhiye NA, Satyanshu K. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*. 10, 2017, S1193-S1199
- [9] Lekbir A, Alloui-Lombarkia O, Mekentichi S, Noui Y, Baississe S. Optimization of Deglet-Nour Date (*Phoenix dactylifera* L.) Phenol Extraction Conditions *World Academy of Science, Engineering and Technology*. *International Journal of Food Science and Engineering*. 2013, 7-11.
- [10] Ivana K, Milena N, Dragan V, Saša S, Vlada V, Miodrag L. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Biotechnology and bioengineering*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 19(3), 2011, 504-511.

- [11] Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*. 99, 2006, 835-841.
- [12] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15, 2010, 7313-7352.
- [13] Al-Shahib W, Marshall RM. The fruit of the date palm: its possible uses as the best food for the future. *International journal of food sciences and nutrition*. 54(4), 2003, 247-259.
- [14] Anna O, Rafal P. Influence of different extraction methods for the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* in florescence. *Industrial Crops and Products*. 76, 2015, 509-514.
- [15] Dong Z, Gu F, Xu F, Wang Q. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*. 149, 2014, 54-61.
- [16] Jadhav D, Rekha BN, Gogate PR, Rathod VK. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*. 93, 2009, 421-426.
- [17] Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*. 30(18), 2007, 3268-3295.
- [18] Quispe-Candori S, Foglio MA, Rosa PTV, Meireles MAA. Obtaining b-caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. 46(1), 2008, 27-32.
- [19] Shivraj HN, Arti SN, Young-Soo K. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*. 7:76, 2017, 1-10.
- [20] Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 30, 2007, 3268-3295.
- [21] Naima R, Dumam M, Hannache H, Sesbou A, Charrier B, Pizzi A, Charrier-El Bouhtoury F. Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*. 70, 2015, 245-252.
- [22] Silva CPD, Sousa MSB, Siguemoto ES, Soares RAM, Arêas JAG. Chemical composition

and antioxidant activity of jacobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour. *Food Science and Technology (Campinas)*. 34(3), 2014, 597-603.

[23] Felhi S, Baccouch N, Ben Salah H, Smaoui S, Allouche N, Gharsallah N, Kadri A. Nutritional constituents, phytochemical profiles, in vitro antioxidant and antimicrobial properties, and gas chromatography-mass spectrometry analysis of various solvent extracts from grape seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Science and Biotechnology*. 25(6), 2016a, 1537-1544.

[24] Sultana B, Anwar F, Ashraf M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14, 2009, 2167-80.

[25] Xie JH, Dong CJ, Nie SP, Li F, Wang ZJ, Shen MY. Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) HJinskaja leaves. *Food Chemistry*. 186, 2015, 97-105.

[26] Kayini C, Paul Eanas LM, Simon MM, Jane MM. Phytochemical and antioxidant properties of different solvent extracts of *Kirkia wilmsii* Tubers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(12), 2016; 1037–1043.

[27] Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruit. *Analyst*. 125, 2000, 989-1009.

[28] Luthria DL, Mukhopadhyay S. Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54, 2006, 41-47.

[29] Naezck M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41, 2006, 1523-1542.

[30] Naezck M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 1054, 2004, 95–111.

[31] Hismath I, Wan Aida M, Ho CW. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from (neem, *Azadirachta indica*) leaves. *International Food Research Journal*. 18(3), 2011, 931-939.

[32] Wissam Z, Bashour Ghada B, Wassim A, Warid K. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3), 2012, 675-682.

- [33] Foroogh B, Abbas FMA, Azhar ME. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera* L) fruits from Iran. *Food Chemistry*. 107, 2008, 1636–1641.
- [34] Stojievi S, Stanisavljevi I, Velikovi D, Veljkovi V, Lazi M. Comparative screening of antioxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoreum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (6), 2008, 597-607.
- [35] Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Plan inić M, Tomas S. Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*. 28, 2010, 206-212.
- [36] Lutz M, Henri quez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L), raw and cooked. *J. of Food Compos. Anal.* 24, 2011, 49-54.
- [37] Bruneton J. *Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes Médicinales*, 4th editions, Paris, Tec and Doc Lavoisier. 2009.
- [38] Seigler DS, Seilheimer S, Keesy J, Huang, HF. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic botany*. 40 (2), 1986, 220-232.
- [39] Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*. 23, 2003, 1719-1726.
- [40] Saha S, Barua B, Sikdar D. Phytochemical screening, phenolic content and antioxidant activity of wild date palm (*Phoenix sylvestris* Roxb.) fruit extracted with different solvents. *International Food Research Journal*. 24(6), 2017, 2534-2542.
- [41] Upadhyay NK, Yogendra Kumar MS, Gupta A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) leaves. *Food Chemical Toxicology*. 48, 2010, 3443–3448.
- [42] Kaur G, Arora DS. Antibacterial and phytochemical screening of *Anythum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complementary Alternative. Medicine*. 9, 2009, 30–39.
- [43] Klanekin A, Guzy B, Kolar MH, Abramovic H, Mozina SS. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulation. *Journal of Food Protection*.

72, 2009, 1744–1752.

[44] Annegowda HV, Bhat R, Tze LM, Karim AA, Mansor SM. The free radical scavenging and antioxidant activities of pod and seed extract of *Clitoria fairchildiana* (Howard) - an underutilized legume. *Journal of Food Science and Technology*. 50, 2011, 535-41.

[45] Sahreen S, Khan MR, Khan RA. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*. 122, 2010, 1205–1211.

[46] Zhou K, Yu L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT – Journal of Food Science and Technology*. 37, 2004, 717–721.

[47] Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Barron M, Shahidi F. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.). *J Agric. Food Chem*. 53, 2005b, 7592–7599.

[48] Liu SC, Lin JT, Wang CK, Chen HY, Yang DJ. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chemistry*. 114, 2009, 577–581.

[49] Wen XB, Miao F, Zhou L, Zhang M, He QL. In vitro antioxidant activity of *Parnassia wightiana* W. extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 10(3), 2012, 0190-0195.

[50] Sahu RK, Kar M, Routray R. DPPH free radical scavenging activity of some leaf vegetables used by Tribals of Ddisha, India. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 1(4), 2013, 21-27.

[51] Mohamed DA, Al-Okbi SY. In vitro evaluation of antioxidant activity of different extracts of *Phoenix dactylifera* L. fruits as functional foods. *Deut. Lebensm.Rundsch*. 101, 2005, 305-308.

[52] Sasipawan M, Natthida W, Sahapat B. Anticancer effect of the extracts from *Polyalthia evecata* against human hepatoma cell line (HepG2). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, 368-374.

[53] Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, Zhu F, Qu M, Yang Q. Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food Chemistry*. 134, 2012, 1885-1891.

[54] Yogita C, Rekha S, Singhal. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive from arecanut (*Areca catech* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 17, 2013, 106-113.

- [55] Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28, 1977, 49–55.
- [56] Mbaebie BO, Edeoga HO, Afolayan AJ. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2012, 118-124.
- [57] Thomas M, Emilie D, Gaëtan LF, Marie EL, Claire E. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry.* 131, 2012, 754-760.
- [58] Wissal K, Fatma A, Christophe B, Hamadi A, Souhail B. Effects of extraction solvents on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.). *Industrial Crops and Products.* 45, 2013, 262–269.
- [59] Durre S, Muhammad AR. Antioxidant potential of phenolic extracts of *Mimusops elengi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2(7), 2012, 547-550.
- [60] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT.* 28, 1995, 25–30.
- [61] Rivera-Pérez MD, Muniz P, González-Sanjosed ML. The contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology.* 46, 2008, 2815–2822.
- [62] Teyfik Ö. Antioxidant activity of wild edible plants in the Black Sea Region of Turkey. *International Journal of Fats and Oils.* 61, 2010, 86-94.

How to cite this article:

Dia O, Ouahrani MR, Laouini SL. Solvent and techniques extraction influence on phytochemical profile and free radicals inhibition of *Phoenix dactylifera* L. *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2018, 10(3), 376-393.