



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

UNIVERSITÉ DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département : Biochimie et biologie cellulaire
et moléculaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : الكيمياء الحيوية و علم الاحياء
الخلوي و الجزيئي

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliqué

Intitulé :

Caractérisation phytochimique et propriétés biologiques de 03 types de pollen de l'espèce *Phoenix dactylifera*.

Présenté et soutenu par :

- BATLI Ouissal
- BOUSSALIA Esma
- GHERBI Nachoua

Le : 21 /06 /2023

Jury d'évaluation :

- **Président du jury** : Mme KLIBET Fahima, MCB - UFM-Constantine 1
- **Encadrant** : Mr MEBREK Saad, Maitre de recherche B - CRBt Constantine
- **Examineur** : Mr KASHI Imad, Maitre de recherche A -CRBt Constantine

Année universitaire 2022/2023

Remerciement

Ce travail de mémoire a été réalisé aux laboratoires de biochimie de mycologie et d'analyse de qualité au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie – CRBt de Constantine. A cet effet, un grand remerciement au *Dr. Azioune Ammar*, le Directeur du CRBt, qui nous a offert l'occasion de réaliser ce travail au niveau du CRBt.

Nous tenons à remercier chaleureusement notre encadrant *Dr. Mebrek Saad* Maître de recherche B - CRBt Constantine, pour son attention et sa disponibilité nous ont été d'une richesse très formatrice.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner et d'évaluer notre travail et de l'enrichir par leur proposition, la présidente de jury *Dr. KLIBET Fahima* et *Dr. Kashi Imed* pour avoir accepté d'examiner de ce travail.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à notre Co-encadrant *Dr. Djeghim Hanène* pour l'aide, les conseils, le temps qu'elle nous a consacré durant tout le travail.

Nous tenons à présenter notre remerciement à *Dr. Chaouch Khouane Asma* pour les efforts et les conseils fournis.

Nos vifs remerciements vont au *Dr. Bensouici Chawki*, responsable du laboratoire de Biochimie qui nous ouvert les portes de son laboratoire durant notre stage.

Nous remercions vivement *Dr. Debbi Ali* responsable de laboratoire de la mycologie.

Nous remercions aussi tous le personnel du CRBt qui nous ont aidé à la réalisation de ce travail surtout Mr. Mahdi Hamdi, Mme Boutheldja Sara et Mme Boulahbel Houda.

Nous remercions également tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce travail.

إهداء

لم تكن الرحلة قصيرة ولا ينبغي لها ان تكون لم يكن الحلم قريبا و ال الطريق محفور بالتسهيلات لكن رغم ذلك فعلتها انا اليوم ارى رحلتي الجامعية شارفت على الانتهاء بعد تعب و مشقة و جهاد للنفس بفضل من هلا و توفيقه انا اليوم خريجة علوم كيمياء حيوية و تطبيقية دفعة 2018/2023

الى الرجل الذي علمني وأحسن تربيته و دفعني بكل ما أوتي من قوة وجهد و مال لأصل الى ما أنا عليه أشكرك سرا و علانية حفظك الله أبي العزيز “علي” و أطال من عمرك لتراني في أعلى المراتب و تفخر بي الى أمي ثم أمي ثم أمي ” نادية ” التي ربت و سهرت الليالي لأجلي أسأل الله شفاؤك العاجل حفظك الله و رعاك و أطال عمرك لا الكلمات توفي بحقك و لا حتى الأفعال لوالك والله ما انا هنا أتمنى ان يوفقي الله لأردك لك خير ما فعلته معي ومع اني متأكدة مهما فعلت لن أوفي حقك حقا شكرا جزيلا لك الى اخي ” سامي ” الذي لا ظلما أسعدني و اعتنى بي ماديا ومعنويا في كثير من المواقف حفظك الله و أطال في عمرك وحفظ لك عائلتك

الى اخي ” وهاب ” الذي درسني وسهر على نجاحي في شهادتي المتوسطة والثانوية هو و الزوجة ” منى ” شكرا جزيلا لكما حفظ الله لكم اسرتكم الصغيرة

الى اخوتي ” ريممة ” التي انجبت ابنها، اكرم ” المعنى الحقيقي لأخي الصغير أتمنى لك النجاح في شهادة البكالوريا الى ابنة خالتي « اخلاص » الأخت و والصديقة و العائلة شكرا لكي على الكثير من المواقف كنت دوما بجانبني والى صديقتي و زميلتي «نشوة» رفيقة المصاعب التي لوالها ما تم العمل شكرا، الى الصديقة الرائعة الوفية «صبرين» والى صديقتي « رانيا » و «يسرى»مبروك لكم التخرج و اخيرا الى صديقتي « لينة » رفيقة الدرب في كثير من المواقف التي تعرفت عليها في مقاعد الدراسة و ها أنا اليوم اهدي لكي تخرجي و أتمناه لكي عامك المقبل إن شاء الله



Quissal

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Avant tout, je remercie **ALLAH** qui m'a donné force et patience tout au long de ces années d'études.*

*L'esprit de **Mon grand-père maternel** qui a veillé sur ma réussite.*

***Mon grand-père paternel** la lumière de mes yeux et je te souhaite longue vie et bonne santé.*

***Mes grande-mères** sont ce que j'ai de plus précieux. Elles ont travaillé dur pour moi et mon succès.*

***Mes parents**, qui sans eux je n'ai jamais pu arriver à ce point, qui nous ont aidés moralement et physiquement.*

***Ma chère tante** et **Ma deuxième mère** est ma tante la plus précieuse du monde. Vous m'avez soutenue constamment dans ma réussite.*

***Mes frères** et **Ma sœur** Je les remercie pour leur soutien dans ma vie.*

***Ma grande famille**, Tous **Mes oncles** et **leurs enfants** et toutes **Mes tantes** et **leurs enfants**. Tous **Mes cousins** et Toutes **Mes cousines** sans exception.*

***Mon fiancé** et **Ma belle-famille**.*

***Mes amies**, **Nachoua** et **Sa famille**, **Ouissal** et **Sa famille**.*

***Mes meilleurs amies** **Khaoula** et **Assia**, **Amira**, **Cheïma**, **Sabrin**. Tous ceux qui m'ont aidé et encouragé durant la réalisation de ce travail...*

*Je remercie tous **Mes professeurs**, du primaire jusqu'à la fin de l'enseignement universitaire, sans exception.*

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin ne serait-ce que par le simple signe d'encouragement.



Esma

Dédicace

*A l'aide d'Allah tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien
moral et so de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour
me voir réussir, à toi mon père Rabeih .*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme
de mon coeur, ma vie et mon bonheur : ma mère Ilhem .*

Remerciements particuliers :

A mon frère : Abde Raouf.

A mes sœurs : Abir, Nihad, Afaf Asma.

*Je remercie tout particulièrement mon collègue et ami dans
des situation difficiles de m'avoir aidé à accomplir ce travail :*

Batli Wissal.

Et un merci spécial : Ma meilleure amie Marwa.

Et je n'oublie pas le bon coeur Sabrina.

A mes amies : Souha, Soundos, Sarah, Sofia, Chaïma.

*قل للرياح تأتي كيفما شئت فما عادت سفينتنا تشتهي شيئا تجري الرياح كما تجري سفينتنا نحن
الرياح ونحن البحر*



Nachoua

Résumé

Ce travail consiste à l'étude phytochimique des extraits hydro-méthanolique de quatre types de pollen récupéré à partir des pieds males de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* et *Phoenix canariensis*) récoltées de la région de Biskra et de la région de Ali-Mendjeli Constantine respectivement. Ce travail a permis de doser les composés phénoliques et les flavonoïdes et d'évaluer le pouvoir antioxydant et la capacité inhibitrice des enzymes en utilisant différentes méthodes (peroxydase, polyphénoloxydase et alpha amylase) ainsi que l'activité anti lithiasique, anti inflammatoire et anti fongique des extraits étudiés.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait A était le plus riche en polyphénols avec une teneur de 36.49 ± 2 μg EAG/mg de poids sec suivie de l'extrait C, B et D avec des teneurs qui varient entre 28.73 ± 1.79 et 13.54 ± 0.18 μg EAG/mg de poids sec. Les résultats du dosage des flavonoïdes ont révélé que l'extrait C était le plus riche en flavonoïdes contrairement à l'extrait B qui était le plus pauvre (10.94 ± 1.17 , 6 ± 0.31 μg EQ/mg PS respectivement). L'investigation de l'activité antioxydante par différents protocoles a montré que l'extrait A présentait les meilleures propriétés antioxydants pour la plupart des tests utilisés, DPPH et ABTS avec des valeurs d'IC₅₀ de $954,1 \pm 109,1$ et $221,08 \pm 3,71$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Et le FPAP avec une valeur d'A_{0.5} de $1523 \pm 190,2$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ contrairement à l'extrait B. Concernant le test phénanthroline l'extrait C présentait le meilleur pouvoir réducteur avec une A_{0.5} égale à $132,88 \pm 0,82$ $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Concernant les propriétés inhibitrices des enzymes, les résultats prouvent que les extraits ont une faible activité d'inhiber l'effet hyperglycémiant et le brunissement. Les extraits présentaient des IC₅₀ supérieurs à 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Même pour les activités anti-inflammatoire et anti-lithiasique où les extraits ont présenté des IC₅₀ plus élevées à 16 mg/ml et 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Aucune activité antimycosique vis-à-vis le champignons phytopathogène *fusarium oxysporum* par tous les extraits.

Mots clés : Pollen, DPP, *Phoenix dactylifera*, *Phoenix canariensis*, Activités biologiques, *in vitro*.

Abstract

This work consists of the phytochemical study of hydro-methanolic extracts from four types of pollen recovered from male date palm trees (*Phoenix dactylifera* and *Phoenix canariensis*) collected from the Biskra region and the Ali-Mendjeli, Constantine region, respectively. This study involved quantifying phenolic compounds and flavonoids and evaluating the antioxidant power and inhibitory capacity of enzymes using different methods (peroxidase, polyphenoloxidase, and alpha-amylase), as well as studying the anti-lithiasis, anti-inflammatory, and antifungal activities of the extracts.

The results showed that Extract A was the richest in polyphenols with a content of 36.49 ± 2 μg GAE/mg dry weight, followed by Extracts C, B, and D with contents ranging from 28.73 ± 1.79 to 13.54 ± 0.18 μg GAE/mg dry weight. The flavonoid quantification results revealed that Extract C was the richest in flavonoids, whereas Extract B was the poorest (10.94 ± 1.17 and 6 ± 0.31 μg QE/mg DW, respectively). The investigation of antioxidant activity through various protocols showed that Extract A exhibited the best antioxidant properties in most of the tests used, such as DPPH and ABTS, with IC_{50} values of 954.1 ± 109.1 and 221.08 ± 3.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay yielded a value of $A_{0.5}$ of 1523 ± 190.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Extract A, unlike Extract B. Regarding the phenanthroline test, Extract C exhibited the highest reducing power with an $A_{0.5}$ value of 132.88 ± 0.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Regarding the inhibitory properties of enzymes, the results demonstrate that the extracts had low activity in inhibiting hyperglycemic effects and browning. The extracts showed IC_{50} values higher than 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Even for the anti-inflammatory and anti-lithiasis activities, the extracts exhibited higher IC_{50} values at 16 mg/ml and 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. None of the extracts showed antimycotic activity against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

Keywords: Pollen, DPP, *Phoenix dactylifera*, *Phoenix canariensis*, Biological activities, *in vitro*.

ملخص

هذا العمل يتضمن دراسة الفيتوكيميائية للمستخلصات المائية-الميثانولية من أربعة أنواع من حبوب اللقاح المسترجعة من أشجار نخيل التمر الذكور (فينيكس داكليليفيرا وفينيكس كانارينسيس) والتي تم جمعها من منطقة بسكرة ومنطقة علي منجلي قسنطينة، على التوالي. تضمن هذا العمل تقدير المركبات الفينولية والفلافونويدات وتقييم القوة المضادة للأكسدة والقدرة التثبيطية للإنزيمات باستخدام طرق مختلفة (بيروكسيداز وبوليفينولوكسيداز وألفا أميليز)، بالإضافة إلى دراسة النشاط المضاد للتحصين والمضاد للالتهاب والمضاد للفطريات للمستخلصات المدروسة.

أظهرت النتائج أن المستخلص A هو الأغنى بالمركبات الفينولية بتركيز 36.49 ± 2 ميكروغرام EAG/ملغ من الوزن الجاف، يليه المستخلصات C و B و D بتراوح تراكيدها بين 1.79 ± 28.73 و 13.54 ± 0.18 ميكروغرام EAG/ملغ من الوزن الجاف. كشفت نتائج تقدير الفلافونويدات أن المستخلص C هو الأغنى بالفلافونويدات، بينما المستخلص B كان الأكثر فقرًا (1.17 ± 10.94 و 0.31 ± 6 ميكروغرام EQ/ملغ من الوزن الجاف على التوالي). أظهر استكشاف النشاط المضاد للأكسدة من خلال بروتوكولات مختلفة أن المستخلص A يتمتع بأفضل الخصائص المضادة للأكسدة في معظم الاختبارات المستخدمة مثل DPPH و ABTS، مع قيم IC_{50} تبلغ 109.1 ± 221.08 و 3.71 ± 1523 ميكروغرام/مل على التوالي. أما اختبار القدرة الاختزالية للحديد (FRAP) فأعطى قيمة $A_{0.5}$ تبلغ 190.2 ± 190.2 ميكروغرام/مل للمستخلص A، على عكس المستخلص B. بالنسبة لاختبار الفينانثرولين، أظهر المستخلص C أعلى قدرة اختزالية بقيمة $A_{0.5}$ تبلغ 0.82 ± 132.88 ميكروغرام/مل.

بالنسبة لخصائص تثبيط الإنزيمات، تشير النتائج إلى أن المستخلصات لديها نشاط ضعيف في تثبيط التأثير الفرط في نسبة السكر في الدم والتلون. أظهرت المستخلصات قيم IC_{50} أعلى من 2500 ميكروغرام/مل و 2000 ميكروغرام/مل على التوالي. حتى بالنسبة للأنشطة المضادة للالتهاب ومضادة للتحصين، أظهرت المستخلصات قيم IC_{50} أعلى عند تراكيز 16 ملغ/مل و 4000 ميكروغرام/مل على التوالي. لم يُظهر أي مستخلص نشاطًا مضادًا للفطريات ضد فطر *Fusarium oxysporum* النباتي.

الكلمات المفتاحية: حبوب لقاح لنخيل التمر، في المختبر، الأنشطة البيولوجية، *Pheonix dactilyfera*،

Pheonix canariensis

Liste des figures

Figure 1. Photo du <i>Phoenix dactylifera L.</i>	3
Figure 2. Répartition géographique des palmiers dattiers dans le monde	4
Figure 3. Photo de pollen du palmier dattier.	6
Figure 4. Schéma de l'organisation interne d'un grain de pollen	7
Figure 5. Différentes couches de la paroi des grains de pollen	7
Figure 6. Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de la morphologie des grains de pollen de palmiers dattiers (<i>Phoenix dactylifera L.</i>)	9
Figure 7. Arborescence des métabolites secondaires	13
Figure 8. l'existence des polyphénols dans les sources de nourriture	14
Figure 9. Exemple d'acide phénolique "l'acide gallique"	15
Figure 10. Structure de base des flavonoïdes	15
Figure 11. Localisation géographique des régions des échantillons.	18
Figure 12. Le pollen de palmier dattier sous forme poudre.	20
Figure 13. Evaporateur rotatif.	20
Figure 14. Protocole d'extraction des métabolites secondaires.	21
Figure 15. Série de dilutions et concentration respectives de chaque extrait.	22
Figure 16. Lecteur de microplaque.	22
Figure 17. Spectrophotomètre à cuve.	23
Figure 18. Série de dilutions et concentration respectives d'acide gallique.	24
Figure 19. Série de dilutions et concentration respectives la Quercétine.	25
Figure 20. Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)	26
Figure 21. Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS+• .	27
Figure 22. Mécanisme réactionnel du test FRAP	28
Figure 23. Formation de complexe Fe ⁺² –Phenanthroline	29
Figure 24. Série de dilutions et concentration respectives de chaque extrait pour évaluer l'activité anti-lithiasique.	32
Figure 25. La méthode de manipulation de l'activité anti-inflammatoire.	34
Figure 26. Rendement d'extractions en pourcentage des extraits.	37
Figure 27. Photo de la microplaque du dosage des polyphénols totaux.	38
Figure 28. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	38
Figure 29. Evaluation des polyphénols totaux des extraits DPP.	39

Figure 30. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.....	41
Figure 31. Evaluation des flavonoïdes des extraits DPP.....	41
Figure 32. Valeurs d'IC ₅₀ de l'activité DPPH des extraits de DPP.....	44
Figure 33. Valeurs d'IC ₅₀ de l'activité ABTS des extraits de DPP.....	45
Figure 34. Valeurs A _{0.5} du pouvoir réducteur des extraits de DPP.....	46
Figure 35. Valeurs A _{0.5} de la phénonthroline des extraits de DPP.....	47
Figure 36. Observation microscopique de l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium (Gr.x 10).....	48

Liste des tableaux

Tableau 1. Criblage phytochimique de divers extraits de pollen du palmier	12
Tableau 2. Détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance de champignon « <i>Fusarium oxysporum</i> » des différents extraits DPP.....	49

Liste des Abréviations

A_{0.5} : Concentration de l'extrait à 0.5 d'absorbance

Abs : Absorbance

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

Ac : Absorbance du contrôle

As : Absorbance de l'extrait

Ae : Absorbance du contrôle

Ab : Absorbance de blanc d'extrait

Ai : Activité enzymatique initiale

Ar : Activité enzymatique résiduelle

AH : Antioxydants réducteurs

ANOVA : Analyse de la variance

av : Avant J

COM : Cristaux monohydratés

DMSO : Diméthylsulfooxyde

DN : Deglet-Nour

DPP : Date Palm Pollen

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EAG : Équivalent de l'acide gallique

EQ : Équivalent de la quercétine

FCR : Folin-Ciocalteu.

ha : Hectare

IC₅₀: Concentration inhibitrice à 50 %

IKI : Iodure de potassium

MeOH : Méthanol

OG : Out groupe

PDA : Potato, Dextrose, Agar

PI : Pourcentage d'inhibition

Pm : Poids de la matière végétale

POD : Anti-peroxydase

PPO : Anti-polyphénoloxydase

RP : Pouvoir réducteur

SM : Solution mère

T : croissance radiale

TCA : Acide trichloracétique

TFC: Quantification des flavonoïdes totaux

TPC: Quantification des polyphénols totaux

Table des matières

Remerciements	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I. Historique	3
II. Palmier dattier.....	3
II.1. Répartition géographique du palmier dattier	4
II.1.1. Dans le monde.....	4
II.1.2. En Algérie	4
II.2. Classification botanique de palmier dattier.....	5
III. La palynologie	6
III.1. Le pollen	6
III.2. Les caractéristiques physico-chimiques du pollen.....	6
III.2.1. Caractères structuraux	6
III.2.2. Composition chimique du pollen.....	8
III.3. Les caractéristiques du pollen du palmier dattier	8
III. 4. La Classification de pollen.....	9
III. 4.1. Le type	9
III. 4. 2. la quantité.....	10
III. 4. 3. la disposition.....	10
III.5. L'utilisation de pollen de palmier dattier.....	10
III. 6. Les dernières recherches sur le pollen.....	11
IV. Les métabolites secondaires.....	12
IV.1 Définition	13
IV.2 Les polyphénols.....	13
IV.2.1 Classification des polyphénols	14
IV.2.2.1. Les acides phénoliques.....	14
IV.2.2.2. Les flavonoïdes.....	15

IV.2.2.2.1. Rôles des flavonoïdes.....	16
IV.2.2.2.1.1. Pour la plante	16
IV.2.2.2.1.2. Pour la santé humaine	16
IV.2.2.2.1.2.1. Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres	16
IV.2.2.2.1.2.2. Propriétés inhibitrices des enzymes	17
IV.2.2.2.1.2.3. Propriétés anti-inflammatoires.....	17
IV.2.2.2.1.2.4. Propriétés hépatoprotecteur	17
IV.2.2.2.1.2.5. Propriétés anti-allergiques.....	17
Matériels & méthodes	
I. But et objectif du travail	18
II. Matériel	18
II.1. Matériel Biologique.....	18
II.2. Réactifs Chimiques et solvants.....	19
II.3. Matériel du laboratoire.....	19
III. Méthodes.....	19
III.1. Préparation des extraits méthanolique.....	19
III.1.1. Extraction solide-liquide	19
III.1.1.2. Evaporation.....	20
III.1.1.3. Rendement d'extraction.....	21
III.2. Préparations des échantillons.....	22
IV. Dosage des polyphénols.....	23
IV.1. Dosage des polyphénols totaux (TCP).....	23
IV.2. Dosage des flavonoïdes (TFC).....	24
V. Evaluation de l'activité antioxydante	25
V.1. Activité antiradicalaire par le test DPPH.....	25
V.2. Test de l'activité ABTS	26
V.3. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)	28
V.4. L'activité Phénanthroline	28
VI. Les activités inhibitrices des enzymes.....	29
VI.1. Activité anti-brunissement enzymatique.....	29
VI.1.1. L'activité anti-péroxydase (POD).....	30
VI.1.2. L'activité anti-polyphénoloxydase (PPO).....	30
VI.2. Inhibition de l' α -amylase.....	30

VII.1. Test de nucléation.....	32
VII.2. Test d'agrégation.....	33
VII.3. Etude microscopique par microscope optique.....	33
VIII. Anti-inflammatoire	33
IX. Activité antifongique.....	35
X. Analyse Statistique	36
Résultats & discussion	
I. Extraction et quantification des antioxydants	37
I.1. Rendement d'extraction des polyphénols.....	37
II. Analyse quantitative des composés phénolique.....	37
II.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC)	37
II.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC)	40
III. Evaluation de l'activité antioxydante	43
III. 1. Activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH.....	43
III.2. Test de l'activité ABTS.....	45
III.3. Pouvoir réducteur de fer (FRAP).....	46
III.4. L'activité Phénanthroline	47
IV. Evaluation des activités inhibitrices des enzymes.....	47
IV.1. Activité anti – brunissement enzymatique.....	47
IV.2. Inhibition de l' α -amylase.....	48
V. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique.....	48
VI. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	48
VII. Evaluation de l'activité antifongique.....	49
Conclusion.....	50
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme s'est inspiré de son environnement naturel pour combler ses besoins, exploiter et améliorer son mode de vie. La flore végétale, qui fait partie intégrante de la vie humaine quotidienne, le développement des sciences du végétal, leurs applications en médecine, en cosmétique et dans l'agro-alimentaire ont reçu un nouvel élan. Les soins à base de plantes étaient considérés comme la seule solution aux maladies, mais avec l'avènement de la pharmacologie, les médicaments contenant des principes actifs synthétiques ont dépassé la médecine conventionnelle. Au cours des dernières décennies, de nouvelles pathologies sont apparues, principalement causées par l'ingestion de produits d'origine synthétique, la pollution de l'air, le stress et de nombreux autres facteurs ont causé une détérioration de la santé.

Actuellement, les scientifiques étudient la découverte de molécules d'origine végétale afin de les incorporer dans des préparations médicinales et alimentaires. Le stress oxydatif est devenu la pathologie la plus répandue de notre époque, même si la plupart des êtres ne mesurent pas sa gravité. Il est responsable de plusieurs maladies : diabète, cancer, neuropathie, stérilité...etc. Tel que rapporté par l'OMS, 70%-80% de la population mondiale font confiance à la médecine traditionnelle, Ceci est illustré par l'utilisation du pollen de palmier dattier (DPP) par la population de l'Egypte antique et de la Chine pour traiter l'infertilité chez les femmes (**Salmani et al., 2022**). Actuellement, des études récentes visent à évaluer son impact sur la glycémie, les déséquilibres testiculaires, le stress oxydatif et le système de défense antioxydant (**Mohamed et al., 2018**), C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier trois types de pollen qui appartiennent à trois différents pieds mâles (Dokkars) de l'espèce *Phoenix dactylifera* et un type de pollen de l'espèce *Phoenix canariensis* ces espèces s'installent dans des régions désertiques où se trouvent des points d'eau et forme ce qu'on appelle Oasis qui constituent un écosystème à grande importance écologique, économique et sociologique.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est la valorisation de la richesse de l'Algérie en plante médicinale et d'évaluer le pollen de palmier dattier algérien sous l'aspect thérapeutique, pour cela notre étude englobe deux aspects dont le premier est d'ordre phytochimique basé sur une analyse quantitative du contenu en composé phénoliques et flavonoïdes, le second aspect est consacré à une évaluation des

activités antioxydantes et inhibitrice de quelques enzymes, anti-lithiasique, anti inflammatoire et antifongique.

Notre travail sera présenté comme suit :

- ❖ La première et la deuxième partie concerne l'étude bibliographique. Cette étude commence par une description botanique du genre *Phoenix*, suivi par des travaux phytochimiques antérieurs relatifs aux métabolites secondaires les plus courants, reporte également les résultats relatifs aux activités biologiques et l'utilisation dans la médecine traditionnelle des plantes du genre *Phoenix*.
- ❖ La troisième partie porte sur la présentation des méthodes d'extraction des métabolites secondaires, à l'étude phytochimique et à l'évaluation des activités, antioxydante, inhibitrice des enzymes, anti lithiasique, anti inflammatoire et anti fongique.
- ❖ Enfin la quatrième partie présente les résultats obtenus, leurs discussions et leurs comparaisons avec des études antérieures réalisée sur des échantillons de la même famille.

Synthèse bibliographique

I. Historique

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est considéré comme un symbole de la vie dans le désert car il tolère mieux la chaleur, la sécheresse et la salinité que les autres espèces cultivées. C'est l'un des arbres les plus anciens utilisés par l'homme et il est cultivé depuis l'Antiquité.

L'origine exacte ou le centre génétique du palmier dattier a été perdu dans l'histoire, mais les preuves de la culture du palmier dattier remontent à 4000 avant Jésus-Christ dans le sud de l'Irak. Des références aux palmiers dattiers ont également été trouvées dans l'Égypte ancienne. Des restes de datations ont été trouvés sur un certain nombre de sites néolithiques, notamment en Syrie et en Égypte. Cela signifie qu'ils étaient mangés par l'homme il y a 7 000 à 8 000 ans (El-Juhany, 2010).

II. Palmier dattier

Le palmier dattier dénommé *Phoenix dactylifera L.*, une vivace ligneuse monocotylédone (Benouamane et al., 2022), dioïque (Daoud et al., 2019) (Il existe des palmiers mâles et des palmiers femelles, les deux ont des fleurs. Les fleurs mâles contiennent un pollen mûr et les fleurs femelle contiennent des ovules prêts à être fécondés) (Wertheimer, 1957), diploïde ($2n = 36$), appartenant à la famille des *Arecaceae*. Elle est cultivée dans les régions arides et semi-arides chaudes de l'ancien monde. Ses fruit comestible de très grande valeur écologique, économique (Chaouch Khouane, 2022). En termes de valeur nutritionnelle, les dattes contiennent une grande quantité de glucides (77,13 g/100 g), principalement du glucose et du fructose, mais pauvres en protéines (2,61 %) et en matières grasses (0,35 %). Il constitue également une excellente source de nombreuses vitamines, fibres alimentaires, minéraux, phénoliques, caroténoïdes et antioxydants (Gnanamangai et al., 2019).



Figure 1. Photo du *Phoenix dactylifera L.*

II.1. Répartition géographique du palmier dattier

II.1.1. Dans le monde

Les palmiers dattiers se trouvent principalement dans les régions arides et semi-arides d'Asie et d'Afrique. On le trouve également en Amérique, notamment aux États-Unis (Californie, Arizona, Texas), au Mexique, au Chili et au Pérou. En Australie, l'espèce se trouve dans les États du Queensland et du Northern Territory. En Europe, La culture du palmier dattier est marginale, en particulier dans l'Espagne (Elche) et Italie (Bordighera, SanRemo) (**Daher Meraneh, 2010**).

Actuellement, on estime qu'il y a environ 3000 cultivars de palmiers dattiers dans le monde (**Al-Khayri et al., 2021**).

En 2019, la culture du palmier dans le monde couvre une superficie estimée à 1381434 ha avec une production des dattes de 9075446 tonnes (**FAOSTAT, 2019**).

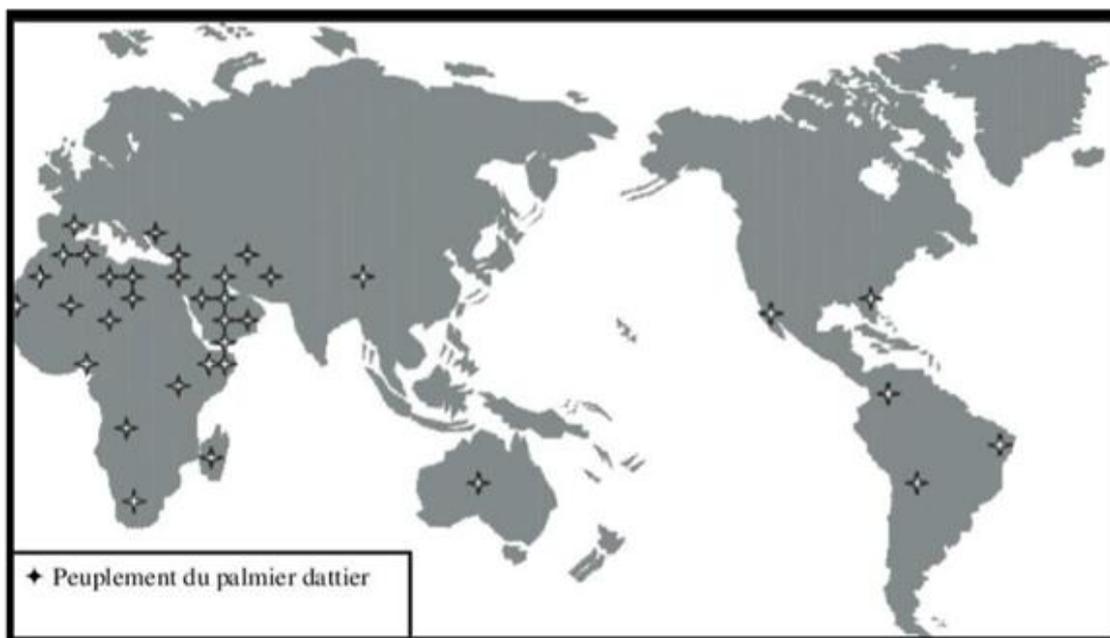


Figure 2. Répartition géographique des palmiers dattiers dans le monde (**Hadrami & Hadrami, 2009 in Chaouch Khouane, 2022**).

II.1.2. En Algérie

Les palmiers dattiers se trouvent dans plusieurs oasis de la partie sud chaude et sec de l'Algérie (zone saharienne). Sa culture s'étend depuis la frontière du Maroc à l'ouest jusqu'à la frontière de la Tunisie et de la Libye à l'est et depuis l'Atlas Saharien au nord jusqu'à Reggane (sud-ouest), Tamanrasset (centre) et Djanet (sud-est) (**Aberlenc-Bertossi, 2010**).

En 2019, La superficie dédiée pour la culture du palmier dattier dans Algérie couvre une superficie estimée à 170082 ha, avec une production de 1136025 Tonnes de dattes, ce qui a classé l'Algérie parmi les plus grands pays producteurs. Elle occupe le quatrième rang mondial en termes de production juste après l'Égypte, l'Arabie saoudite et l'Iran (FAOSTAT, 2019).

II.2. Classification botanique de palmier dattier

Le palmier dattier est une monocotylédone de la famille des *Areacaceae* (anciennement Palmacées) comprenant de 238 genres (Uhl,1969), plus de 2 800 espèces (Chaouch Khouane, 2022) dont les deux espèces (*Phoenix dactylifera L et Phoenix canariensis*).

En se basant sur la classification de l'International Code Of Botanic Nomenclature (Moore, 1963 ; Uhl & Moore, 1971 ; Bransfield, 1999 ; Henderson, 1999 in El-Houmaizi, 2002) sa position systématique est la suivante :

- ❖ Embranchement : *Angiosperme*
- ❖ Classe : *Monocotylédones*
- ❖ Ordre : *Principes*
- ❖ Famille : *Areacacées*
- ❖ Tribu : *Phoenicées*
- ❖ Genre : *Phoenix*
- ❖ Espèce : *Phoenix dactylifera L.*

Le *Phoenix canariensis* est un palmier très fréquemment planté pour ses qualités ornementales. L'espèce est endémique aux Canaries, et a été importée à Nice en 1864. Sa silhouette est à présent emblématique des paysages méditerranéens sa position systématique est la suivante (Chabaud, 1882) :

- ❖ Règne : *Plantae*
- ❖ Division : *Magnoliophyta*
- ❖ Classe : *Liliopsida*
- ❖ Ordre : *Arecales*
- ❖ Famille : *Areaceae*
- ❖ Genre : *Phoenix*
- ❖ Espèce : *Phoenix canariensis*

III. La palynologie

La palynologie est la science qui étudie la forme, la fonction et la composition du pollen et de la paroi des spores. De bons renseignements peuvent être obtenus en peu de temps (**Walker et al., 1975**). À travers les caractères de la paroi externe du grain de pollen, L'étude du pollen est d'une grande importance pour de nombreuses sciences telles que la génétique, la géologie, la taxonomie, les études évolutives. L'étude du phénotype du pollen contribue à la classification des plantes (**Al Masoudi et al., 2020**).

III.1. Le pollen

Le mot pollen vient du mot grec « pâle » signifiant farine et poussière pollinique (**Alhamidi, 2017**).

Constitue les gamètes mâles dans le règne végétal contenus dans les sacs polliniques des anthères de la fleur. Il sert à féconder la partie femelle de la fleur (**Blanc, 2010**). Il est alors transporté par un vecteur animal ou par le vent (**Prieu, 2015**).



Figure 3. Photo de pollen du palmier dattier.

III.2. Les caractéristiques physico-chimiques du pollen

III.2.1. Caractères structuraux

Malgré certaines différences morphologiques, les grains de pollen présentent une structure anatomique uniforme. Ils sont constitués d'une partie centrale appelée cellule vivante entourée d'une membrane appelée « sporoderme » qui protège contre la dessiccation, l'écrasement, la dégradation par la lumière UV et l'oxydation par l'air (**Blanc, 2010**).

Chaque grain de pollen présente une couche extérieure dénommée « exine » et une couche intérieure « intine » (**Gastaldi et al., 2020**). Ensemble, ils forment l'enveloppe pollinique (sporoderme) (**Ketfi, 2016**).

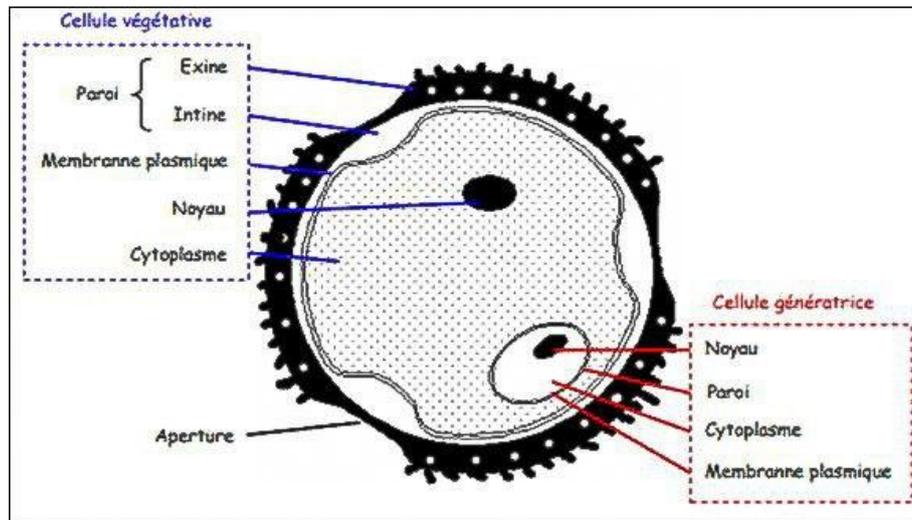


Figure 4. Schéma de l'organisation interne d'un grain de pollen (Sannier, 2006).

- **Exine** : elle est imperméable et peu flexible (Sannier, 2006), L'exine est subdivisée en deux sous couches, la couche interne non structurée l'endexine, et l'ectexine qui représentent la couche structurée la plus externe (Ketfi, 2016).
- **Intine** : elle est très similaire dans sa construction à une paroi cellulaire végétale (Frenguelli, 2003). Elle entoure la cellule végétative qui contiennent suffisamment de réserves sous forme d'amidon nécessaires à la croissance du tube pollinique (Gastaldi et al., 2020).

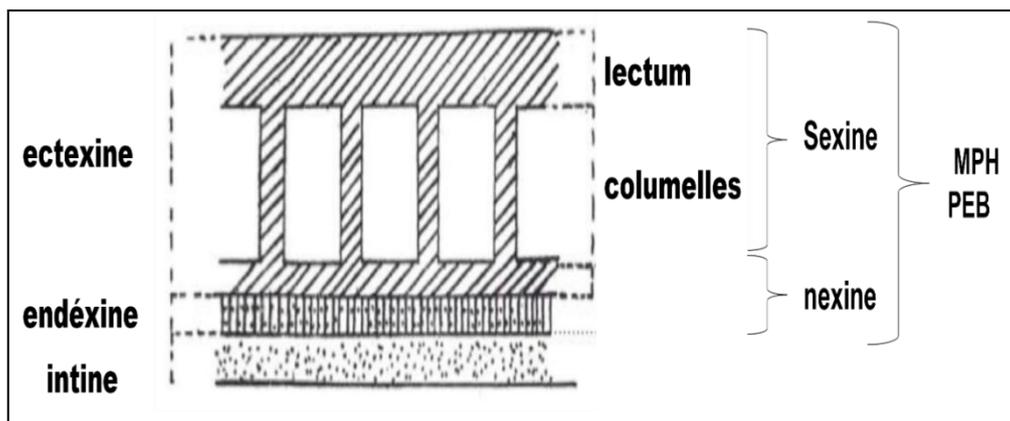


Figure 5. Différentes couches de la paroi des grains de pollen (Mehdi, 2016).

III.2.2. Composition chimique du pollen

Le pollen frais est constitué d'eau (5 à 36 %) et de solides (64 à 95 %) (Daoud et al., 2019), caractérise par un pH neutre et son humidité est très élevée qui dépasse 75 % (Babahani & Bouguedoura, 2015).

Les taux de glucides dans le pollen varient entre (15% -75%) selon l'espèce (50 % pour le pollen de palmier dattier). Ces glucides sont les fructoses, les glucoses et le saccharose en moindre proportion. Le pollen contient des lipides (de 1% - 20%), dont une grande partie d'acides gras essentiels et une forte proportion de protéines (de 16 à 40 %) contenant tous les acides aminés connus. Le pollen contient également un certain nombre d'enzymes comme l'amylase, l'invertase et certaines phosphatases, et des substances antibiotiques actives, On y trouve aussi des coenzymes (Alhamidi, 2017).

Les études phytochimiques sur le pollen de palmier dattier (DPP) ont identifié la présence des vitamines telles que B1, B2, B12, A, E et C, des minéraux tels que le zinc, le sélénium, le fer et le cuivre. Il a également été signalé que (DPP) est riche en flavonoïdes comme la catéchine et la quercénine (Bentayeb et al., 2018).

La composition chimique du pollen est influencée par plusieurs facteurs : la quantité et la qualité de l'eau d'irrigation, et la nature des sols agricoles (Altemimi, 2020).

III.3. Les caractéristiques du pollen du palmier dattier

Pour une famille monocotylédone, les *Arecaceae* possèdent un pollen inhabituellement varié, non seulement en nombre d'ouverture et en orientation, mais aussi en ornementation exine (Harley & Baker, 2001).

En termes de forme, il existe des grains de pollen elliptique asymétriques ou sphériques, des grains de pollen en forme de cerf-volant ou des grains de pollen rectangulaire et parfois rectangulaire. Des grains de pollen triangulaires, analogue ou asymétriques, des grains de pollen sphériques ou des grains de pollen oblat sont également indiqués.

De même, la taille représente un large éventail de variations selon les recherches de Thanikaimoni (1970) (Sannier, 2006).

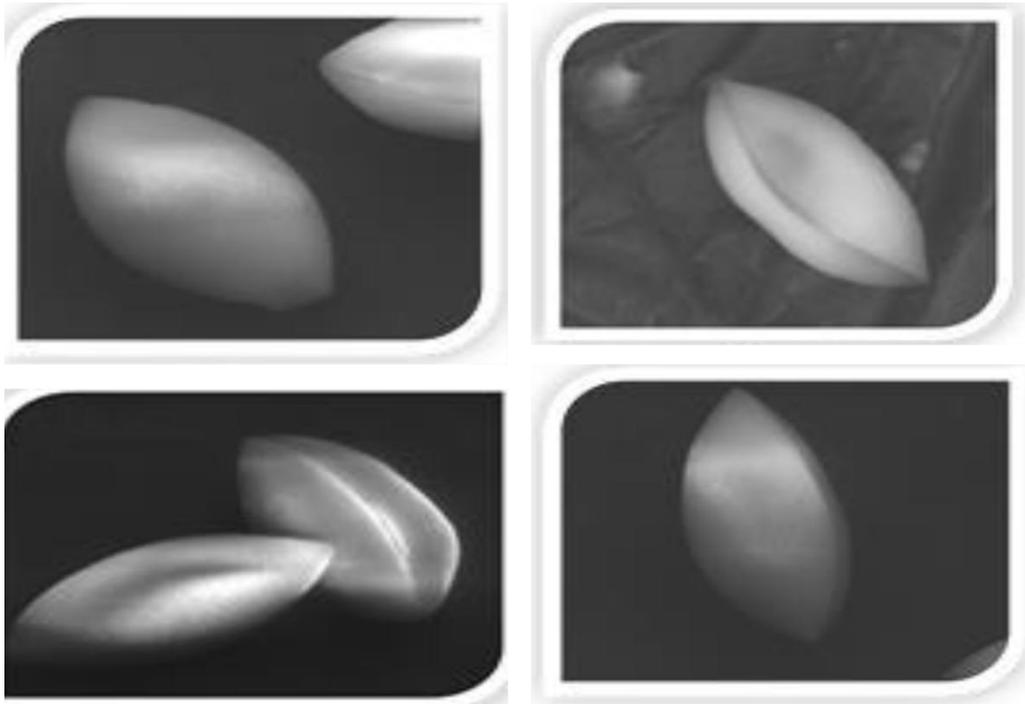


Figure 6. Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de la morphologie des grains de pollen de palmiers dattiers (*Phoenix dactylifera L.*) (Soliman & Al-Obess, 2013).

III. 4. La Classification de pollen

Les grains de pollen sont classés selon le type, la quantité et la disposition des apertures.

III. 4.1. Le type

Selon les mesures réalisées en vue polaire et équatoriale, différentes formes d'apertures peuvent être définies :

- **Porus** : est régulièrement distribué dans des apertures circulaires au sein de la zone équatoriale, ou à la surface du pollen.
- **Ucus** : l'aperture circulaire se trouve dans la zone polaire distale.
- **Colpus** : l'aperture est plus de deux fois plus longue que large et sont soit situées dans la zone équatoriale, soit réparties régulièrement sur toute la surface du grain de pollen. Le même type d'aperture présente dans la zone polaire distale sont appelées « sulcus ».
- **Colporus** : une aperture composée d'un colpus (aperture au niveau de la sexine) associé à une endoaperture (aperture au niveau de la nexine) de forme et de taille variable.

III. 4. 2. la quantité

Dans la nature, on trouve du pollen sans ouvertures (inaperturé). Dans le cas où le pollen présente des ouvertures, un préfixe est ajouté au type d'ouverture pour indiquer la quantité (mono, di, tri, tetra, ...). Le préfixe zono ou stéphano est ajouté lorsqu'il y a six ou plus ouvertures disposées dans la zone équatoriale.

III. 4. 3. la disposition

Si les ouvertures se trouvent dispersées sur la surface du grain de pollen, on utilisera le préfixe panto. Il est également possible d'avoir différents types d'ouvertures dans le même grain de pollen. Dans ce cas, il est préfixé par hetero (**Gastaldi et al., 2022**).

III.5. L'utilisation de pollen de palmier dattier

Le pollen et les produits polliniques sont depuis longtemps utilisés en phytothérapie traditionnelle (**Daoud et al., 2019**), pour contenir des bienfaits alimentaires et médicaux élevés (**Muhsin, 2022**). Il a été utilisé pour améliorer la fertilité des femmes dans la médecine traditionnelle asiatique (**Abdollahi et al., 2015**). D'autre part, les anciens Egyptiens l'utilisaient comme une nourriture stable. De plus, de nombreux résidents du Moyen-Orient ont consommé du pollen de palmier le matin, lorsque l'estomac est vide pendant cette période, parce qu'ils croient que le pollen agit comme une substance anti-poisonnement à laquelle le corps peut être exposé pendant la journée (**Ali, 2011**).

Il aide également à activer les selles et prévenir la constipation. Aide à traiter l'anémie en contenant l'élément de fer. Il est efficace contre les allergies parce qu'il contient du zinc et réduit le risque de saignement chez les femmes enceintes, car il contient de la vitamine K et soulage l'acidité et les brûlures d'estomac (**Ibrahim et al., 2011**).

En outre, il contient de l'estradiol, qui est similaire à l'oestrogène. Le pollen de palmier a également le potentiel de stimuler les ovaires, où l'oestrogène affecte le processus d'induction de l'ovulation en raison de son effet sur l'efficacité des hormones FSH (follicle stimulating hormone) et LH (luteinizing hormone), et l'ovulation se produit (**Erhaem, 2014**).

Également pour traiter divers troubles, y compris les troubles de la mémoire, les infections, la fièvre, la paralysie, la perte de conscience et de nombreux troubles neurologiques (**Mohamed et al., 2018**).

III. 6. Les dernières recherches sur le pollen

Le diabète sucré est une maladie épidémique qui est considérée comme un problème de santé commun dans le monde. Selon la Fédération internationale du diabète en 2013, 381 millions de personnes ont souffert du diabète, et on estime qu'il sera presque doublé d'ici 2030 (Mohamed et *al.*, 2018).

Des études récentes ont montré que le pollen de palmier dattier et ses extraits avaient un effet hypoglycémiant chez les rats diabétiques, ce qui peut être dû à la teneur phytochimique du pollen de palmier dattier sous forme de polyphénols, de flavonoïdes et de minéraux. En outre, ils étaient très efficaces dans la gestion des complications du diabète sucré telles que l'hyperlipidémie et la perte de poids. Les effets antidiabétiques du pollen de palmier dattier et de ses extraits hydroéthanoliques peuvent être médiés par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, la stimulation de l'absorption du glucose et de la synthèse du glycogène par les cellules, et la protection des β -cellules pancréatiques contre le stress oxydatif induit par l'alloxane et le glucose (Abdel-Shaheed et *al.*, 2021).

En outre, Les suspensions de DPP peuvent avoir un rôle protecteur potentiel contre le dysfonctionnement de l'axe testiculaire hypophysaire induit par le diabète et les changements histologiques délétères testiculaires en association avec des actions antihyperglycémiques via leurs propriétés antioxydantes et leur efficacité à améliorer le taux d'insuline dans le sang et la fonction des cellules bêta.

Toutefois, d'autres études cliniques sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de la DPP chez les hommes diabétiques (Mohamed et *al.*, 2018).

IV. Les métabolites secondaires

Selon des études sur la composition chimique et nutritionnelle des grains de pollen de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et ses composants d'éléments métalliques, les graines de pollen contiennent des stérols, des flavones, des alcaloïdes, des protéines, des glucides, des glycosides, composés phénoliques, tanins, terpènes, saponines, coumarines, lignine, huiles et graisses et l'absence de quinones (AL-Samarai et al., 2016).

Tableau 1. Criblage phytochimique de divers extraits de pollen du palmier (AL-Samarai et al., 2016).

Phytochemical tests		Chloroform	Ethanol	Ethyl acetate	Hot DW	Pet. ether
Phytosterol	Salkowski	Trace	++	-	+	+
	Liebermann-Burchard	++	++	Trace	Trace	++
Flavinoids	Shinoda	-	+	Trace	-	-
	Zinc-HCl	-	++	-	+	-
	Alkaline reag.	-	++	-	+	-
	Ferric chloride	-	+	-	Trace	-
	Lead acetate	-	+	Trace	-	-
Alkaloids	Dragendorff	Trace	-	Trace	+	Trace
	Mayer	-	Trace	-	-	Trace
	Wagner	+	-	+	Trace	+
	Hager	-	-	-	+	-
	Tannic acid	-	Trace	-	+	Trace
Protein and Amino acids	Ninhydrin	-	+	-	++	-
	Xanthoproteic	-	-	-	-	-
	Biuret	-	Trace	-	+	-
Carbohydrate	Molish	+	+	-	++	++
	Benedict	Trace	Trace	-	++	-
	Salwinoff	Trace	Trace	-	++	-
	Anthron	+	+	-	++	++
Glycosides	Killer-Llmi	-	-	-	-	-
	Alkaline reag.	-	-	-	+	-
phenolic compounds and tannins	Ferric chloride	-	-	-	Trace	-
	Gelatin	-	Trace	-	Trace	-
	Lead acetate	-	Trace	-	Trace	-
	Dichromate	-	-	-	-	-
Terpenoids	Trim-Hill	-	-	-	-	-
	Liebermann-Burchard	++	-	Trace	+	+
Saponins	Foam test	-	-	-	-	-
	HgCl ₂	-	-	-	Trace	-
Coumarins	Mercuric chloride	Trace	-	-	-	+
Lignin	Galic acid	+++	Trace	-	+	-
	Furfulaldehyde	-	-	-	Trace	-
Quinones	Potassium hydroxide	-	-	-	-	-
Oil and fats	Spot test	++	+	Trace	+	++

IV.1 Définition

Les végétaux possèdent des métabolites dits « secondaires », par opposition aux métabolites primaires comme les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés varient selon les espèces et, malgré leur rôle, interfèrent clairement avec la relation entre les plantes et les organismes qui les entourent. Ceux-ci peuvent être des éléments essentiels dans la coévolution des organismes et des plantes, comme les parasites, les pathogènes et les prédateurs, mais aussi les pollinisateurs et les éleveurs. Ces différentes relations ont conduit à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003).

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures et ont une distribution limitée au sein de la plante, dont plus de 200 000 structures ont été définies, démontrant une surprenante diversité structurale. Ces molécules peuvent marquer de manière unique une espèce, une famille ou un genre de plantes, permettant d'établir une taxonomie chimique (Hartmann, 2007).

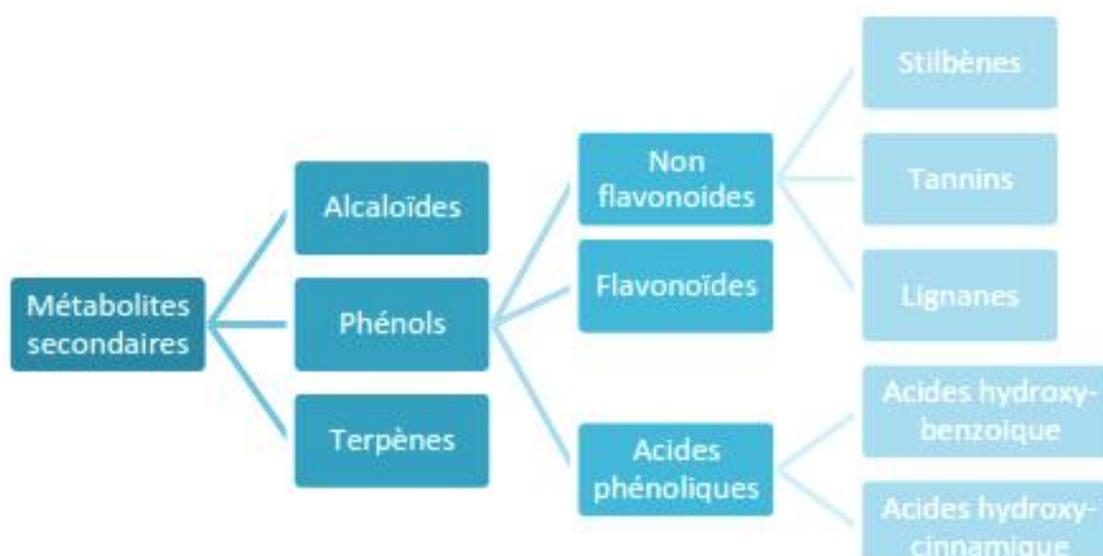


Figure 7. Arborescence des métabolites secondaires

IV.2 Les polyphénols

Les composés polyphénoliques sont généralement désignés comme un groupe diversifié de composés naturels contenant de multiples fonctionnalités phénoliques. Ces composés se trouvent couramment dans les plantes supérieures. Ils ont une valeur synthétique, médicinale et industrielle. Les polyphénols naturels sont connus pour avoir de nombreuses activités biologiques. Ils s'avèrent être des candidats potentiels pour une utilisation en tant que médicaments, par exemple les maladies cardiaques, les infections bactériennes, mutagenèse et les troubles neuraux.

D'un point de vue chimique, les polyphénols peuvent réagir avec des oxydants à un électron, ce qui empêche la formation de radicaux libres dans les systèmes biologiques. (Handique & Baruah, 2002).

IV.2.1 Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont classés en fonction du nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base et ces structures peuvent être libres ou attachées à des esters ou des glycosides. (Bruneton, 1999). Ils sont communément subdivisés en acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou dérivés de l'acide cinnamique), flavonoïdes, tanins, coumarines, lignines, (Cheynier, 2005).

Les polyphénols sont des molécules à plusieurs groupements phénoliques, c'est-à-dire un noyau aromatique, sur lequel un ou plusieurs groupements hydroxyle (-OH) sont présents. Quelques exemples sont donnés avec des sources de nourriture dans la **figure 8**.

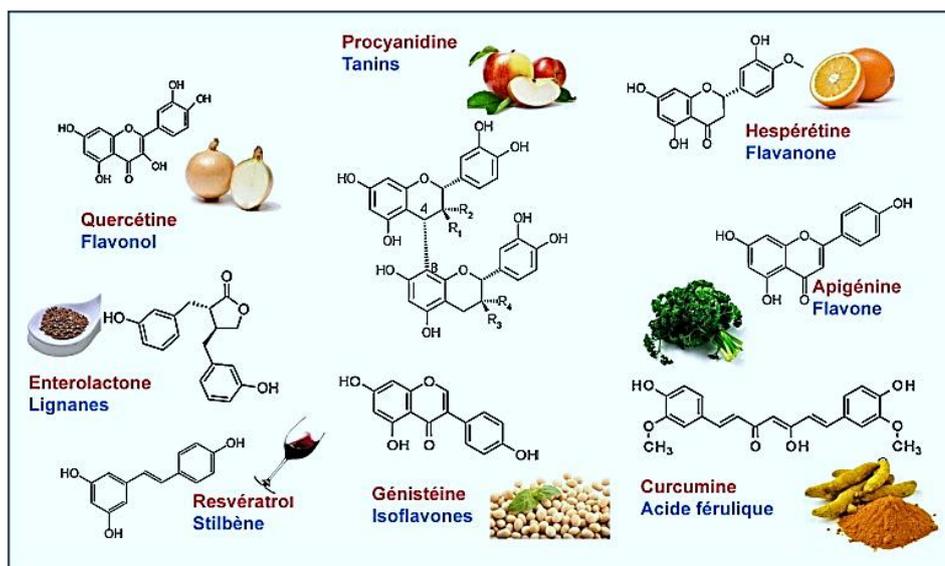


Figure 8. l'existence des polyphénols dans les sources de nourriture (Bennetau-Pelissero, 2014).

IV.2.2.1. Les acides phénoliques

Selon Bruneton (1999), les phénols simples sont des composés dans lesquels le cycle benzénique est attaché à un groupe hydroxyle libre ou engagés dans les liaisons hétérosidiques, éther ou ester. Les acides phénoliques sont des composés formés d'un ou plusieurs cycles benzéniques avec un ou plusieurs groupes fonctionnels carboxyle. Ils sont dérivés des acides benzoïque et cinnamique à base de C6-C1 et C6-C3 (Tsao, 2010). L'acide

hydroxy-cinnamique est plus fréquents que l'acide hydroxy-benzoïque (Pandey & Rizvi, 2009).

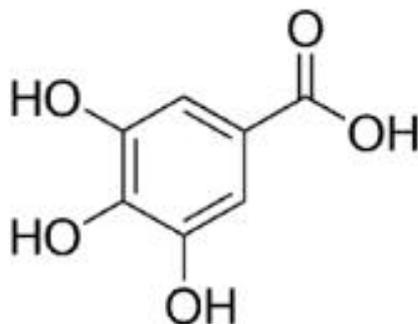


Figure 9. Exemple d'acide phénolique "l'acide gallique" (Szwajgier et al., 2017).

IV.2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à une grande famille de polyphénols, molécules connues pour leurs diverses activités biologiques. Les flavonoïdes sont omniprésents dans les plantes et presque tous les tissus végétaux peuvent synthétiser des flavonoïdes. La diversité naturelle est également grande. En fait, le nombre de structures flavonoïdes signalées au début des années 1990 était d'environ 4000 (Harborne, 1994), et plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Ghedira, 2005), et un grand nombre de molécules sont impliquées dans la structure de base de ces composés. Il est constitué d'un squelette carboné en (C6-C3-C6) de type phényl-2-benzopyrane. Ces 15 atomes de carbone séparés entre les deux cycles benzéniques (A et B) sont reliés par une chaîne linéaire de 3 atomes de carbone formant en général un hétérocycle après condensation avec un OH phénolique du noyau A (Harborne, 1994).

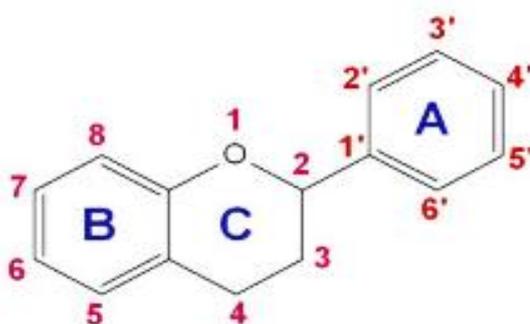


Figure 10. Structure de base des flavonoïdes (SMAIL, 2015).

IV.2.2.2.1. Rôles des flavonoïdes

IV.2.2.2.1.1. Pour la plante

Dans la physiologie végétale son rôle est la pigmentation, sont impliqués aussi dans la croissance et la reproduction des plantes (**Manach et al., 2004**). Ils travaillent également à protéger le corps contre les agents pathogènes soit origine virale ou bactérienne, prédateurs comme les insectes (**Bravo, 1998**).

En particulier, les flavonoïdes sont impliqués dans le transport des électrons dans les plantes. Lors de la photosynthèse, ils servent à protéger contre les effets nocifs des rayons lumineux (rayonnement UV) en agissant comme un antioxydant (**Havsteen, 2002**).

IV.2.2.2.1.2. Pour la santé humaine

IV.2.2.2.1.2.1. Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres

❖ Les radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui a un ou plusieurs électrons non appariés dans les couches d'électron voisin. Autrement dit, il n'est pas lié à un électron de spin opposé. Cela il est très réactif chimiquement avec les éléments voisins Les espèces radicalaires sont électrophiles et essaieront d'arracher des électrons aux molécules voisines afin d'apparier leur électron célibataire. Cet état est donc transitoire en microsecondes et le radical soit reçoit un autre électron, soit transfère l'électron libre à une autre molécule (lipide, protéine, acide nucléique) afin de rappairer son ou ses électrons célibataires et d'obtenir ainsi un état plus stable. C'est donc un intermédiaire réactif. Cela conduit à une réaction en chaîne qui génère de nouveaux radicaux libres, les molécules attaquées par les radicaux libres devenant à leur tour des radicaux libres. Ils sont indispensables à la vie car ils interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense d'un organisme. En effet, ils interviennent dans le fonctionnement de certaines enzymes (**Guillouty, 2016**).

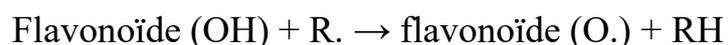
❖ Stress oxydatif

Le stress oxydatif se caractérise par un déséquilibre entre la génération d'espèces radicalaires et la capacité de défense antioxydante de l'organisme (**Durand & Beaudoux, 2011**).

La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. Cela peut favoriser l'émergence des cas pathologiques (cancer, maladies cardiovasculaires,

maladies dégénératives) et le vieillissement prématuré. L'une des principales fonctions déclenchées par le stress oxydatif est la mort cellulaire programmée ou l'apoptose (**Belaïch & Boujraf, 2016**).

Les propriétés les mieux décrites des flavonoïdes sont leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à inactiver et stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) hautement réactif, des radicaux libres comme : Radicaux hydroxyles (OH), anions superoxydes (O₂⁻) et radicaux peroxylipides issus des réactions suivantes :



➤ Propriétés inhibitrices des enzymes

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs d'enzymes alpha amylases, alpha glucosidase aldose réductase, phospholipase A2 et les enzymes de l'inflammation : cyclooxygénase et lipoxygénase.

➤ Propriétés anti-inflammatoires

Plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire, et comme mentionné ci-dessus sont capables d'inhiber et bloquer les enzymes qui interviennent dans l'inflammation.

➤ Propriétés hépatoprotecteur

Il est utilisé en médecine traditionnelle depuis des siècles pour traiter les maladies du foie.

➤ Propriétés anti-allergiques

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques, agit en inhibant les enzymes Favorise la libération d'histamine par les mastocytes et basophiles : AMP c phosphodiesterase et Ca⁺⁺ ATPase (**Ghedira, 2005**).

Matériel & méthodes

I. But et objectif du travail

Notre travail s'est concentré sur l'étude de la phytochimie du pollen de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L et *Phoenix canariensis*), dans le but d'évaluer les activités antioxydantes et enzymatique, anti-lithiasique, anti inflammatoire et antifongique dans les quatre extraits. Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie (labo 2), phytochimie (labo 5) et laboratoire de Mycologie (labo 9) du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

II. Matériel

II.1. Matériel Biologique

Dans notre étude, nous avons utilisé trois types de pollen appartiennent à trois différents pieds mâles (Dokkars) de l'espèce "*Phoenix dactylifera*". Ces pieds mâles ont des profils génétiques différent (**Chaouch khouane et al., 2020**). Ces pollens ont été récoltés de la région de Biskra, en période de pollinisation (Mars-Avril), où chaque extrait pour chaque espèce avait son propre codage (Extrait A, Extrait B, Extrait C). Ainsi, un autre type de pollen a été récolté à partir d'une autre espèce *Phoenix canariensis* de la région d'Ali-Mendjeli, Constantine et utilisée en tant que « Out groupe » pour faire la comparaison codée par Extrait D(OG).

Notant que ces deux espèces ayant un aspect morphologique très proche, quoique la première espèce est cultivée et la deuxième espèce est ornementale.

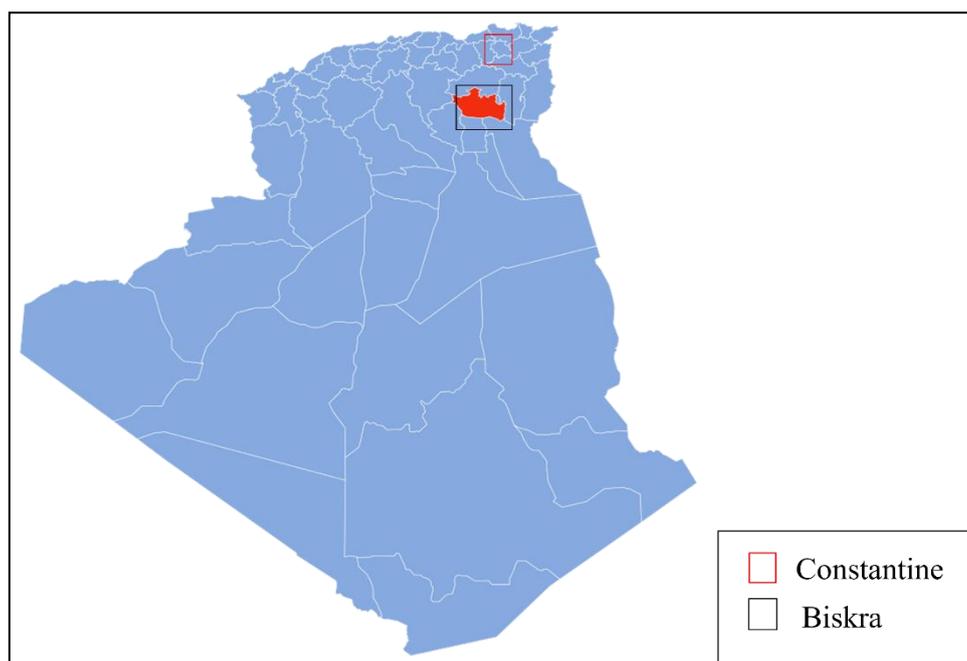


Figure 11. Localisation géographique des régions des échantillons.

II.2. Réactifs Chimiques et solvants

Dans cette étude nous avons utilisée :Extraits(A,B,C,D(OG)), Eau distillé, Méthanol, FCR (Folin-Ciocalteu réactif), Na_2CO_3 de 7,5% (Carbonate de sodium), Acide Gallique, Potassium acétate(CH_3COOK)1 M, Nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)10%, Quercetin, DPPH, ABTS, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Acide trichloracétique (TCA), Potassium ferricyanide $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Ferric chloride FeCl_3 , Phosphatebuffer(pH=6.6), Phenanthroline, Gaiacol, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Pomme de terre, Peroxyde d'hydrogène, Pyrocatechol, Enzyme α -amylase 1U, Amidon0.1%, HCl 1M, Solution IKI, BSA, Tampon tris HCl, Tampon phosphate(PH 6.9), Chlorure de calcium (CaCl_2), d'oxalate de sodium ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), Tampon Tris à pH 6.5, NaOH, Acide ascorbique et le trolox, Voltarène, Acide citrique, Acarbose, DMSO, Champignon (*Fusarium Oxysporum*), Agar, Glucose.

II.3. Matériel du laboratoire

Balance de précision de type Kern, Agitateur Magnétique de type Heidolph, pompe à vide de type Buchi V-710 Vacuum Pump, Evaporateurs Rotatif de type Buchi R-200, Ultrason de type Elma, Vortex de type WIZARD Advanced IR Vortex Mixer, Etuve de type Memmert, Bain Marie de type Julabo sw 22, Hotte chimique de type SHINSAENG, Micropipette de type Eppendorf, Lecteur de Microplaque de type EnSpire Multimode Plate Reader – Perkin-Elmer, Spectro- Photometre HILIOS EPLSILON Microscope inversé de type Leica D M1000.

III. Méthodes

III.1. Préparation des extraits méthanolique

III.1.1. Extraction solide-liquide

Cette technique est effectuée par la macération qui est une technique d'extraction la plus simple, elle consiste en la mise en contact de 8 g du matériel végétal pollen avec un système solvant MeOH/ H_2O estimée à 32 ml dans une proportion de (80/20, v/v). Le mélange est soumis à une agitation à l'aide d'un agitateur magnétique durant 24 heures à température ambiante (environ 20°C). L'extraction a été répétée trois fois pour chaque échantillon avec renouvellement du solvant chaque 24 h pour obtenir le maximum des métabolites secondaire. Après macération le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre.



Figure 12. Le pollen de palmier dattier sous forme poudre.

III.1.1.2. Evaporation

Les filtrats des quatre échantillons ont été rassemblés et évaporé en utilisant un évaporateur rotatif (**Figure 13**) L'élimination des solvants a été réalisée à 40°C et à pression réduite permettant ainsi la préservation des constituants de la dégradation thermique. Les résidus ainsi obtenus sont récupérés, pesés, et stockés.



Figure 13. Evaporateur rotatif.

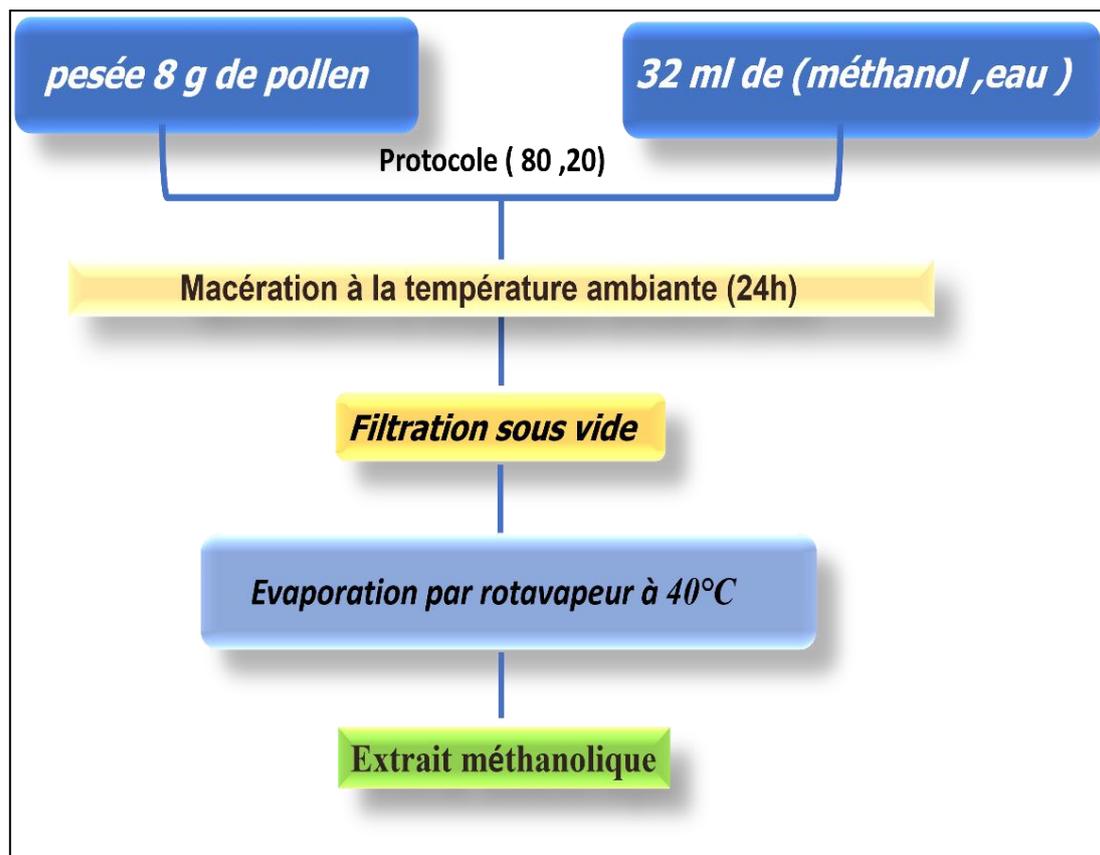


Figure 14. Protocole d'extraction des métabolites secondaires.

III.1.1.3. Rendement d'extraction

Nous pouvons déterminer le rendement des extraits en calculant le rapport suivant selon (Chniti, 2015) :

$$R (\%) = (PEB/PMV) \times 100$$

R : rendement (%).

PEB : poids de l'extrait brut (g).

PMV : poids de matière végétale (g).

III.2. Préparations des échantillons

Une quantité de 20 milligrammes de chaque extrait, a été dissoute dans 1 ml du méthanol, c'est à partir de cette dernière qu'une série de 7 dilutions a été réalisée dans des microtubes de 1.5 ml comme montré dans la (figure15) :

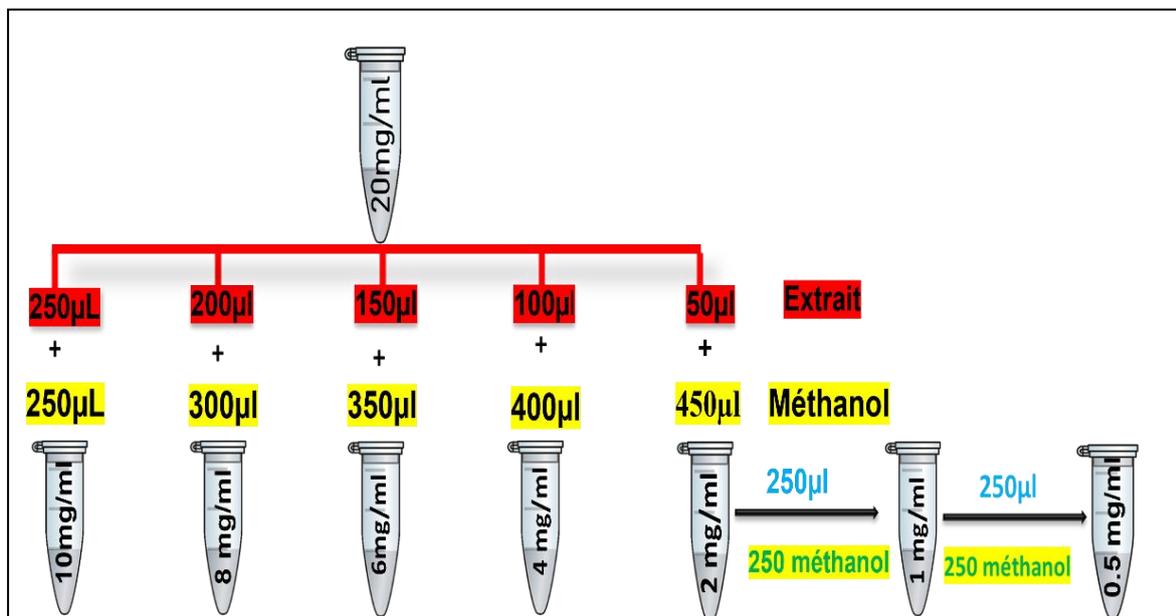


Figure 15. Série de dilutions et concentration respectives de chaque extrait.

La série de dilutions a été effectuée et utilisée pour évaluer le dosage et les activités antioxydantes et enzymatique, anti-lithiasique dans des microplaques. Les absorbances sont ainsi mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque (EnSpire Multimode Plate Reader - PerkinElmer) (Figure 16).



Figure 16. Lecteur de microplaque.

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire l'absorbance est mesurée à l'aide d'un Spectrophotomètre (HILIOS EPLSILON) (Figure 17).



Figure 17. Spectrophotomètre à cuve.

IV. Dosage des polyphénols

IV.1. Dosage des polyphénols totaux (TCP)

•Principe

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (FCR). Selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Müller *et al.*, (2010).

Le réactif FCR, qui consiste à un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3 PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3 PMo_{12} O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

• Mode opératoire

Un volume de 20 μ l de chaque extrait (1 mg/ml) a été transféré dans une microplaque de 96 puits. Ensuite, 100 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (FCR) avec une dilution de 1/10, et 75 μ l de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5 %) ont été ajoutés. Après incubation pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance à 765 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). La teneur en polyphénols a été déterminée à partir d'une courbe standard préparée avec de l'acide gallique et est exprimé en μ g équivalent acide gallique par mg d'extrait (μ g EAG/mg).

- Gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Une quantité de 1 mg d'acide gallique est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère (SM), les dilutions sont préparées dans des microtubes de 1.5 ml (**figure 18**).

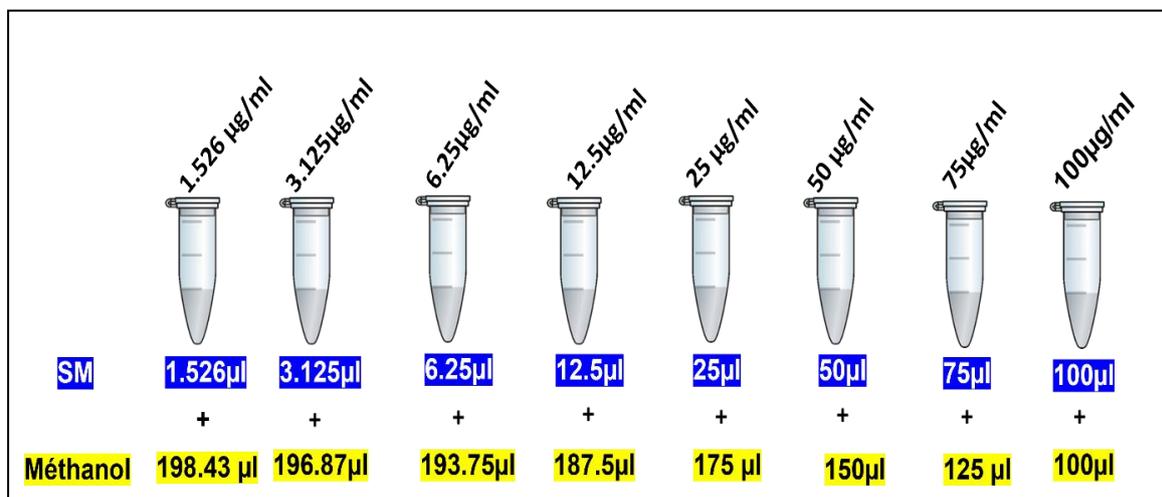


Figure 18. Série de dilutions et concentration respectives d'acide gallique.

- Mode opératoire

Les dilutions de l'acide gallique sont traitées de la même manière décrite précédemment pour les extraits.

IV.2. Dosage des flavonoïdes (TFC)

- Principe

La méthode repose sur le principe de dosage directe par le chlorure d'aluminium, en effet les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} ; la coloration jaunâtre produit est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribereau-Gayon, 1968**).

- Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes totaux est déterminé selon la méthode de **Topçu et al., (2007)** avec quelque modification. 50 µl de chaque extrait (1 mg/ml) sont transférés dans une microplaque 96 puits. Ensuite, 130 µl méthanol (MeOH) et 10 µl Potassium acétate (CH_3COOK) et 10 µl nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$) ont été ajoutés respectivement. Après incubation pendant 40 minutes à température ambiante dans l'obscurité, l'absorbance à 415 nm a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques. En parallèle, un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 µl extrait + 150 µl méthanol).

Les concentrations en flavonoïdes sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage tracée utilisant la quercétine comme standard. Les résultats sont rapportés en termes de μg équivalent de quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$).

- **La préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine :**

Une quantité de 1 mg de la Quercétine est dissoute dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution mère (SM), les dilutions sont préparées dans des microtubes de 1.5 ml (**figure 19**).

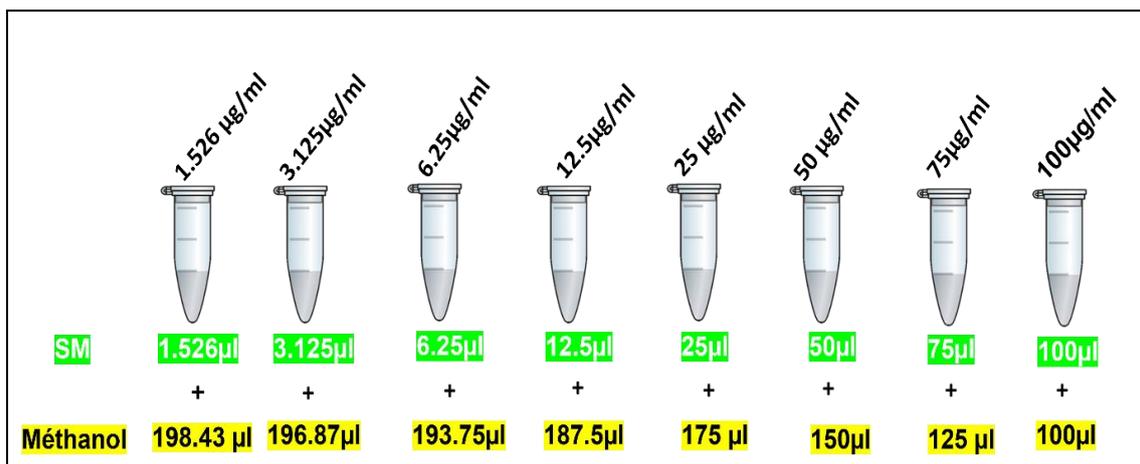


Figure 19. Série de dilutions et concentration respectives la Quercétine.

- **Mode opératoire**

Les dilutions de la quercétine sont traitées de la même manière décrite précédemment pour les extraits.

V. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons effectué les tests suivants :

V.1. Activité antiradicalaire par le test DPPH

- **Principe**

Le 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable et centré par l'azote qui porte un électron impair. Il est de couleur violet foncé. En présence d'antioxydants, il réagit avec eux par l'intermédiaire de deux mécanismes différents : une abstraction directe de l'hydrogène des groupes d'hydroxyles ou un processus de transfert d'électron, pour former un produit final stable qui est le diphényl-b picrylhydrazine coloré en jaune et qui absorbe à 517 nm (Blois, 1958).

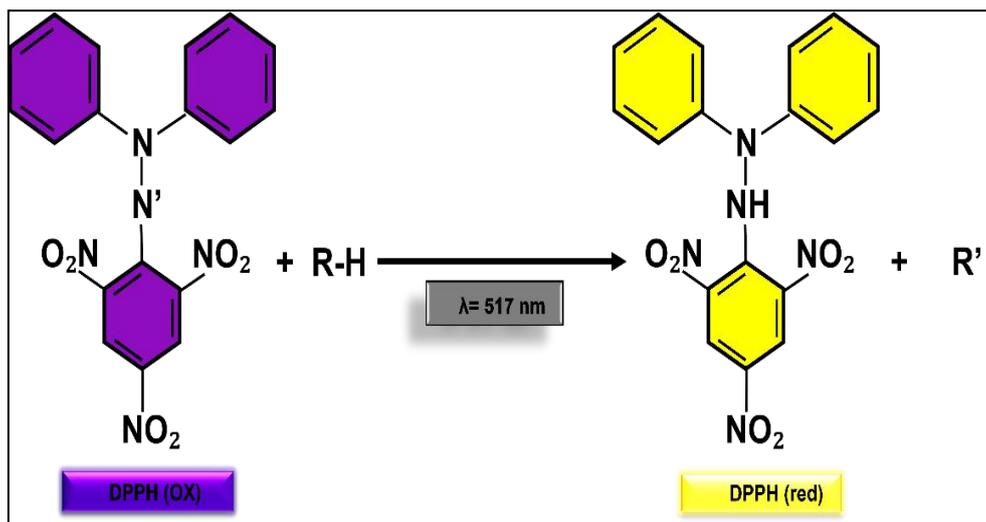


Figure 20. Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) (Ningjian & David , 2014).

• Mode opératoire

Le test anti radicalaire est réalisé selon la méthode de **Blois, (1958)**. Dans une microplaque 96 puits. Un volume de 160 µl de la solution DPPH ont été ajoutés à 40 µl de différentes concentrations d'extrait et incubé pendant 30 minutes à l'obscurité. Un contrôle négatif (blanc) est préparé en remplaçant l'extrait avec du méthanol. La lecture se fait dans un lecteur de microplaque à 517 nm. Les mesures ont été répétées trois fois et comparé à l'acide ascorbique et le trolox comme standards. L'activité anti oxydante de notre échantillon est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en suivant l'équation (**Blois, 1958**) :

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon.

V.2. Test de l'activité ABTS

•Principe

Le radical cation de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est stable à l'état libre. Dans cette méthode, une solution du cation ABTS•+ de couleur bleue est préparée au préalable par la réaction de l'ABTS (forme réduite) avec le persulfate de sodium (oxydant) pendant 16h. La réduction de l'ABTS•+ par l'addition d'un antioxydant entraîne la décoloration de la solution bleue dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à

734 nm. Cette diminution, dépend de l'activité antioxydante du composé testé mais souvent aussi du temps et de la concentration déterminée par la méthode de **Re et al., (1999)**.

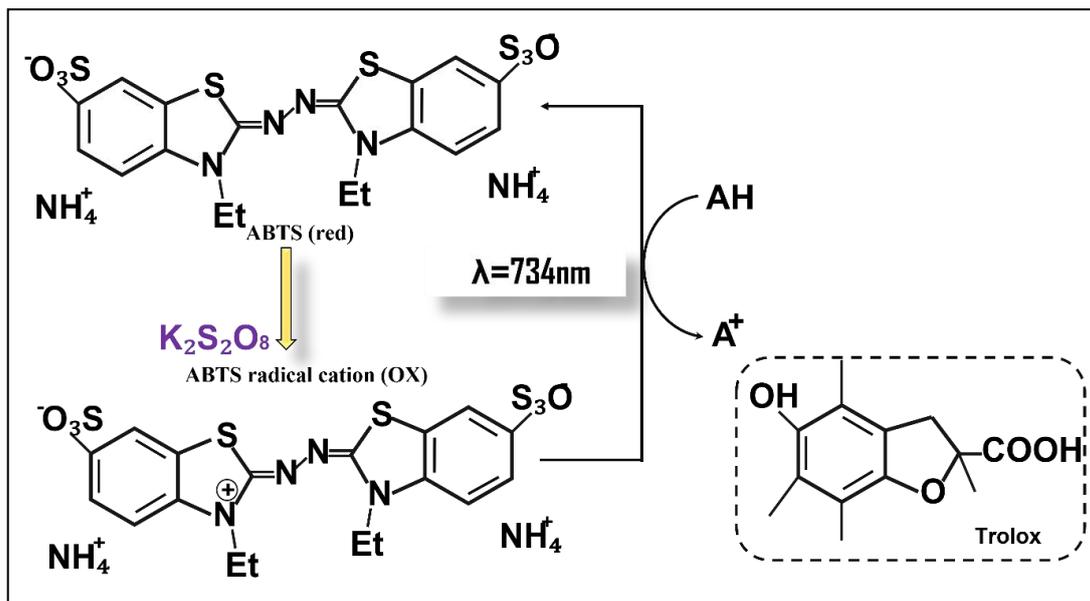


Figure 21. Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de ABTS^{•+} (**Gülçin, 2012**).

• Mode opératoire

La méthode rapportée par **Re et al., (1999)** est utilisée pour déterminer la capacité des extraits étudiés à réduire le radical ABTS^{•+}. La solution de l'ABTS^{•+} est préparée en faisant réagir 7 mM d'ABTS avec 2.45 mM de persulfate de sodium ($K_2S_2O_8$) pendant 12-16h. L'absorbance de la solution concentrée est ensuite ajustée à $0,700 \pm 0,020$ à la longueur d'onde 734 nm avant l'usage. Ensuite, 40 μ l de chaque extrait à différentes concentrations et 160 μ l de la solution ABTS^{•+} sont mélangés dans une microplaque. Après 10 min de réaction à température ambiante, la lecture de l'absorbance est effectuée à 734 nm en utilisant le lecteur de microplaque. Le test est répété 3 fois. Une 4^{ème} répétition est préparée comme blanc en faisant réagir 40 μ l d'eau et 160 μ l de la solution ABTS. L'acide ascorbique et le trolox sont utilisés comme des standards. L'activité antioxydante de nos échantillons est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} suivant l'équation (**Re et al., 1999**) :

$$\% \text{Inhibition} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon.

V.3. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

•Principe

La méthode de pouvoir réducteur est utilisée pour mesurer la capacité réductrice des ions de fer. Dans cette méthode, le fer ferrique complexé au ferrocyanure ($\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$) est réduit en fer ferreux ($\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$) présentant une couleur bleu-verte avec un maximum d'absorption à 700 nm (Hsu et al., 2006).

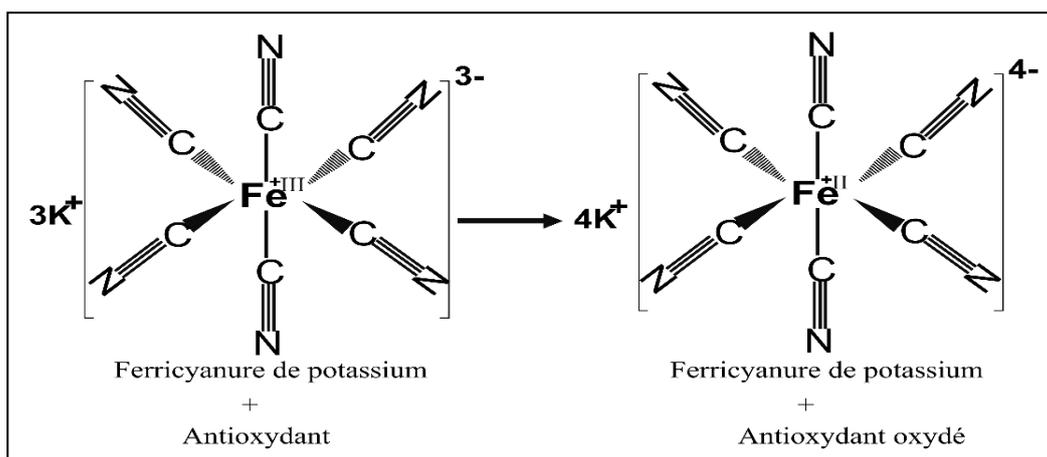


Figure 22. Mécanisme réactionnel du test FRAP (Ben-Moussa et al., 2020).

• Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des différents extraits est estimé en appliquant la méthode d'Oyaizu, (1986) avec quelques modifications. La réaction est effectuée dans une microplaque à 96 puits. Un volume de 10 μl d'extrait est additionné à 40 μl du tampon phosphate (pH=6.6) et 50 μl du potassium ferricyanide (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 minutes. Un volume de 50 μl d'acide trichloracétique (TCA) (10%) est ajouté par la suite, puis 40 μl d' H_2O et 10 μl de ferrichlorure FeCl_3 (0.1%) sont ajoutés respectivement. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 700 nm. L'acide ascorbique et le trolox sont utilisés comme des standards. L'activité antioxydante liée au pouvoir réducteur des extraits est exprimée en $A_{0.5}$ qui exprime la concentration d'extrait à 0.5 d'absorbance.

V.4. L'activité Phénanthroline

•Principe

Cette méthode est basée sur la réduction des ions fer (III) (Fe^{3+}) en fer (II) à partir de complexes 1,10-phénanthroline-Fe (III) par des antioxydants. L'ion ferreux forme

spécifiquement un nouveau complexe 10-phénanthroline-Fe (II) rouge-orange qui absorbe au maximum à 510 nm (Szydłowska-Czerniaka, 2008).

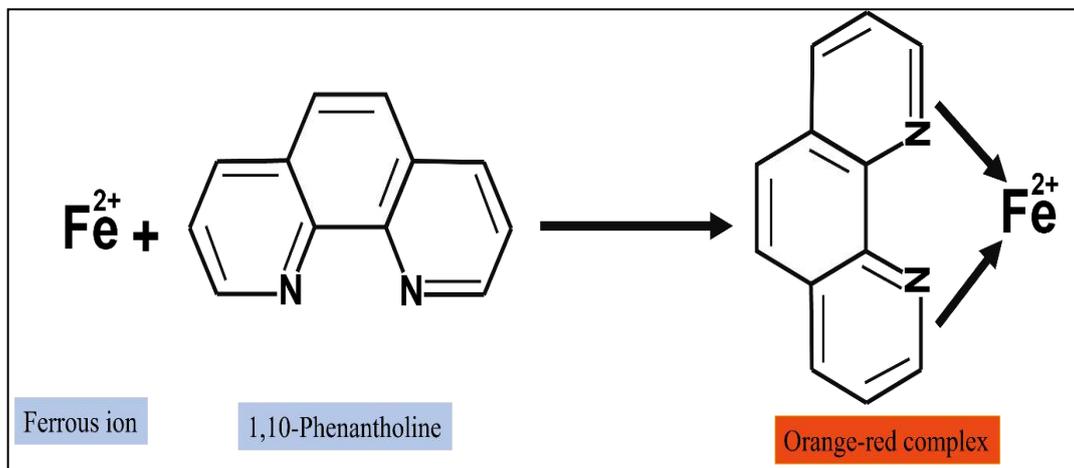


Figure 23. Formation de complexe Fe^{+2} –Phenanthroline (Agustina et al.,2015).

• Mode opératoire

Selon la méthode Szydłowska-Czerniaka, (2008) on peut mesurer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique dans le complexe phénanthroline-Fe (III). Sur une microplaque à 96 puits, 10 μl d'extrait sont mélangés avec 50 μl FeCl_3 , (0,2%), 30 μl phénanthroline (0,5%), et 110 μl de méthanol. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 minutes, puis l'absorbance est mesurée à 510 nm. Un blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le MeOH. Les résultats sont rapportés en $A_{0.5}$. L'acide ascorbique et le trolox sont utilisé comme des standards.

VI. Les activités inhibitrices des enzymes

VI.1. Activité anti-brunissement enzymatique

• Principe

Activité browning enzymatique au niveau de tissus des fruits et légumes. Cette réaction est due aux deux enzymes polyphénol oxydase (PPO) et peroxydase (POD). Et leur inhibition est nécessaire pour réduire la possibilité de dégradation. Donc importance de l'Activité anti-browning il a été prouvé que l'acide chlorogénique était plus efficace pour inhiber l'activité peroxydase (Hemeda & Klein, 1990).

La méthode rapportée par Ponce et al., (2004) est utilisée pour évaluer cette activité le protocole est suivi avec quelques modifications.

VI.1.1. L'activité anti-peroxydase (POD)

• Mode opératoire

Un volume de 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations et mélangé avec 60 µl d'extrait enzymatique (E) (**Annexe 5**). Après l'incubation du mélange pendant 5 min à 25°C, 200 µl du substrat (S1) sont ajoutés. Un contrôle négatif est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 470 nm. La relation suivante permet le calcul des pourcentages d'inhibition :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{(A_i - A_r)}{A_i} \times 100$$

Activité enzymatique initiale (A_i) : Δ DO/min mesurée en absence d'extrait.

Activité enzymatique résiduelle (A_r) : Δ DO/min mesurée en présence d'extrait.

VI.1.2. L'activité anti-polyphénoloxydase (PPO)

• Mode opératoire

Un volume de 100 µl de chaque extrait à différentes concentrations est transféré dans la microplaque 96 puits. 40 µl de l'extrait enzymatique (E) (**Annexe 5**), 60 µl de tampon phosphate (0.05 M, pH = 6.8) sont rajoutés respectivement. Après l'incubation du mélange pendant 5 min à 25°C. Un volume de 100 µl de solution de pyrocatechol à 0.2 M est ajouté. Un blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'absorbance est mesurée par la suite à une longueur d'onde de 420 nm.

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{(A_i - A_r)}{A_i} \times 100$$

Activité enzymatique initiale (A_i) : Δ DO/min mesurée en absence d'extrait.

Activité enzymatique résiduelle (A_r) : Δ DO/min mesurée en présence d'extrait.

VI.2. Inhibition de l'α-amylase

• Principe

L'α-amylase décompose l'amidon en composés non complexes qui ne peuvent pas réagir avec l'iode. L'inhibition de l'α-amylase par des inhibiteurs provoque une accumulation d'amidon, qui réagit avec l'iode pour former un complexe bleu-noir, dont l'absorbance est mesurée à 630 nm (**Zengin et al., 2014**).

• Mode opératoire

Cette activité est déterminée selon la méthode de **Zengin et al., (2014)** avec de légère modification. Sur une microplaque à 96 puits, Un volume de 25 µl de chaque extrait à différentes concentrations sont mélangés avec 50 µl de la solution d'α amylase (1 U/ml dans le tampon phosphate, 100 mM, pH=6,9, 6 mM NaCl). Après l'incubation du mélange pendant 10 min à 37 °C. Un volume de 50 µl d'amidon 0.1% est ajouté, le mélange est incubé une deuxième fois pendant 10 min à 37°C. Enfin, un volume de 25 µl d'HCl (1 M) est ajouté pour stopper la réaction. Afin de révéler l'activité enzymatique un volume de 100 µl de l'IKI (**Annexe 6**) est ajouté à tous les puits. L'absorbance est mesurée à 630 nm. En parallèle, un blanc est préparé en mettant 20 µl de méthanol avec 50 µl solution d'α-amylase et 50 µl solution d'amidon et 25 µl de HCl et 100 µl d'IKI.

La relation suivante permet le calcul des pourcentages d'inhibition (**Zengin et al., 2014**) :

$$\%Inhibition = 1 - [(A_c - A_e) - (A_s - A_b)] / (A_c - A_e)$$

A_c = Absorbance [Amidon+IKI+HCl+Vol de solvant d'extrait+Vol tampon Enzyme]

A_e = Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCL+Vol de solvant d'extrait]

A_s = Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl]

A_b = Absorbance [Extrait+IKI+125 µl de tampon]

VII. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique

Dans notre travail, on s'intéresse à évaluer le pouvoir inhibiteur des extraits de DPP sur la cristallisation oxalocalcique *In vitro*, suivi par une étude microscopique selon la méthode de **Abu Zarin et al., (2020)** avec quelques modifications.

L'évaluation de l'activité anti-lithiasique est effectuée sur une microplaque 96 puits utilisant différentes concentrations d'échantillon. Pour cela, une série de 6 dilutions a été réalisée dans des microtubes de 1.5 ml (**figure 24**).

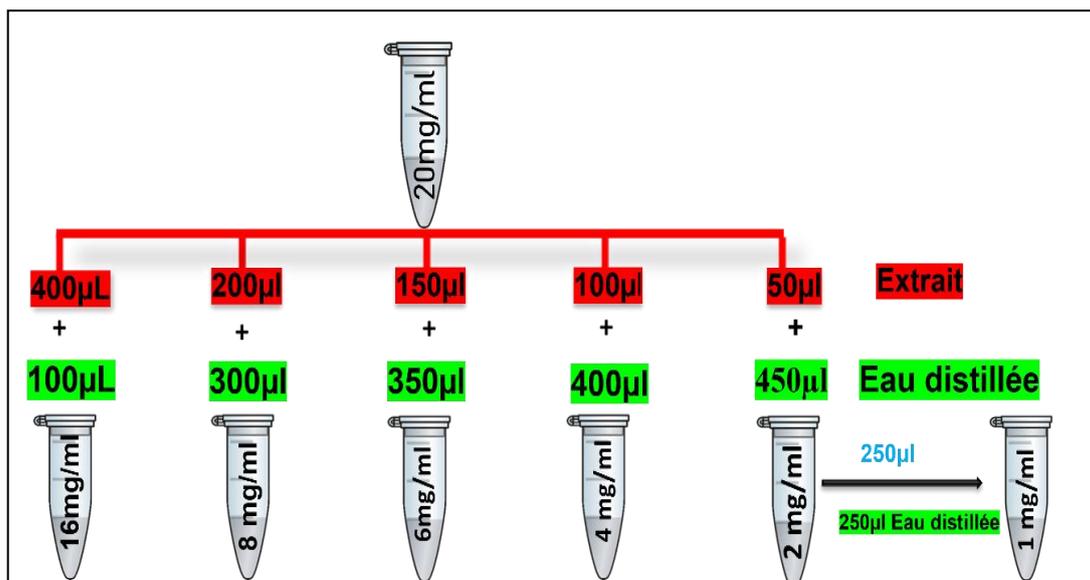


Figure 24. Série de dilutions et concentration respectives de chaque extrait pour évaluer l'activité anti-lithiasique.

VII.1. Test de nucléation

•Principe

Afin de connaître l'effet des extraits sur la formation des calculs (formation d'oxalate de calcium) le test de nucléation est lancé dans une microplaque à 96 puits.

•Mode opératoire

Un essai de nucléation a été effectué selon la méthode décrite par **Abu Zarin et al., (2020)** avec quelques modifications. Le chlorure de calcium (CaCl_2) (4 mmol/l) et l'oxalate de sodium ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) (7,5 mmol/l) ont été préparés dans un tampon Tris (Tris 0.05 mol/l et NaCl 0.15 mol/l) à pH= 6.5. Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 80 µl de solution de chlorure de calcium (CaCl_2) est mélangé avec 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations. Ensuite 40 µl d'Oxalate de Sodium a été ajouté au mélange pour induire la réaction de cristallisation. Le mélange a été incubé à 37 °C. L'activité de nucléation a été estimée en comparant la densité optique en présence d'eau distillée. L'acide citrique a été utilisé comme standard. La réaction d'inhibition a été mesurée à une absorbance de 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques pour 0, 30, 60, 180 et 360 min.

VII.2. Test d'agrégation

•Principe

L'étude a été poursuivie pour déterminer l'effet des extraits contre le démantèlement de complexe COM (cristaux monohydratés) dans une microplaque 96 puits *In vitro*.

•Mode opératoire

L'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium (CaOx) a été déterminé par la méthode de **Abu Zarin et al., (2020)** avec une légère modification. Le CaOx cristaux monohydratés (COM) ont été préparés par mélange chlorure de calcium (50 mmol/l) et oxalate de sodium (50 mmol/l). Les deux solutions sont mélangées dans un bain d'eau pendant 1 h à 60 °C pour la formation de cristaux de COM. les cristaux ont été refroidis à 37 °C. Les cristaux COM ont été préparés à une concentration finale de 0.8 mg/ml dans un tampon tris (Tris 0,05 mol/l et NaCl 0,15 mol/l) à un pH de 6,5. 40 µl d'extraits ont été ajoutés à la solution de cristaux COM (120 µl) et incubée à 37 °C pour 360min. Avec l'utilisation de l'acide citrique comme standards. L'activité d'agrégation a été estimée par mesure de la turbidité en utilisant un lecteur de microplaque en présence de l'extrait contre un témoin par mesure de l'absorbance à 620 nm pour 0, 30, 60, 180 et 360 min. Les pourcentages d'inhibition de la nucléation et de l'agrégation ont été calculés comme suit (**Abu Zarin et al., 2020**) :

$$\% \text{Inhibition} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon.

VII.3. Etude microscopique par microscope optique

Les échantillons obtenus par nucléation et agrégation sont observés au microscope inversé équipé d'un appareil photo numérique à 10X grossissement pour visualiser les cristaux d'oxalate de calcium formation et inhibition.

VIII. Anti-inflammatoire

•Principe

L'activité Anti-inflammatoire *In vitro* est déterminée par la méthode de **Kandikattu, (2013)** avec quelques modifications. Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation thermique (72°C) du BSA par les extraits.

• Protocol expérimental

Quatre concentrations différentes ont été préparées à partir des solutions mères en utilisant de l'eau distillée comme solvant pour faire une cascade de dilution. 0,5 ml de chaque extrait 16 mg dans 4 ml a été transféré dans quatre tubes 0,5 ml de BSA a été ajouté par la suite à tous les tubes.

En parallèle, des blancs étés préparés pour chaque concentration d'extrait en ajoutant 0,5 ml l'eau distillé à 0,5 ml d'extrait. Un control positif de la dénaturation du BSA est préparé par 0,5 ml de BSA et 0,5 ml de Tampon Tris-HCl. Après refroidissement des tubes La turbidité est mesurée à 660 nm par spectrophotomètre à cuve. Le Diclofénac de Sodium est utilisée comme standard (Bertrade & Hamzaoui, 2022) (figure 25).

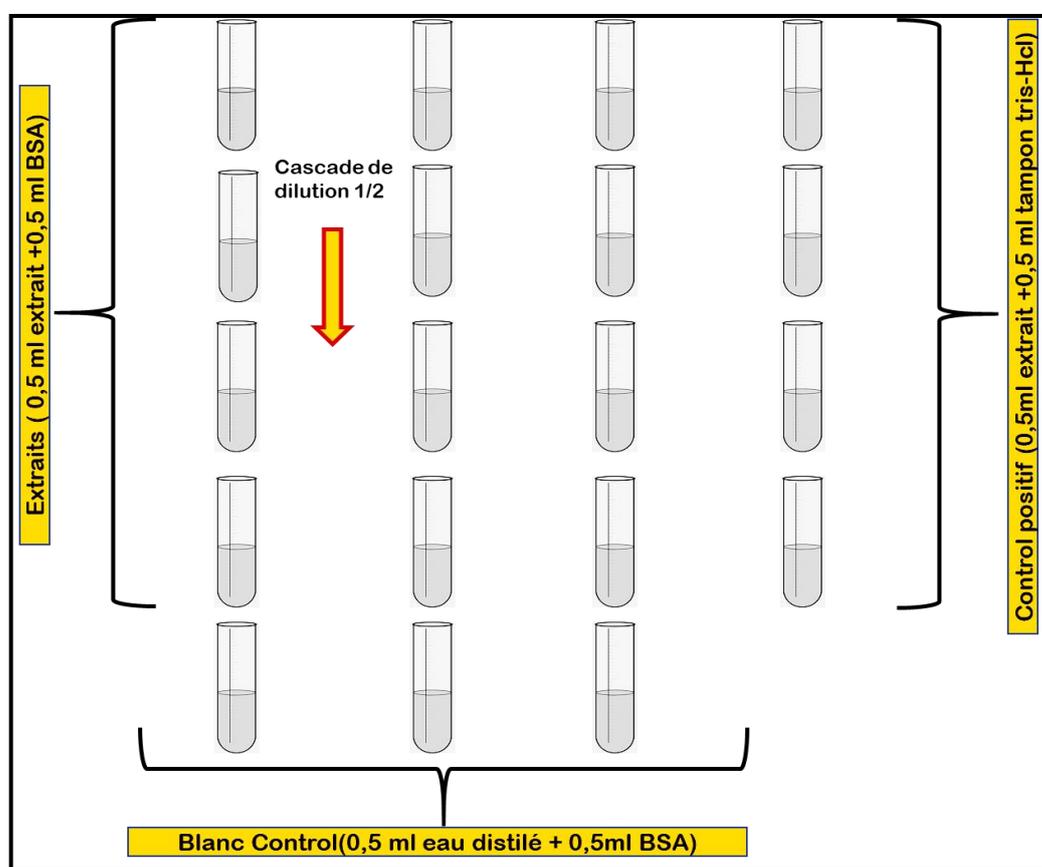


Figure 25. La méthode de manipulation de l'activité anti-inflammatoire.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit (Kandikattu, 2013) :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{Abs control} - (\text{Abs extrait} - \text{Abs blanc extrait})]}{\text{Abs control}} \times 100$$

Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle.

Abs extrait : correspond à l'absorbance de l'échantillon.

IX. Activité antifongique

• Principe

L'activité antifongique *In vitro* consiste à déterminer l'inhibition de la croissance de champignon « *Fusarium oxysporum* » en milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar), contenant le complexe à tester (Song et al., 2004).

• Protocol expérimental

Pour ce faire, nous avons tout d'abord préparé un milieu de culture PDA, environs 280 g de pomme de terre sont bouilli dans de l'eau distillée, puis filtré dans un erlenmeyer qui contient 21 g de glucose, le mélange est bien agité pour que le jus de pomme de terre et le glucose soit bien homogénéisé ; l'agar est ensuite ajouté sous agitation avant de stériliser le milieu pendant 2h à 121 °C. Après stérilisation et le refroidissement du milieu, les extraits sont ajoutés dans les dilutions déterminées (600 µg /ml ; 400 µg /ml ; 200 µg /ml). Enfin le milieu est coulé dans sous hotte dans des boites de pétris à raison de 25 ml par boite. En parallèle, deux boites de pétri ont été utilisé comme contrôle positif et négatif contenant le milieu PDA sans aucune addition et le milieu PDA additionné par 1 ml de DMSO respectivement. Un disque de 5 mm de diamètre est prélevé sur une jeune culture fongique du champignon *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL) strain 4287 (disponible au niveau du laboratoire de mycologie au CRBt) est déposé aseptiquement au centre de la boîte de pétri contenant le milieu PDA et l'extrait a étudié. Après 6 jours d'incubation à 25°C, la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée à l'échelle millimétrique et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance radiale dans les milieux contenant des extraits par rapport au contrôle selon la formule (Dennis et al., 1971).

$$PI (\%) = (C - T) / C \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition.

C : Croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA avec DMSO (témoin).

T : Croissance radiale, en mm, de l'agent phytopathogène sur milieu PDA contenant le complexe à tester.

La lecture est faite après 4-7 jours d'incubation à 25°C.

X. Analyse Statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs d'IC₅₀ (Concentration d'inhibition à 50%) et A_{0.5} (concentration réductrice) sont calculées par la méthode de régression linéaire.

Le test ANOVA à un seul facteur suivi par un test de multi-comparaison *tukey* a été utilisé dans le but de déterminer la différenciation entre les types de pollen utilisés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard avec un seuil de significativité

$p \leq 0.05$. Tous les calculs ont été effectués par le logiciel *XL STAT* 2016.

Résultats & discussion

I. Extraction et quantification des antioxydants

I.1. Rendement d'extraction des polyphénols

Les rendements d'extraction pour les quatre extraits sont reportés dans la figure suivante :

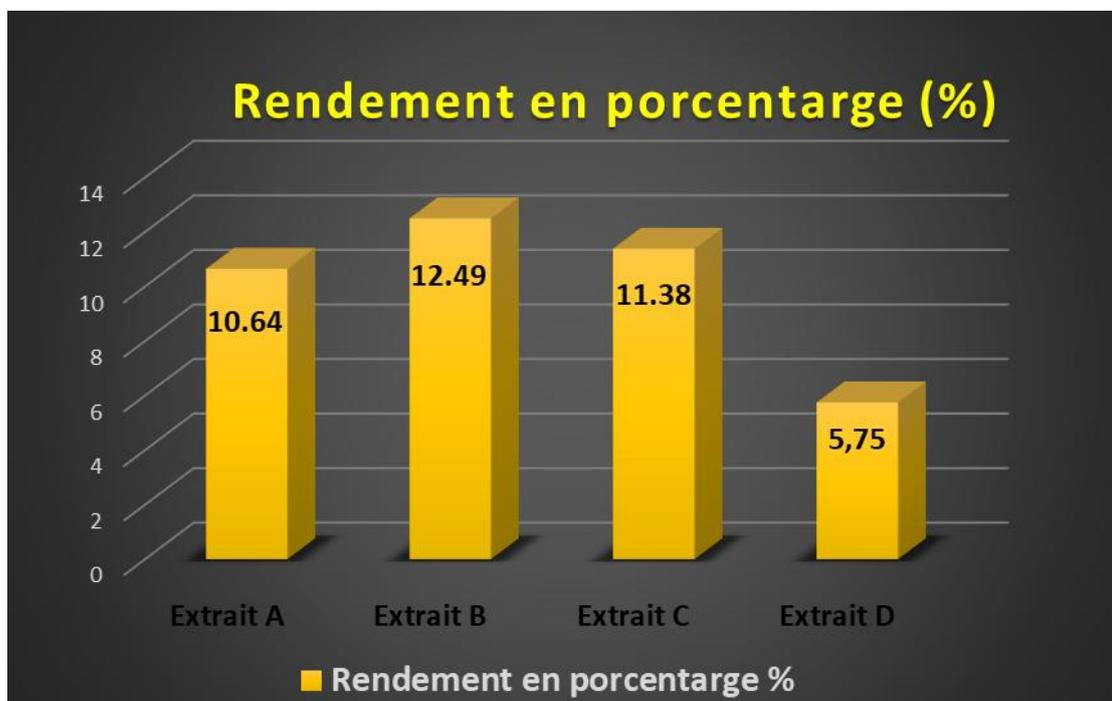


Figure 26. Rendement d'extractions en pourcentage des extraits.

Les résultats obtenus montrent une variabilité des rendements entre les quatre extraits. Les pourcentages varient entre 5.75% et 12.49%. L'extrait B, donne le rendement le plus élevé (12.49%) suivie par l'extrait C et A (11.38% et 10.64% respectivement). Cependant, l'extrait D (OG) présente le rendement le plus faible 5.75% (**Figure 26**).

II. Analyse quantitative des composés phénolique

II.1. Quantification des polyphénols totaux (TPC)

Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (**Ramalho & Jorge, 2006**). Les teneurs en polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de folin-ciocalteu (FCR) contre l'acide gallique comme standard, le maximum

d'absorbance est évalué à 765 nm. Le FCR est réduit en un complexe bleu lorsque le polyphénol est oxydé. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques oxydés (Boizot & charpentier, 2006).

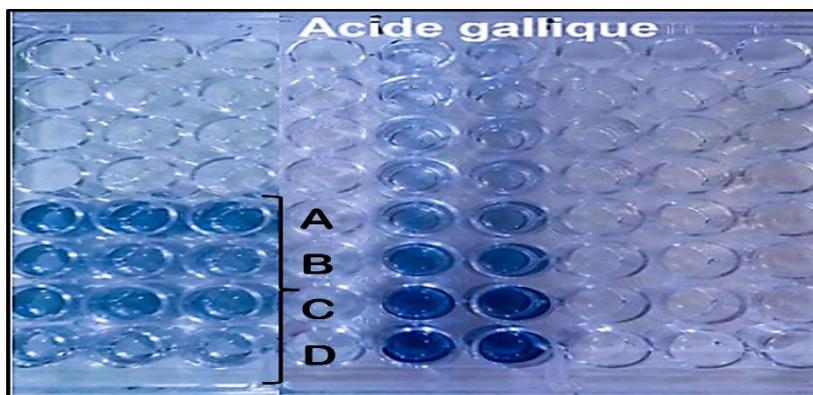


Figure 27. Photo de la microplaque du dosage des polyphénols totaux.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage ayant l'équation : $(Y=0.0079X+0.09)$ avec $R^2 = 0.9809$. La quantité des polyphénols a été déterminé par extrapolation sur la courbe du standard et rapportée en μg équivalent acide gallique par mg de poids sec de l'extrait (μg EAG/mg PS).

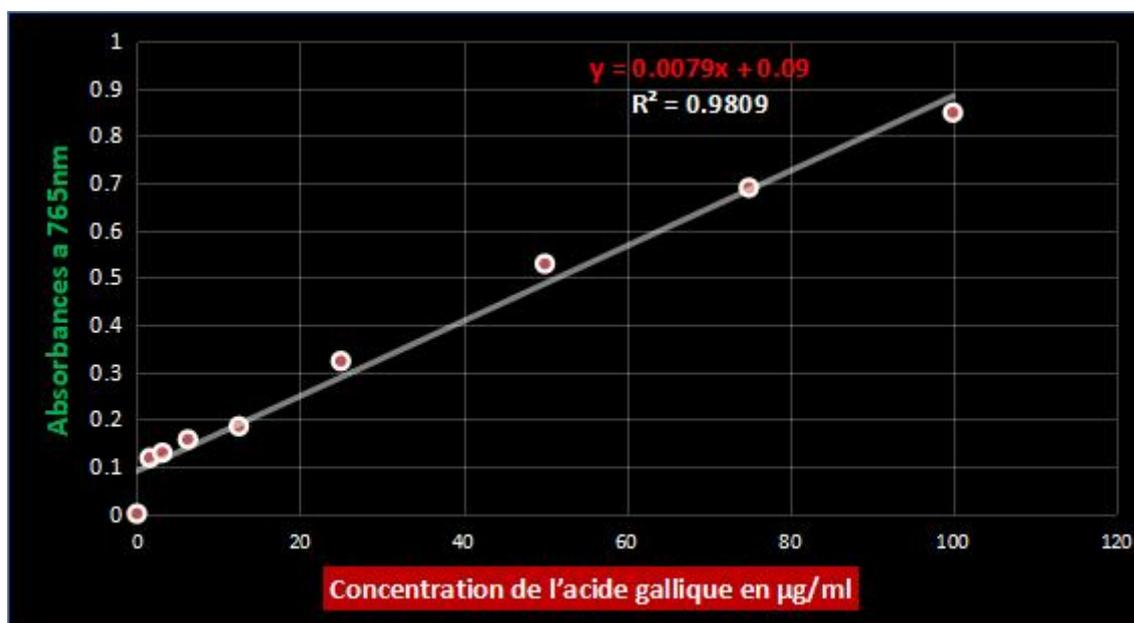


Figure 28. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme (figure 29).

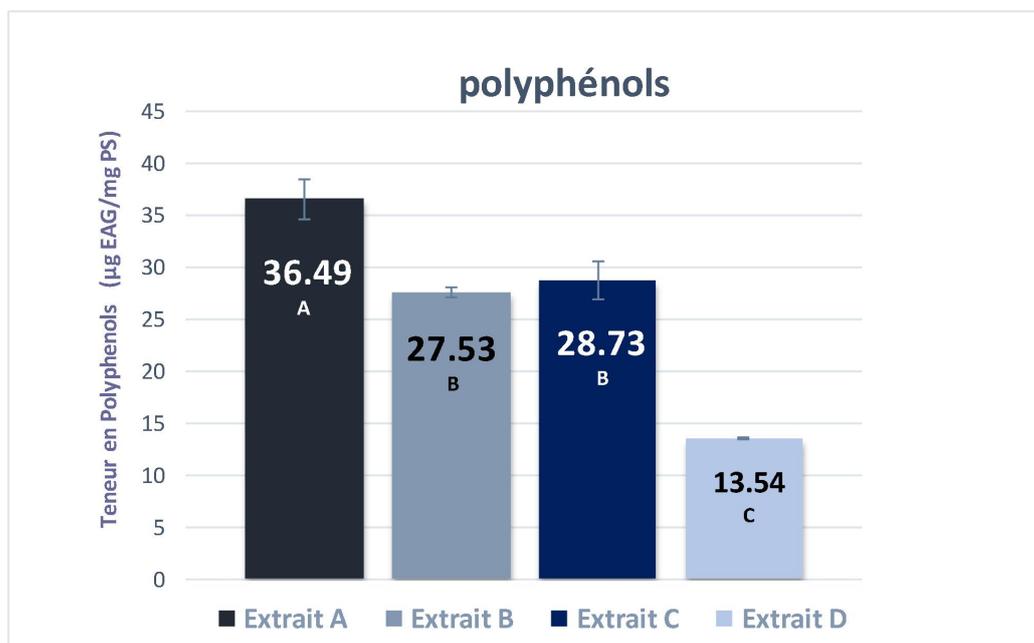


Figure 29. Evaluation des polyphénols totaux des extraits DPP.

Les résultats montrent que l'extrait A est le plus riche en polyphénols avec une teneur de 36.49 ± 2.00 µg EAG/mg, suivi par les extraits C et B (28.73 ± 1.79 et 27.53 ± 0.44 µg EAG/mg d'extrait, respectivement). Enfin, l'extrait D qui est le plus pauvre en polyphénols 13.54 ± 0.179 µg EAG/mg. D'après les résultats obtenus dans notre étude basés sur l'analyse de la variance ANOVA et le test de multi-comparaison *Tukey* des extraits de pollen. Une différence significative ($p < 0.05$) a été observée entre les extraits, néanmoins les deux extraits B et C sont proche appartiennent au même groupe.

Dans une étude réalisée par **Benouamane et al., (2022)** sur des échantillons de pollen de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) de différents types de cultivars DN qui ont été collectés au printemps 2019/2020 dans le Jardin des Ferdous de l'Etat algérien de Biskra, montre que la quantité en polyphénols totaux la plus élevée a été trouvée dans l'extrait acétonique suivi par l'extrait éthanolique et méthanolique ($20 \pm 4a$, $13 \pm 2c$ et 7 ± 0.9 mg GAE/g DW, respectivement). La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique est plus faible à celui trouvé dans notre étude. En revanche, la quantité de polyphénol dans l'extrait éthanolique est égale à la quantité recueillie dans l'extrait D de notre étude.

Une autre étude, cette fois tunisienne de **Daoud et al., (2019)**, sur deux échantillons de DPP en avril 2014 collectés dans deux régions tunisiennes (Tozeur et Kerkennah), où chaque extrait prenait un codage indiquant sa région (DPP-T et DPP-K respectivement). Les résultats

ont montré que la DPP-T extraite avait en général une teneur en polyphénols plus élevée que la DPP-K extraite, et cette teneur augmentait avec l'augmentation de la polarité du solvant.

Les résultats obtenus par ces chercheurs ont montré que le rendement des matières aqueuses est l'un des meilleurs solvants pour l'extraction des composés phénoliques par rapport aux autres solvants pour la DPP-T extraite, puisque sa quantité a été estimée à 237,74 9,58 mg/g, suivi par d'autres extraits (acétone 213,36±5,72, éthanol 211,11±10,02, chloroforme 133,14±6, éthyle 100,36 ±4,69, hexane 5,40 ±0,87 mg GAE/g de l'ordre) Ces résultats sont relativement élevés par rapport à nos extraits au méthanol.

Tandis que dans DPP-K extraite. L'extrait acétonique est riche en composés phénoliques avec une teneur de (197,62 ±7,41 mg GAE/g), suivi des extraits aqueux et chloroformiques. Hexane et Éthyle avec teneur (180.04 ±6.72, 53.53± 5.30, 48.29± 2.81, et 31.93 ±1.62 mg GAE/g respectivement) ces valeurs sont significatives par rapport aux valeurs obtenues dans nos extraits méthanolique. Alors que l'extrait à l'éthanol a le rendement le plus faible de 13,42 0,95 mg GAE/g, ce résultat est relativement similaire à celui de l'extrait D méthanolique dans notre étude. La différence des résultats est probablement liée à la différence dans des facteurs saisonniers ou la région où ils sont cultivés.

II.2. Quantification des flavonoïdes totaux (TFC)

La détermination quantitative des flavonoïdes a été effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium, elle se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium (Al^{3+}), ayant une absorbance maximale à 430 nm. La couleur jaune produite indique la présence des flavonoïdes dans le mélange réactionnel. La quercétine a été utilisée comme étalon, les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage ayant l'équation : $Y=0.0085X+0.0241$ avec $R^2=0.9915$. La quantité des flavonoïdes a été rapportée en μg d'équivalent de la quercétine par mg de poids sec de l'extrait (μg EQ/mg PS).

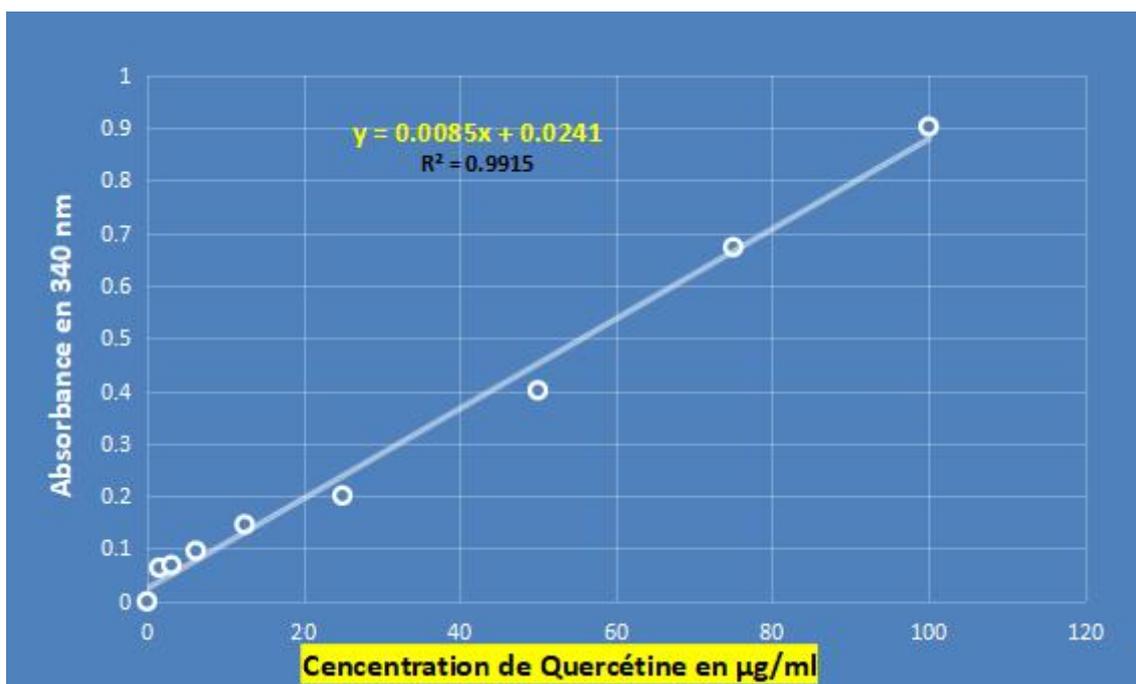


Figure 30. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont illustrés dans la figure au-dessous.

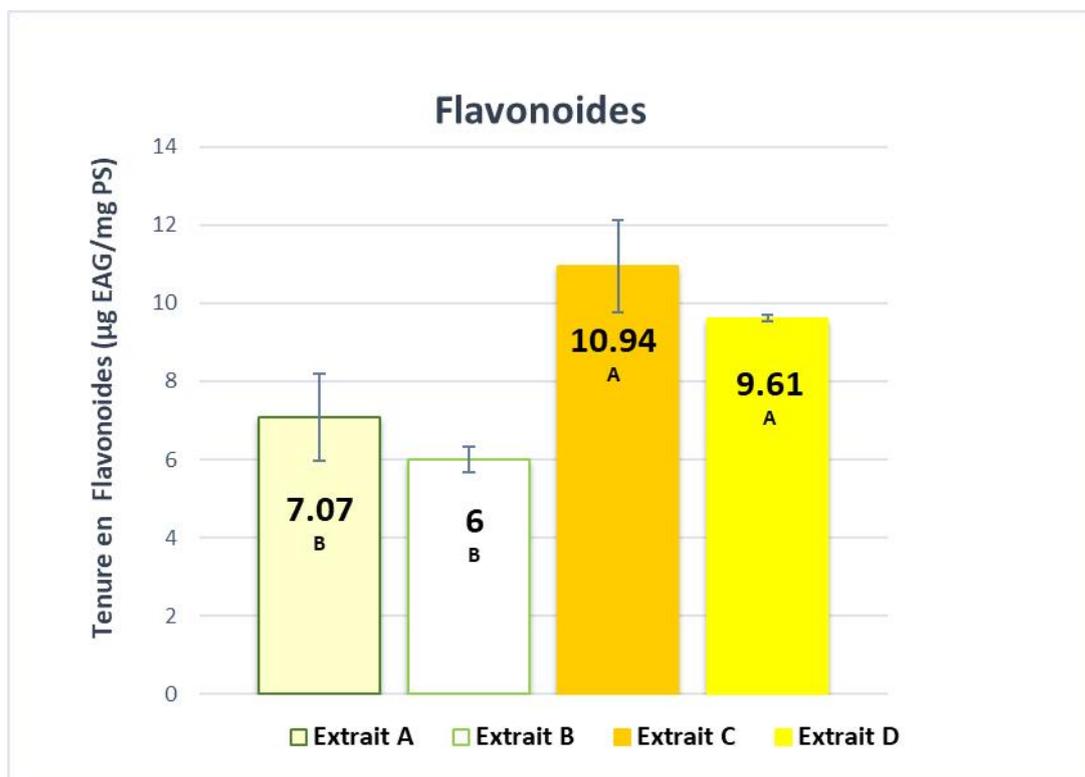


Figure 31. Evaluation des flavonoïdes des extraits DPP.

D'après la (**figure 31**), les extraits C et D représentent les extraits les plus riches en flavonoïdes avec 10.94 ± 1.17 et 9.61 ± 0.07 $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait, respectivement. Suivi par les extraits A et B qui ont montré les teneurs les plus faibles avec 7.07 ± 1.11 et 6 ± 0.31 $\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait respectivement.

D'après les résultats de notre étude basés sur l'analyse de la variance ANOVA et le test de multi-comparaison *Tukey* des extraits de pollen. Les deux extraits B et A sont proches et appartiennent au même groupe alors que les deux extraits C et D appartiennent à un autre groupe.

Selon **Benouamane et al., (2022)** l'extrait acétone avait la plus forte teneur en flavonoïdes avec ($12.7 \pm 1.2a$ mg EQ/g PS), suivi par l'extrait méthanolique avec ($7.2 \pm 1.2b$ mg EQ/g PS) Cette valeur est proche de celle que nous avons obtenue dans l'extrait A de notre étude. Alors que l'extrait éthanolique possède la teneur la plus basse ($5.2 \pm 0.9b$ mg QE/g DW) par rapport aux extraits de cette expérience et de la nôtre.

Dans une autre étude réalisée par **Daoud et ses collaborateurs en (2019)**, ils ont trouvé que le meilleur solvant pour l'extraction des flavonoïdes est le solvant acétone avec une teneur de 75.10 ± 4.37 mg GAE/g pour la DPP-T extraite suivi par l'extrait aqueuse 73.59 ± 5.62 mg GAE/g et l'extrait éthyle 69.72 ± 3.76 mg GAE/g, puis l'extrait éthanolique et chloroformique avec des teneurs de 22.25 ± 2.86 et 7.69 ± 1.13 respectivement. Alors que l'extrait Hexane possède la teneur la plus basse 5.40 ± 0.87 mg GAE/g par rapport aux extraits de cette expérience et de notre expérience.

Tandis que l'extrait acétonique est riche en composés flavonoïdes avec une teneur de (30.85 ± 1.98 mg GAE/g) dans DPP-K extraite Suivi par l'extrait aqueuse (27.05 ± 1.84 mg GAE/g). Ces résultats sont relativement élevés par rapport à nos extraits au méthanol. Alors que les extraits d'Éthyle et Hexane contiennent la quantité de chloroforme égale à ce que nous avons obtenu dans nos résultats (9.48 ± 1.51 , 8.85 ± 0.83 mg GAE/g respectivement). Alors que l'extrait éthanolique et Chloroformique possèdent la teneur la plus basse (4.29 ± 0.31 , 3.79 ± 0.26 mg GAE/g respectivement) par rapport aux extraits de cette expérience et de notre expérience.

A travers nos expériences et celles d'autres chercheurs, il a été observé que les polyphénols et flavonoïdes présents dans tous les extraits de PPD avec des teneurs différentes d'un extrait à l'autre. Ceci est cohérent avec ce qu'**Abdel-Shaheed et al., (2021)** ont trouvé, car ils ont confirmé que le pollen du palmier dattier égyptien (variété Al-Hayani), qui a été acheté sous forme de poudre fin Mars 2020, contenait des polyphénols et des flavonoïdes,

mais avec différentes compositions et concentrations chimiques. Les mêmes résultats sont atteints par **El-Kholy et al., (2019)**.

Autres facteurs peuvent influencer le rendement de TPC et TFC tels que les méthodes d'extraction, les facteurs génétiques, les variations géographiques, les changements climatiques, la qualité du sol et la saison de récolte (**Daoud et al., 2019 ; TAMMA et al., 2020**).

III. Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes utilisées pour déterminer l'activité antioxydante d'un échantillon. Dans cette étude, les propriétés antioxydantes des extraits méthanoliques de DPP ont été déterminées par les quatre méthodes suivantes : Le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du radical-cation ABTS, le test du pouvoir réducteur FRAP et l'activité de phénanthroline.

III. 1. Activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante des quatre extraits DPP (méthanolique) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm. La cinétique de décoloration de ce radical a été suivie après addition de 40 μ l de chacune des concentrations A, B, C, D.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus montrent que les extraits possèdent une activité antiradicalaire exprimée par les concentrations d'extraits et standards qui piègent 50 % du radical DPPH (IC_{50}). La valeur IC_{50} est liée à la capacité antioxydante d'un composé, donc, plus la valeur d' IC_{50} est basse, plus l'effet antioxydant est grand. $1895.76 \pm 14.29 \mu\text{g/ml}$.

Parmi les extraits testés, l'extrait A représenté l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de $954.1 \pm 109.1 \mu\text{g/ml}$. Suivi par les extraits C et D avec des IC_{50} : $1137.15 \pm 154.01 \mu\text{g/ml}$ et $1145.57 \pm 62.18 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Cependant, l'extrait B représenté l'extrait le plus faible avec une IC_{50} $1895.76 \pm 14.29 \mu\text{g/ml}$ donc très faible activité.

En comparaison avec les standards tous les extraits testés s'avèrent très faible par rapport l'acide ascorbique et le trolox représentant des IC_{50} égaux à 4.39 ± 0.01 et $5.12 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les résultats sont représentés dans la (**Figure 32**).

D'après les résultats obtenus dans notre étude basée sur l'analyse de la variance ANOVA et le test de multi-comparaison *Tukey* des extraits de pollen, il n'y a pas de

variabilité significative entre les extraits de pollen (Extrait A, Extrait C, Extrait D) avec un $p < 0.05$.

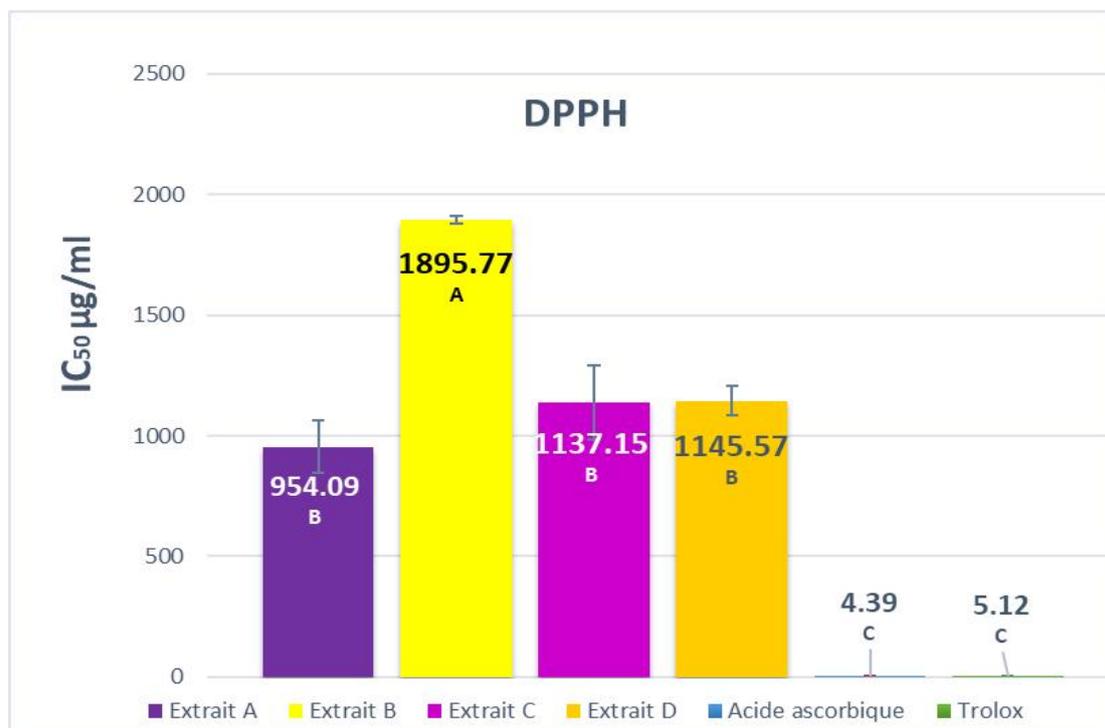


Figure 32. Valeurs d'IC₅₀ de l'activité DPPH des extraits de DPP.

On remarque que l'extrait A était une activité anti radicalaire DPPH la plus efficace, suivi par les extraits C et D qui présentent une activité moyenne par rapport l'extrait A contre l'extrait B qui a montré l'activité la plus faible.

Selon l'étude de **Daoud et al., (2019)**. Les résultats ont indiqué que l'extrait d'acétone DPP-T présentait la meilleure activité de piégeage du DPPH avec une IC₅₀ de $46,56 \pm 0,28$ µg/ml par rapport aux d'autres extraits de divers solvants comme l'eau, l'éthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et l'hexane qui ont des faibles activités, pour la DPP-K aucune activité détectée. En comparaison, Nos extraits présentent une activité faible qui pourraient dû à la différence dans les méthodes d'extraction, les facteurs génétiques, les variations géographiques, les changements climatiques, la qualité du sol et la saison de récolte.

Autre étude réalisé par **Benouamane et al., (2022)** sur le pollen du palmier dattier d'Algérie *Phoenix dactylifera* du cultivars Deglet Nour (DN) en utilisant trois solvants acétone, éthanol et méthanol. Les valeurs de IC₅₀ des échantillons présentaient une faible capacité antioxydant (500 ± 30 ; 2200 ± 300 ; 3600 ± 900 µg/ml) dans l'ordre des solvants.

On remarque que l'acétone est le meilleur solvant suivi par l'extrait du l'éthanol et finalement le méthanol qui donne le moins d'activité antioxydant. Nos résultats dans la phase méthanolique sont supérieurs à les leurs.

III.2. Test de l'activité ABTS

Les résultats sont exprimés en termes d'IC₅₀ représentant la concentration nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical ABTS⁺ de 50% et la plus petite valeur d'IC₅₀ correspond à la plus grande activité antiradicalaire. Parmi les extraits testés, l'extrait A représenté l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 221,08±3.71 µg/ml. Suivi par l'extrait C avec une IC₅₀ = 253.05±22.05 µg/ml. Cependant, les autres extraits : extrait D, extrait B, ont présenté des IC₅₀ plus faible de l'ordre de 504.54±17.66 et 658.53±0.35 µg/ml respectivement. En comparaison avec les standards tous les extraits testés s'avèrent moins important à celle de l'acide ascorbique et le Trolox, qui présentent des IC₅₀ égalent à 3.04±0.05, 3.21±0.06 µg/ml dans l'ordre.

D'après les résultats obtenus dans notre étude basée sur l'analyse statistique des extraits de pollen, une différence significative a été signalé entre les différents extraits des pollens utilisés (p<0.05), néanmoins les deux extraits A et C appartiennent au même groupe.

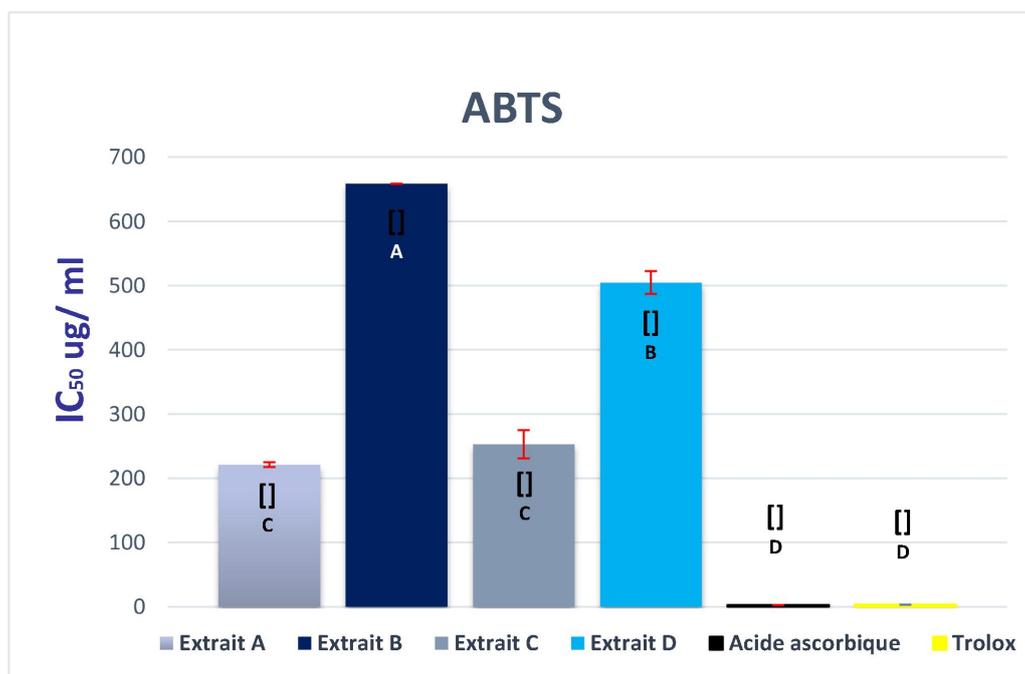


Figure 33. Valeurs d'IC₅₀ de l'activité ABTS des extraits de DPP.

III.3. Pouvoir réducteur de fer (FRAP)

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques de DPP a été évaluée en utilisant la méthode du pouvoir réducteur. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction du fer ferreux (Fe^{3+}) au fer ferrique (Fe^{2+}). Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung, 2002**).

Dans cette étude, nous avons testé les quatre extraits de DPP mais seulement les extraits A et C ont présenté des IC_{50} quantifiable (**figure 34**). L'extrait A représenté l'extrait le plus actif avec une concentration correspond à $A_{0,5}$ de $1532 \pm 190.21 \mu\text{g/ml}$. Suivi par l'extrait C avec une concentration de $A_{0,5} = 1663.34 \pm 4.72 \mu\text{g/ml}$. Les autres extraits B et D ont alors des concentration correspondent à $A_{0,5}$ supérieure à 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Par rapport aux standards, tous les extraits testés se sont avérés très faible par rapport à l'acide ascorbique et le Trolox, avec des valeurs de $3,62 \pm 0.29$ et $5.25 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ainsi, le test *Tukey* montre que les deux extraits A et C sont proche appartiennent au même groupe.

Au contraire. Selon la recherche conjointe palestinienne préparée par **Sadeq et al., (2021)** L'extrait d'éthanol de pollen de palmier (échantillon de la zone palestinienne) est très efficace car la valeur $A_{0,5}$ a été estimée à $0.585 \pm 0.026 \text{ mg/ml}$.

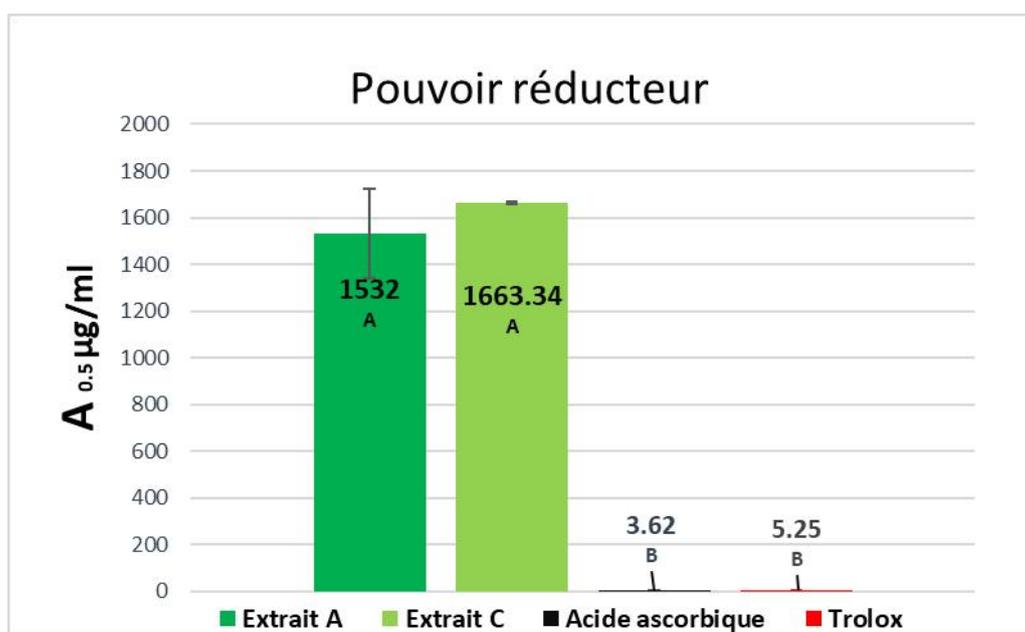


Figure 34. Valeurs $A_{0,5}$ du pouvoir réducteur des extraits de DPP.

III.4. L'activité Phénanthroline

Ce test est basé sur la réduction de Fe^{+3} par un agent antioxydant pour donner l'ion Fe^{+2} qui ensuite réagit avec la phénanthroline pour donner un complexe de couleur rouge orangé.

D'après les résultats obtenus dans notre étude basée sur l'analyse de la variance ANOVA et le test de multi-comparaison *Tukey* des extraits de pollen, une différence significative ($p < 0.05$) a été observée entre les deux espèces *Phoenix dactylifera L* et *Phoenix canariensis*. Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits présentent une activité faible de réduction de fer ferrique dépendante à la concentration par comparaison aux l'acide ascorbique et trolox (3.08 ± 0.02 , 5.2 ± 10.27 $\mu\text{g/ml}$ respectivement).

D'après les résultats représentés dans l'histogramme, on constate que l'extrait C a une capacité antioxydante plus élevée que celle des autres extraits avec $A_{0.5} = 132.88 \pm 0.82$ $\mu\text{g/ml}$. Suivi par l'extrait A (145.42 ± 0.59 $\mu\text{g/ml}$), l'extrait B (151.67 ± 10.21 $\mu\text{g/ml}$) respectivement. Tandis que l'extrait D présente une activité antioxydant supérieure à 240 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 35**).

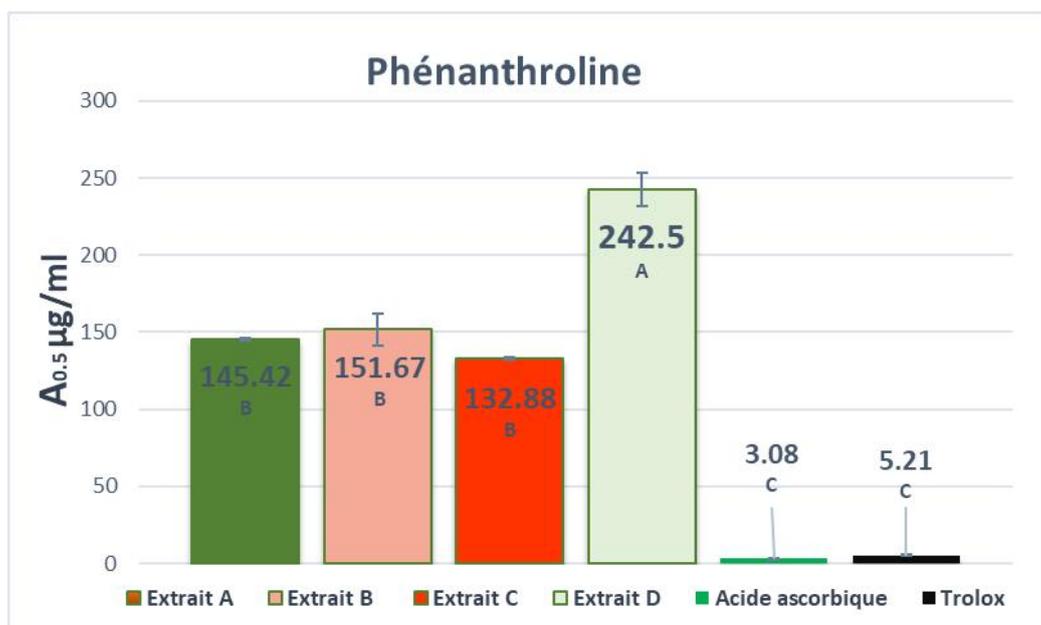


Figure 35. Valeurs $A_{0.5}$ de la phénanthroline des extraits de DPP.

IV. Evaluation des activités inhibitrices des enzymes

IV.1. Activité anti – brunissement enzymatique

L'activité inhibitrice des enzymes a été mesurée par la méthode colorimétrique. L'activité est représentée par l'action de deux enzymes polyphénol oxydase (PPO) et peroxydase (POD).

Les résultats de test de l'activité anti – brunissement enzymatique ont montré que tous les extraits présentent une IC_{50} supérieurs à 2000 $\mu\text{g/ml}$.

IV.2. Inhibition de l' α -amylase

Un léger changement de couleur a été obtenu, avec des proportions variables d'un extrait à l'autre, les extraits (A, B, C, D) contiennent une faible activité (la meilleure valeur attribuée à l'extrait D(OG)). Alors tous les extraits présentent des IC_{50} supérieurs à 2500 $\mu\text{g/ml}$.

V. Evaluation du pouvoir anti-lithiasique

Par observation microscopique, il a été conclu que les quatre extraits méthanoliques contiennent une faible activité. Tous les extraits présentent des IC_{50} supérieurs à 4000 $\mu\text{g/ml}$.

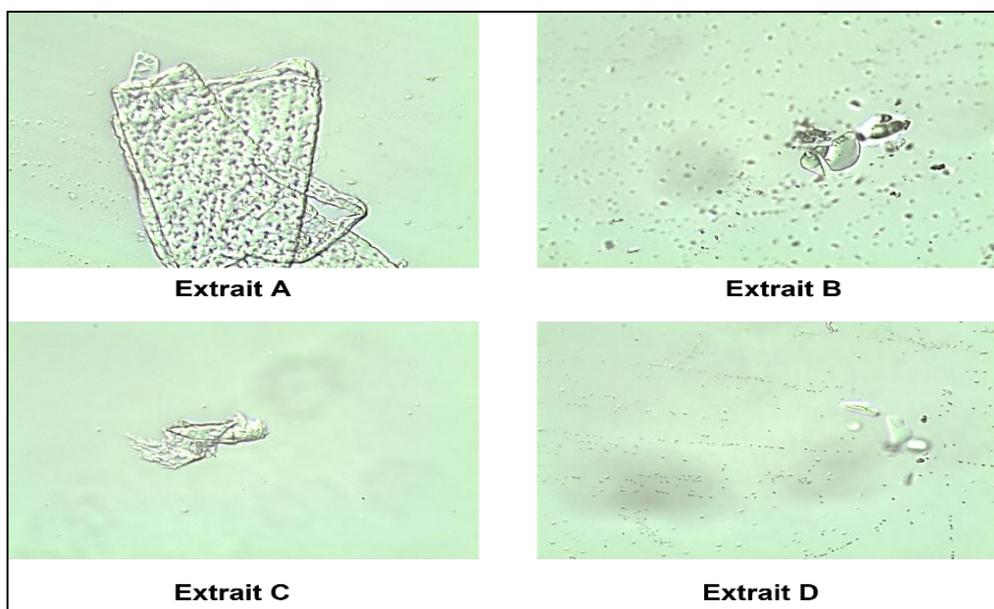


Figure 36. Observation microscopique de l'agrégation des cristaux d'oxalate de calcium (Gr.x 10).

VI. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits DPP a été évaluée *In vitro*, Le principe de cette technique repose sur la capacité des extraits à inhiber la dénaturation du BSA (albumine sérique bovine). Provoquée par la chaleur. Réalisé par **Kandikattu , (2013)**. On remarque que tous les extraits présentent une IC_{50} supérieurs à 16 mg/ml . Aucune activité n'a été détectée.

VII. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique *In vitro* consiste à déterminer l'inhibition de la croissance radiale de champignon « *Fusarium oxysporum* » en milieu PDA, par nos extraits DPP selon le protocole réalisé par Song et al., (2004). Les résultats de pourcentage d'inhibition du test antifongique des extraits DPP sont variés de 6 à 7 % et sont regroupés dans le tableau 02.

Tableau 2. Détermination du pourcentage d'inhibition de la croissance de champignon « *Fusarium oxysporum* » des différents extraits DPP.

		Extrait A			Extrait B			Extrait C			Extrait D		
T(+)	T(-)	A	A'	A''	B	B'	B''	C	C'	C''	D	D'	D''
7.2%	6.8%	6.2%	6.5%	6.6%	7%	6.5%	6.4%	6.8%	6.5%	6.7%	6.3%	6.6%	6.7%
7%	7%	6.6%	6.6%	6.5%	6.5%	6.5%	6.8%	6.6%	6%	6.7%	6.7%	6.3%	6.7%
7%	6.8%	6.5%	6.6%	6.8%	6.9%	6.2%	6.2%	6%	6.7%	6.8%	6.6%	6.5%	6.6%
7%	7%	6.6%	6.4%	6.7%	6.5%	6.5%	6.9%	6.2%	6.1%	6.9%	6.4%	6.5%	6.5%

On remarque que les extraits n'ont pas pu atteindre la moitié de concentration d'inhibition IC_{50} donc on constate que les extraits A, B, C, D présentent des IC_{50} supérieurs à 600 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusion

• Conclusion

Les humains utilisent des plantes médicinales depuis des milliers d'années pour traiter diverses maladies et problèmes de santé, et ces plantes médicinales sont toujours très populaires, car différentes parties de ces plants médicinales, y compris les feuilles, l'écorce, les tiges, les racines, les graines, les fleurs et le pollen sont utilisées pour la formulation des remèdes à base de plantes.

Comme plusieurs pays au monde, l'Algérie dispose d'une diversité exceptionnelle aux plantes. Le désert d'Algérie est caractérisé par l'or vert, qui est représenté par les palmiers, et c'est ce qui nous pousse à l'exploiter dans plusieurs domaines, dont la médecine, la pharmacie et cosmétologie et la nutrition. De nos jours, les scientifiques ont confirmé que cette plante possède des propriétés phytochimiques et biologiques très importantes en soignant diverses maladies et inflammations, les tests *In vitro* sont nécessaires pour confirmer l'utilisation des espèces dans la pratique médicale.

Dans notre étude, nous avons travaillé sur trois types de pollen de *Phoenix dactylifera* et un type de pollen de *Phoenix canarensis*. L'extraction des DPP par un solvant hydro-méthanolique a permis d'obtenir une faible teneur en composés phénoliques qui diffère d'un extrait à un autre. Les tests phytochimiques ont permis de mettre en évidence la présence des polyphénols dans tous les types étudiés. Les rendements de l'extraction sont compris entre 5.75% et 12.49%. Ce travail a permis de doser les composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes et d'évaluer le pouvoir antioxydant et la capacité inhibitrice des enzymes en utilisant différentes méthodes (peroxydase, polyphénoloxydase et alpha amylase) ainsi que l'activité anti lithiasique, anti inflammatoire et anti fongique des extraits étudiés.

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) entre les types de pollen utilisés au sein de la même espèce (*Phoenix dactylifera*) et entre les deux espèces du genre *Phoenix* (*Phoenix dactylifera* et *Phoenix canariensis*). Concernant, l'extrait A, il a été le plus riche en polyphénols avec une teneur de 36.49 ± 2 μg EAG/mg de poids sec suivie de l'extrait C, B et D avec des teneurs variant entre 28.73 ± 1.79 et 13.54 ± 0.18 μg EAG/mg de poids sec. Les résultats du dosage des flavonoïdes ont révélé que l'extrait C qui était le plus riche en flavonoïdes contrairement à l'extrait B qui était le plus pauvre (10.94 ± 1.17 , 6 ± 0.31 μg EQ/mg PS respectivement). L'investigation de l'activité antioxydante par différents protocoles a montré que l'extrait A présentait les meilleurs propriétés antioxydants

pour la plupart des tests utilisés. Alors que pour l'activité phénantroline, l'extrait C présentait la meilleure par rapport les extraits A et B.

Alors que, les activités enzymatiques tel que l'inhibition de l'alpha-amylase et l'anti-brunissement donne faible activité pour tous les extraits, donc les activités présentent IC_{50} supérieures à 2500 $\mu\text{g/ml}$ et 2000 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Les mêmes constatations pour les activités anti-inflammatoire et anti-lithiasique où les différents extraits ont montré des IC_{50} supérieures à 16 mg/ml et 4 mg/ml respectivement. Concernant l'activité anti-fongique, nous avons utilisé *fusarium oxysporum* comme agent pathogène, mais nous avons constaté une faible activité pour tous les extraits (entre 6 et 7%), et par conséquent, des CMI supérieures à 600 $\mu\text{g/ml}$.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abdel-Shaheed, Manal. M., Abdalla, Eveleen. S., Khalil, Ayman. F., & El-Hadidy, Eshak. M. (2021).** Effect of Egyptian Date Palm Pollen (*Phoenix dactylifera L.*) and Its Hydroethanolic Extract on Serum Glucose and Lipid Profiles in Induced Diabetic Rats. *Food and Nutrition Sciences*, 12, 147-161. <https://doi.org/10.4236/fns.2021.122013>
- Abdollahi, F. S., Baharara, J., Nejad-Shahrokhadi, K., Nanvar, F., & Amini, E. (2015).** Effect of *Phoenix dactylifera* pollen grain on maturation of preantral follicles in NMRI mice. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(3), 93-97.
- Aberlenc-Bertossi, F. (2010).** Biotechnologies du palmier dattier. Actes du 3e Séminaire du réseau AUF-BIOVEG, Montpellier, France, 18-20 novembre 2008. IRD éd., Institut de recherche pour le développement.
- Abu Zarin, M., Shun Tan, J., Murugan, P., & Rosma, A. (2020).** Investigation of potential anti-urolithiatic activity from different types of *Musa* pseudo-stem extracts in inhibition of calcium oxalate crystallization. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 1-12.
- Agustina, E., Goak, J., Lee, S., Seo, Y., Park, J.Y., & Lee, N. (2015).** Simple and Precise Quantification of Iron Catalyst Content in Carbon Nanotubes Using UV/Visible Spectroscopy. *ChemistryOpen*, 4(5), 613-619. <https://doi.org/10.1002/open.201500096>
- Al Masoudi, L. M., Bukhari, N. A., & Al Wahibi, M. (2020).** Pollen Morphological Study on Some Species of Kickxia, Scrophularia in Relation to Plantago from Saudi Arabia. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(1), 41-52. <https://doi.org/10.1007/s13369-019-04147-4>
- Alhamidi, Nasser. A. (2017).** Etude du pollen de quelques espèces allergisantes de la région de Tlemcen [Thèse]. Université Abou Bekr Belkaïd. <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/10297/1/Etude-du-pollen-de-quelques-especes-allergisantes.pdf>
- Ali, Ines., Oussama. H. (2011).** تأثير طمع النخيل على الخصوبة التناسمية لذكور الجرذان البيض البالغة *Rattus norvegicus*. *مجلة التربية والعلم*, 24(2), 130-112 .
- Al-Khayri, J. M., Jain, M., & Johnson, D. V. (2021).** Omics and molecular breeding. Springer.
- AL-Samarai, A. H., Al-Salihi, F. G., & AL-Samarai, R. R. (2016).** Phytochemical constituents and nutrient evaluation of date palm (*Phoenix dactylifera, L.*) pollen grains. 21. file:///C:/Users/Pc/Downloads/4b00fe7659edf803.pdf.
- Altemimi, Ibtihaj. H. (2020).** The Chemical Composition of Pollen Date Palm *Phoenix dactylifera L.* var. Samisemi Males Trees. *Syrian Journal of Agricultural Research*, 7(1), 146-157.
- Babahani, S., & Bouguedoura, N. (2015).** Effet de quelques methodes simples de conservation du pollen sur les caracteres de la production dattiere. *Sciences & Technologie*, 42, 31-37.
- Belaïch, R., & Boujraf, S. (2016).** Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés. Effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(1), 38-42. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(16\)30009-8](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(16)30009-8)

- Belem, A., Tapsoba, F., Songre-Ouattara, L.T., Zongo, C., & Savadogo, A. (2017).** Etude de la qualité organoleptique de trois variétés de mangues Amélie, Lippens, Brooks séchées au cours du stockage par technique de brunissement enzymatique des peroxydases (POD) et des polyphénoloxydases (PPO). *Rev. Sci. Technol., Synthèse*, 34, 38-47.
- Ben-Moussa, M. T., Khelil, K., Harkat, H., Lakehal, S., & Hadeif, Y. (2020).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Brocchia cinerea* VIS. from Algeria. *Article original*, 7(2), 8-122.
- Bennetau-Pelissero, C. (2014).** Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 49(4), 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2014.02.004>
- Benouamane, O., Vergara-Barberan, M., Benaziza, A., Garcia-Alvarez-Coque, Maria. C., Simo-Alfonso, E., China, B., & Lerma-Garcia, Maria. J. (2022).** Characterization of different cultivars of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera L.*) leaves and pollen by comprehensive two-dimensional liquid chromatography of phenolic compounds extracted with different solvents. *Microchemical Journal*, 182. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X22007020>
- Bentrade, F., Hamzaoui, Y. (2022).** Entreprenariat essai de production d'un gel anti-inflammatoire à base de l'extrait de fruits de piment. *Mémoire Master Recherche, Biotechnologie et génomique végétale. Université Frères Mentouri Constantine*, 60 p.
- Blanc, M. (2010).** Propriétés et usage médical des produits de la ruche [Thèse]. Limoges.
- Blois M.S., (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181), 1119-1200.
- Boizot, N., & Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79-82.
- Bravo, Laura. (1998).** Polyphenols, Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Lead Review Article*, 317-333.
- Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3eme édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.
- Bruneton, Jean. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.). lavoisier.
- Chabaud, W. (1882).** *Le Phoenix canariensis*. *Provence Agric Horticult Illustr*, 19, 293–297.
- Chaouch Khouane, A. (2022).** Etude de la diversité génétique de quelques palmiers dattier mâles et essai d'identification d'empreintes génétiques de dokkars les plus proches de « Deglet-Nour » moyennant les marqueurs microsatellites [Thèse]. Université Mohamed Khider Biskra.
- Cheynier, V. (2005).** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>
- Chniti s. (2015).** Optimisation de la bioproduction d'éthanol par valorisation des refus de l'industrie de conditionnement des dattes. Université Rennes 1.
- Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C-F., Chou, S.T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IM

- NK1. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50, 2454–2458.
- Daher Meraneh, A. (2010).** Détermination du sexe chez le palmier dattier. Approches histocytologiques et moléculaires [Thèse]. Montpellier II.
- Daoud, A., Drira, M., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafigui, K., Kadri, A., & Gharsallah, N. (2019).** Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars, 3075-3086.
- Dennis, C., & Webstert, J. (1971).** Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma III. Hyphal interaction. Trans. Br. mycol. Soc. 57 (3), 363–369.
- Durand, G., & Beaudeau, J.L. (2011).** Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives (2e éd. Revue et augmentée). Médecine sciences publications-[Lavoisier].
- El-Juhany, L. I. (2010).** Degradation of Date Palm Trees and Date Production in Arab Countries: Causes and Potential Rehabilitation. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(8), 3998-4010.
- El-Kholy, W.M., Soliman, Tarek. N., & Darwish, Amira. M. G. (2019).** Evaluation of date palm pollen (*Phoenix dactylifera L.*) encapsulation, impact on the nutritional and functional properties of fortified yoghurt. Plos One.
- Elhoumaizi, M.A., Saaidi, M., Oihabi, A., Cilas, C. (2002).** Phenotypic diversity of date palm cultivars (*Phoenix dactylifera L.*) from Morocco. Genet. Resour. Crop Evol. 49, 483–490. <https://doi.org/10.1023/A:1020968513494>
- Erhaem, Suhad. H. (2014).** Effect of Different Proportion of Date Palm Pollen Suspension on Ovarian Function and Egg Production in Laying Hens. مجلة الفرات للعلوم الزراعية, 6(1), 103-98.
- FAOSTAT, (2019).** Agro-Statistics Database (Viewed: 22/09/2021). Food and Agricultural Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org>
- Frenguelli, G. (2003).** Pollen structure and morphology. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii, 20(4), 200-204.
- Gastaldi, C., Thi Mai, B., Girard, M. (2020).** Notions de base en palynogénèse et morphologie du pollen. Abeilles et Cie, 2020, 199, 25-26.
- Gastaldi, C., Thi Mai, B., Girard, M. (2022).** Structure et morphologie d'un grain de pollen. Qua-trième partie. Abeilles et Cie, 2021, 202, 25-26.
- Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes, Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytotherapie, 3(4), 162-169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- Gnanamangai, B. M., Saranya, S., Ponmurugan, P., Kavitha, S., Pitchaimuthu, S., & Divya, P. (2019).** Analysis of Antioxidants and Nutritional Assessment of Date Palm Fruits. In Mu. Naushad & E. Lichtfouse (Éds.), Sustainable Agriculture Reviews, (34), 19-40. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11345-2_2.
- Guillouty, Amandine. (2016).** Plantes médicinales et antioxydants. <https://docplayer.fr/59833239-Universite-toulouse-iii-paul-sabatier-faculte-des-sciences-pharmaceutiques-these-pour-le-diplome-d-etat-de-docteur-en-pharmacie.html>
- Gülçin, İlhami. (2012).** Antioxidant activity of food constituents. an overview. Arch Toxicol 86, 345–391.

- Hadrami, I. E., & Hadrami, A. E. (2009).** Breeding Date Palm. In S. M. Jain & P. M. Priyadarshan (Éds.), *Breeding Plantation Tree Crops, Tropical Species*, 191-216. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_6.
- Handique, J. G., & Baruah, J. B. (2002).** *Reactive and Functional Polymers*. 52, 163-188.
- Harborne, J. B. (Éd.). (1994).** *The Flavonoids: Advances in research since 1986* (1st ed). Chapman & Hall.
- Harley, M. M., Baker, W.J. (2001).** Pollen aperture morphology in *Arecaceae*. application within phylogenetic analyses, and a summary of the fossil record of palm like pollen. *Grana* 40,45-77.
- Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals, Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, (22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol, Therapeutics*, 96, 67-202.
- Hemeda, H. M., & Klein, B. P. (1990).** Effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. *Journal of Food Science*, 55(1), 184-185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06048.x>.
- Hsu, B., Coupar, I. M., & Ng, K. (2006).** Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food chemistry*, 98(2), 317-328.
- Ibrahim, Ihsan. R., Sachit, Ibrahim. A., & Wali, Jameel. K. (2011).** Effect of *Phoenix dactylifera* pollen grains suspension in fertility of male rats. 8(1), 254-262.
- Ketfi, Louisa. (2016).** Le contenu pollinique atmosphérique de la région de Annaba et sa relation avec le pollinose [Thèse]. Université Badji Mokhtar Annaba.
- Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées [Thèse]. <https://theses.hal.science/tel-00006170/document>
- Manach, Claudine., Augustin, Scalbert., Christine, Morand., Christian, Rémésy., Liliana, Jiménez. (2004).** Polyphenols, food sources and bioavailability, *American journal for Clinical Nutrition*, 79,727– 747.
- Mehdi, Y. (2016).** Caractérisation physicochimique, palynologique et effets antibactérien, antioxydant et immunomodulateur des miels de la région ouest d'Algérie. [Thèse]. Djillali Liabes.
- Mohamed, N. A., Ahmed, O. M., Hozayen, W. G., & Ahmed, M. A. (2018).** Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemic state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-Induced diabetic wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.117>
- Muhsin, Luna. Q. (2022).** The inhibition activity of pollen grain extracts of date palm *Phoenix dactylifera* against some species of Pathogenic bacteria. *مجلة امبصرة لأبحاث نخلة*, 46-35 ,(1)21.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V.V (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43,992–999.

- Ningjian, Liang., & David, Kitts.D (2005).** Antioxidant property of coffee component. Assesment of methods that define mechanisms of action.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.
- Ponce et al. (2004).** Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensm. -Wiss. u. Technol.* 37,199-204.
- Prieu, C. (2015).** Évolution et développement des grains de pollen chez les angiospermes [Thèse]. Paris-saclay.
- Ramalho ,V.C., & Jorge.N. (2006).** Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quimica Nova*,2006,29,755-760.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Ribereau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed.
- Randhirand, R., Shetty, K. (2007).** Improved α -amylase and Helicobacter pylori inhibition by fenugreek extracts derived via solid-statebioconversion using *Rhizopus oligosporus*. *Asia Pac J Clin Nutr* 16 (3),382-392.
- Sadeq, O., Mechchate, H., Es-safi, I., Bouhrim, M., Jawhari, F. Z., Ouassou, H., Kharchoufa, L.N., AlZain, M.M., Alzamel, N., Mohamed Al Kamaly,O., Bouyahya, A., Benoutman, A., & Imtara, H. (2021).** Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial Activities of Pollen Extracts from *Micromeria fruticosa*, *Achillea fragrantissima*, and *Phoenix dactylifera*. *Plants*, 10(4), 676. <https://doi.org/10.3390/plants10040676>
- Salmani, R., Nasiri, K., Javadzadeh, Y., Salmani, R., Clark, C. C. T., & Aghamohammadi, V. (2022).** Effect of date palm pollen supplementation on female sexual function in non-menopausal women. A double blind randomized clinical trial. *Chinese Herbal Medicines*, 14, 643-648.
- Sannier, J. (2006).** diversité et evolution de la microsporogenese chez les palmiers (*Arecaceae*) en relation avec la détermination du type apertural [thèse]. Université paris xi.
- Smail, K. (2015).** étude théorique et expérimentale des activités biologiques de quelques composés de la famille des flavonoïdes .Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf]. http://univusto.dz/theses_en_ligne/doc_num.php?explnum_i=2899.
- Soliman, S. S., & Al-Obess, R. S. (2013).** Investigations on the pollen morphology of some date palm males (*Phoenix dactylifera L.*) in Saudi Arabia. *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1355-1360.
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., & Liu, X. (2004).** *Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system.* *Crop. Protect.* 23, 243–247. doi: 10.1016/j.cropro.2003.08.007.
- Szwajgier, D., Borowiec, K., & Pustelniak, K. (2017).** The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action. *Nutrients*,9(5),477. <https://doi.org/10.3390/nu9050477>.

- Szydłowska-Czerniaka, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* 2008. 76, 899-905.
- Tamma, N. E., Rebiai, A., Benchikha, N., & Hima, A. (2020).** a comparative study of the antioxidant and antimicrobial properties of the phenolic extracts from palm pollen growing in oued souf (algeria). *researchGate*.
- Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103,816–822.
- Uhl, Natalie. W. (1969).** Anatomy and ontogeny of the cinicinni and flowers in *Nannorrhops ritichiana* (Palmae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 50, 411-431.
- Walker, J.W., Doyle, J.A. (1975).** The bases of angiosperm phylogeny. *palynology*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 62, 664–723.
- Wertheimer, M. (1957).** La pollination du palmier-dattier. *Fruit*, 12(7), 305-313.
- Zengin, G. et al., (2014).** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251.

Annexe

1. Préparation de la solution DPPH

DPPH.....4 mg
Méthanol100 ml
Conservation à -20° c à l'abri de la lumière.

2. Préparation de la solution d'ABTS

Le radical cation ABTS⁺ est produit en faisant réagir l'ABTS [19,2 mg (7 mM) de l'ABTS + 5 ml H₂O] avec du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) [3,3 mg (2.45 mM) + 5 ml H₂O], le Mélange est laissé à l'obscurité à température ambiante pendant 12-16h. L'absorbance de la Solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700±0.020 par l'éthanol ou l'H₂O à 734 nm avant l'usage.

3. Pouvoir réducteur

■Préparation de tampon phosphate 0,2 M, pH=6,6 :

Na₂HPO₄ : 8.51 g/300 ml d'eau distillé.
2NaPO₄, 2H₂O : 9.36 g/300 eau distillé.

On mélange les deux solutions de façon à obtenir une solution tampon de pH à 6.6.

■Préparation de l'acide trichloracétique (1%) :

L'acide trichloracétique1 g
H₂O.....100 ml

■Préparation Solution ferricyanure de potassium 1% :

K₃Fe (CN)₆1 g
Eau distillée.....100 ml

■Préparation Solution de chlorure ferrique à 0,1% :

FeCl₃.....0.1 g
Eau distillée.....100 ml

4. activité phénanthroline

■Préparation de Ferric chloride FeCl₃ (0,2%)

FeCl₃ 0.02 g
H₂O.....10 ml

■ **Préparation de phénanthroline (0,5%) :**

1,10-Phenanthroline.....0.05 g
MeOH..... 10 ml

5. Activité anti – brunissement enzymatique

■ **Préparation de l'extrait enzymatique (E) :**

Pomme de terre découpée en petits morceaux.....30 g

Eau distillée à 4 C.....100 ml

- Mixer le tous au mixeur/broyeur pendant 3 min
- Filtration sous vide dans un bain de glace
- Centrifugation tournant de 6000 à 10000 trm pendant 15 min à 4 C
- Récupérer le surnageant
- Conservation a -20 C.

■ **Préparation du substrat (S1) :**

Gaïacol à 1%.....10 ml ; (0,1 ml de de gaïacol dans 10 ml H₂O)

Peroxyde d'hydrogène (0,3%).....10 ml ; (3 ml H₂O₂ + 7 ml H₂O)

Tampon phosphate (0,05 M, pH= 6,5).....100 ml

NaH₂PO₄ (Acide) : 0,689 g dans100 ml H₂O

Na₂HPO₄ (Base) : 0,7098 g dans100 ml H₂O

- Suivre le tableau du pH, la préparation de S1 est ajustée selon besoin.

■ **Préparation du substrat (S2) :**

Solution de 0,2 M de pyrocatechol (0,11 g pyrocatechol est dissoute dans 5 ml)

- La préparation de S2 est ajustée selon besoin.

6. Inhibition de l'α-amylase

• **Amidon 0.1%** : 0,1 g de l'amidon est dissout dans 100 ml d'eau distillée puis chauffé à la microonde durant une minute pour obtenir une solution homogène.

• **Solution IKI** : Dissoudre 3 g de KI dans 100 ml d'eau distillée. Ajouter 127 mg d'iode (5mM) puis agiter jusqu'à dissolution complète de la solution.

• **Acide hypochlorique (1M)** : un volume de 4,17 ml d'HCl pur est ajouté doucement à un volume de 45.83 ml d'eau distillée.

•**Tampon phosphate à 6 mM de NaCl** : Une quantité de 35.1 mg de NaCl est additionné à 100 ml de tampon phosphate pH= 6,6.

7. activité anti-inflammatoire

■Préparation de tampon TRIS-HCL :

Tris.....1.2144 g
H₂O.....200 ml
HCl pure ajusté jusqu'àpH= 6.6

■Préparation de BSA :

BSA.....0.2 g
Tampon TRIS-HCl100 ml

8. activité antifongique

■Composition de Milieu PDA :

Extrait de pomme de terre.....1400 ml
Glucose.....28 g
Agar21g

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 60° C pendant 2h.

Caractérisation phytochimique et propriétés biologiques de trois types de pollen de l'espèce *Phoenix dactylifera*.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Biochimie Appliquée.

Résumé

Ce travail consiste à l'étude phytochimique des extraits hydro-méthanolique de quatre types de pollen récupéré à partir des pieds males de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* et *Phoenix canariensis*) récoltés de la région de Biskra et de la région de Ali-Mendjeli, Constantine respectivement. Ce travail a permis de doser les composés phénoliques et les flavonoïdes et d'évaluer le pouvoir antioxydant et la capacité inhibitrice des enzymes en utilisant différentes méthodes (peroxydase, polyphénoloxydase et alpha amylase) ainsi que l'activité anti lithiasique, anti inflammatoire et anti fongique des extraits étudiés.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait A était le plus riche en polyphénols avec une teneur de 36.49 ± 2 μg EAG/mg de poids sec suivie de l'extrait C, B et D avec des teneurs qui varient entre 28.73 ± 1.79 et 13.54 ± 0.18 μg EAG/mg de poids sec. Les résultats du dosage des flavonoïdes ont révélé que l'extrait C était le plus riche en flavonoïdes contrairement à l'extrait B qui était le plus pauvre (10.94 ± 1.17 , 6 ± 0.31 μg EQ/mg PS respectivement). L'investigation de l'activité antioxydante par différents protocoles a montré que l'extrait A présentait les meilleures propriétés antioxydants pour la plupart des tests utilisés, DPPH et ABTS avec des valeurs d' IC_{50} de $954,1 \pm 109,1$ et $221,08 \pm 3,71$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Et le FPAP avec une valeur d' $\text{A}_{0.5}$ de $1523 \pm 190,2$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ contrairement à l'extrait B. Concernant le test phénanthroline l'extrait C présentait le meilleur pouvoir réducteur avec une $\text{A}_{0.5}$ égale à $132,88 \pm 0,82$ $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Concernant les propriétés inhibitrices des enzymes, les résultats prouvent que les extraits ont une faible activité d'inhiber l'effet hyperglycémiant et le brunissement. Les extraits présentaient des IC_{50} supérieurs à 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Même pour les activités anti-inflammatoire et anti-lithiasique où les extraits ont présenté des IC_{50} plus élevées à 16 mg/ml et 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement. Aucune activité antimycosique vis-à-vis le champignons phytopathogène fusarium oxysporum par tous les extraits.

Mots clés : DPP, *Phoenix dactylifera*, *Phoenix canariensis*, Pollen, Activités biologiques, *in vitro*.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme KLIBET Fahima, MCB - UFM-Constantine 1

Encadrant : Mr MEBREK Saad, Maitre de recherche B – CRBt, Constantine

Examineur : Mr KASHI Imad, Maitre de recherche A – CRBt, Constantine