

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de biochimie et biologie cellulaire moléculaire قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science biologique.

Spécialité : *biochimie*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Contribution à l'étude phytochimique et biologiques de quelques types de pollen

Présenté par :

HAMAL Choubeila

15/06/2023

BOUHANIKA Malak rym

Jury d'évaluation :

Encadreur : M^{me} CHAOUCH KHOUANE Asma (MRB – CRBt).

Président : M^r. KITOUNI Rachid (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : M^{me} GALI Lynda (MRA – CRBt).

Année universitaire

2022-2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال تعالى: { يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَ الَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ } [المجادلة : 11]



قال تعالى: { وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ } [الانعام : 99]

Remerciements :

Tout d'abord, nous remercions **Allah** Tout Puissant de nous avoir donné la force, les moyens et la patience pour terminer notre formation de master

Au terme de ce travail, nous exprimons nos profonds remerciements, à notre directrice de mémoire, Mme. **CHAOUCH KHOUANE** Asma, maître de recherche classe B ; Division de Biotechnologies et Agriculture Equipe de Génomique et amélioration des plantes Centre de Recherche en Biotechnologie C.R.Bt d' avoir accepté d'être notre encadrante de cette mémoire, pour tout le soutien et les encouragements, à être avec nous pas à pas. Nous apprécions sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience qui nous permettent de réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

A Mr. **Bensuici Chaouki** Chef de laboratoire de Biochimie et Mr. **Mebrek Saad** chef de laboratoire d'immuno-ingénierie du CRBT.

Nos sincères remerciements s'adresse à Mme. **Djeghim Hanane**, pour l'aide si efficace qu'elle nous a apportée, sa gentillesse, ses orientations et ses conseils éclairés.

Nous tenons à remercier aussi Mr. **Hakkoum Hamed**, Mme. **Boulehbel Houda** du laboratoire de mycologie-CRBT, Mr **mehdi** et Mme **Sarah** du laboratoire de biochimie, pour leurs aides leurs conseils, leur gentillesse et leurs efforts que nous ont donné.

Je tiens à remercier Mr **KITOUNI Rachid** maître de conférence classe A à l'université de Constantine d'avoir d'accepter de présider ce travail.

Je tiens à remercier également Mme **GALI Lynda** maître de recherche classe A au centre de recherche en biotechnologie à Constantine.

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail .

Je tiens à dédier ce modeste travail :

*A ma tendre mère et mon très cher père,
pour leur sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage
et sécurité*

*A mes sœurs Amina , Khadidja, Ahlam et mes frères
Salim, Raouf et Bilel ,*

*Zui m'ont donnée le courage et la force de poursuivre mes
études*

A toute ma famille Hamal

A ma meilleur binôme Malak Rym

A mes amis et surtout Bouchna, Ines, Hiba, Amira et Nour,

*A Toute personne qui a participé de près ou de loin,
directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail*

A toute la promotion Biochimie 2023

Choubeila

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes parents Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'une grande aide tout au long de ma vie. mes sincères remerciements pour tous les efforts et le soutien inlassables qui m'ont toujours été apportés

A ma sœur Nour, pour votre soutien moral et encouragements vous m'avez appris la patience et la concentration sur mon travail. Je vous souhaite un avenir plein de bonheur et de succès. Je vous aime beaucoup

A ma binôme : choubela

A mon meilleur ami Maroua amis et mes collègues à l'université

Malek

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Revue bibliographique	
<i>CHAPITER I: PRÉSENTATION ET BIOLOGIE DU PALMIER</i>	
<i>DATTIER (Pheonix dactylifera L)</i>	
I Systématique	 3
II Morphologie du palmier dattier.	 4
II.1. Appareil végétatif	 4
II.1.1. Système racinaire	 5
II.1.2. Tronc (stipe)	 5
II.1.3. Couronne et les feuilles	 5
II.2. Appareil reproducteur	 6
II.2.1. Inflorescences	 7
II.2.2. les fleurs femelles	 7
II.2.3. les fleurs males	 7
III Répartitions géographiques	 7
III.1.1. Dans le monde	 7
III.1.2. En Algérie	 8
IV La diversité génétique	 8
V Palmier dattier male et pollen	 9
V.1. Présentation et description du Pollen	 9
V.2. Composition de pollen	 11
V.3. Utilisation du pollen	 11
V.3.1. En Agriculture	 11
V.3.1.1. Pollinisation	 11
V.3.1.2. La metaxenique	 12
V.3.2. En pharmacologie et médecine traditionnelle	 13
V.3.2.1. La propriété antioxydant	 13
V.3.2.2. La propriété enzymatique	 13
V.3.2.3. La propriété antifongique	 13
V.3.3. La fertilité mâle	 13
<i>Chapitre II : Les substances bioactives d'origine végétale</i>	
VI Métabolite primaire	 15
VII Métabolite secondaires	 15
VII.1. Classification des métabolites secondaires	 15
VII.1.1. Les composés phénoliques	 16

VIII Les activités biologiques des polyphénols	18
VIII.1. Effet antioxydant	19
VIII.1.1. Les antioxydants	19
VIII.1.2. Stress oxydatif	19
VIII.1.3. Les radicaux libres	19
VIII.1.3.1. Espèce réactive de l'oxygène (ERO)	20
VIII.1.3.2. Origine de stress oxydative (origine des ERO)	20
VIII.1.3.2.1. Origine Endogène	20
VIII.1.3.2.2. Origine exogène	20
VIII.2. Effet inhibiteur des enzymes	21
VIII.2.1. Alpha amylase	21
VIII.2.2. Inhibition des enzymes impliqués dans le brunissement enzymatique	22
VIII.2.2.1. Mécanisme de l'activité PPO	22
VIII.2.2.2. Mécanisme de l'activité de POD	22
VIII.3. Effet anti-inflammatoire	22
VIII.4. Effet anti-lithiasique	23
VIII.5. Evaluation <i>in-vitro</i> des activités antifongiques	23
Partie expérimentale	
<i>Chapitre I : Matériel végétale et démarche méthodologique</i>	
I Matériel végétale	25
I.1. Extraction des métabolites par macération	26
I.2. Etude colorimétrique des polyphenols	28
I.2.1. Dosage des polyphénols totaux	28
I.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	29
I.3. Etude des activités biologiques	30
I.3.1. Evaluation des activités anti-oxydantes	30
I.3.1.1. Evaluation des activités antioxydants non enzymatiques	30
I.3.1.1.1. le piégeage du radical DPPH	30
I.3.1.1.2. Pouvoir de réduction ferrique	32
I.3.1.1.3. Piégeage de l' ABTS	33
I.3.1.1.4. Activité de Phénantroline	34
I.3.1.2. Evaluation des activités antioxydantes enzymatiques	35
I.3.1.2.1. Evaluation de l'activité anti-brunissement	35
I.3.2. Evaluation de l'activité alpha amylase (antidiabétique)	36
I.3.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	38
I.3.4. Activité anti-lithiasique	39
II Evaluation de l'activité antifongique	40

III	Traitement des résultats	41
	<i>Chapitre II : Résultats et discussion</i>	
II.1.	Rendement d'extraction des pollens	42
I.1.	Dosage des composées phénoliques	42
II.2.	Activités biologiques des extraits	45
II.2.1.	Activité de piégeage du radical libre DPPH	45
II.2.2.	L'activité de piégeage de radical-cation ABTS (scavenging activity)	47
II.2.3.	Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	48
II.2.4.	Activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺² – phenanthroline.	49
II.2.5.	Activité anti-brunissement	50
II.2.6.	Activité inhibitrice de l'alpha amylase	50
II.2.7.	Activité lithiasique	51
II.2.8.	Activité anti-inflammatoire	54
II.3.	Activité antifongique	55
	<i>Conclusion générale</i>	56
	Références bibliographique	58
	Annexe	
	Résumé	

Liste des abréviations :

PPD : Pollen du *Phoenix dactylifera*

PPC : Pollen du *Phoenix canariensis*

DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid)

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

EAG : Equivalent Acide Gallique

QE : Equivalent Quercitine

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

ERO : espèce réactive de l'oxygène

RL : radical libre

COM : Oxalate de calcium monohydrate

RE : réticulum endoplasmique

EGCG : Epigallo-catechine gallate

BSA : bovine serum albumin

Liste des figures :

Les figures	titre	page
figure 1	appareil végétatif de palmier dattier	4
Figure 2	schéma d'une palm	6
Figure 3	figure schématique des inflorescences et des fleurs mâles et femelles du palmier dattier	6
Figure 4	la distribution de Phoenix dans le monde	8
Figure 5	structure de grain de pollen	11
Figure 6	la structure de la paroi de pollen	11
Figure 7	Structure des bases de flavonoïdes	18
Figure 8	Origine des différents radicaux libres oxygénés et Espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	22
Figure 9	Le pollen de <i>Phoenix canariensis</i>	27
Figure 10	Les étapes de la macération	27
Figure 11	L'étape de filtration sous-vide après macération	28
Figure 12	L'étape de l'évaporation du solvant	28
Figure 13	Exemple de l'utilisation de la microplaque pour les activités antioxydantes	31
Figure 14	la réduction de DPPH par l'extrait	32
Figure 15	Structure du radical stable DPPH	32
Figure 16	la réduction du complexe $K_3Fe(CN)_6$ par l'extrait	33
Figure 17	L'oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)	34
Figure 18	structure du radical cation $ABTS^{+}$	35
Figure 19	la réduction de Fer (Fe^{+3}) en Fer (Fe^{+2})	36
Figure 20	Rendements d'extraction des différents types de pollens	44
Figure 21	Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de pollen de <i>Phoenix dactylifera L</i> et <i>Phoenix canariensis</i>	45
Figure 22	Teneurs en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de pollen de <i>Phoenix dactylifera L</i> et <i>Phoenix canariensis</i>	46
Figure 23	Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox ; acide ascorbique)	46
Figure 24	Activité de piégeage du radical ABTS des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox ; acide ascorbique)	47

Figure 25	Activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique FRAP des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox ; acide ascorbique)	48
Figure 26	la valeur de $A_{0.5}$ des extraits par rapport au standard (trolox ; acide ascorbique)	49
Figure 27	Activité anti-brunissement des extraits de pollen	50
Figure 28	la valeur de IC_{50} des extraits par rapport au standard (acarbose)	51
Figure 29	Activité anti-lithiasique (test d'agrégation) des extraits des pollens étudiés par rapport au standard (acide citrique)	52
Figure 30	Activité anti-inflammatoire de l'extrait PPC par rapport au standard (Voltarène)	54
Figure 31	Taux d'inhibition de l'activité antifongique des extraits du pollen étudiés	55
Figure 32	Effet des extraits du pollen avec différentes concentrations sur le diamètre de développement du champignon <i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>Lycopersici</i>	55

Liste des tableaux :

Tableau 1	Composition chimique de grain de pollen de palmier dattier	12
Tableau 2	Les grandes classes des métabolites secondaires	17
Tableau 3	Quelques composés phénoliques basiques	17
Tableau 4	Les différentes classes des flavonoïdes	17
Tableau 5	Liste des classes radicalaires et non radicalaires des ERO	20
Tableau 6	Observation microscopique des résultats de l'activité anti-lithiasique	53

Introduction

Générale

Introduction générale

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... Les antioxydants présents dans les aliments ne suffisent pas à neutraliser les radicaux libres présents en forte concentration dans l'organisme, et donc les études se concentrent sur les antioxydants naturels.

Parmi les plantes, nous avons choisi pour cette étude le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Cette espèce s'installe 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.

Bien que le palmier dattier est une plante dioïque, c'est-à-dire que les inflorescences mâles qui donne le pollen et les inflorescences femelles qui donne les dattes se portent sur des pieds différents. La pollinisation croisée est indispensable afin d'avoir des dattes comestibles et permet de donner par conséquent, des nouveaux génotypes de palmier dattier et cela il est considéré comme une source principale qui induit à la richesse de la diversité génétiques (**Elsafy, 2015**) En effet, les palmiers mâles sont très rarement clonés et ils représentent le plus souvent des génotypes uniques, car, ils sont généralement issus de graines et se caractérisent par des qualités des pollens très variables d'un individu à un autre (**Boughediri, 1993**) Ainsi, le pollen du palmier dattier possède des molécules actives qui lui en confèrent des propriétés pharmacologiques intéressantes, on peut citer : la propriété antioxydante, enzymatique, antifongique, traitement de l'infertilité humaine...

Partant de ces données, notre présent travail s'inscrit dans le cadre de contribution à l'étude phytochimique et biologique de certains types de pollens du genre *Phoenix*, notamment *Phoenix dactylifera*, en étudiant leur diversité génétique sur le plan phytochimique, sachant que les pieds mâles d'où proviennent ces types de pollen sont prouvés préalablement qui sont différents sur le plan moléculaire (**Chaouch-Khouane, 2020**)

Le manuscrit de ce mémoire est présenté par deux parties :

Première Partie : elle est consacrée à la synthèse bibliographique et elle représente deux chapitres;

Chapitre I : dans laquelle nous avons abordé la description de *Phoenix dactylifera*,

Chapitre II : les composées phénoliques et leur rôle dans le stress oxydatif et leur rôle avec les activités biologiques et fongiques

Pour la deuxième partie : nous avons abordé la partie pratique présentée par deux chapitres;

Chapitre I : dans laquelle nous citons la méthode d'extraction de nos extraits, l'évaluation des activités antioxydantes, enzymatiques, anti-lithiasique, anti-inflammatoire et enfin l'anti-fongique.

Chapitre II : qui représente les résultats obtenues, leur discussion et leurs comparaisons avec des études antérieures réalisées sur le pollen du *Phoenix dactylifera* .

Première partie :
Synthèse bibliographique

CHAPITRE I:
PRÉSENTATION ET BIOLOGIE
DU PALMIER DATTIER
(PHOENIX DACTYLIFERA L)

CHAPITRE I : Présentation et biologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*)

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) était primitivement cultivée dans les zones arides et semi-arides chaudes de l'ancien monde. Cette espèce s'installe dans des régions désertiques où se trouvent des points d'eau et forme ce qu'on appelle Oasis. Ces derniers constituent un écosystème à grande importance écologique, économique et sociologique, qui est favorable à l'installation de populations humaine et animales et constitue une source de revenus importante grâce à ses fruits (dattes) d'une qualité alimentaire importante.

D'après Popenoe 1938 (Gros-Balthazard, 2012) le nom *Phoenix* vient du Grec et il est dérivé du nom d'un oiseau qui peut se renaître de ses cendres et à survivre après avoir été partiellement brûlé. Quant à *dactylifera*, (dactylus en latin), ce terme est relatif à la forme de doigts des fruits du palmier dattier (Peyron, 2000)

I Systématique

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) (Linné 1734) est une espèce pérenne, monocotylédone, à fruit comestible, Elle appartient à une grande famille des Areacacées (anciennement Palmacées) comprenant plus de 2 800 espèces (Dransfield, 2008), (En anglais ; date palm, en arabe ; Nekhla)

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

Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Monocotylédones*

Ordre : *Principes*

Famille : *Areacacées*

Tribu : *Phoenicées*

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Phoenix dactylifera L.*

Le genre *Phoenix* à diverses caractéristiques et usages, dont l'espèce est la plus connue et répartie dans le monde grâce à ses fruits comestibles et délicieuses appelés "dattes" faisant l'objet d'importants échanges de commerce internationaux

II Morphologie du palmier dattier

Le palmier dattier est une plante rustique qui s'adapte aux régions les plus sèches du monde et s'hybride facilement, dû à sa dioécie; en créant de nombreuses variétés (Chehema., 2001); Cette espèce arborescente, monocotylédone a un tronc (ou stipe) monopodique et cylindrique qui peut atteindre 20 à 30 mètres de haut, surmonté d'une couronne composée des longues feuilles appelées « palmes » d'environ 4 à 7 mètres de long pennées composées chacune en folioles, ,

L'architecture du palmier dattier est caractérisée par la présence de parties principales ; Appareil végétatif et appareil reproductif.

II.1. Appareil végétatif

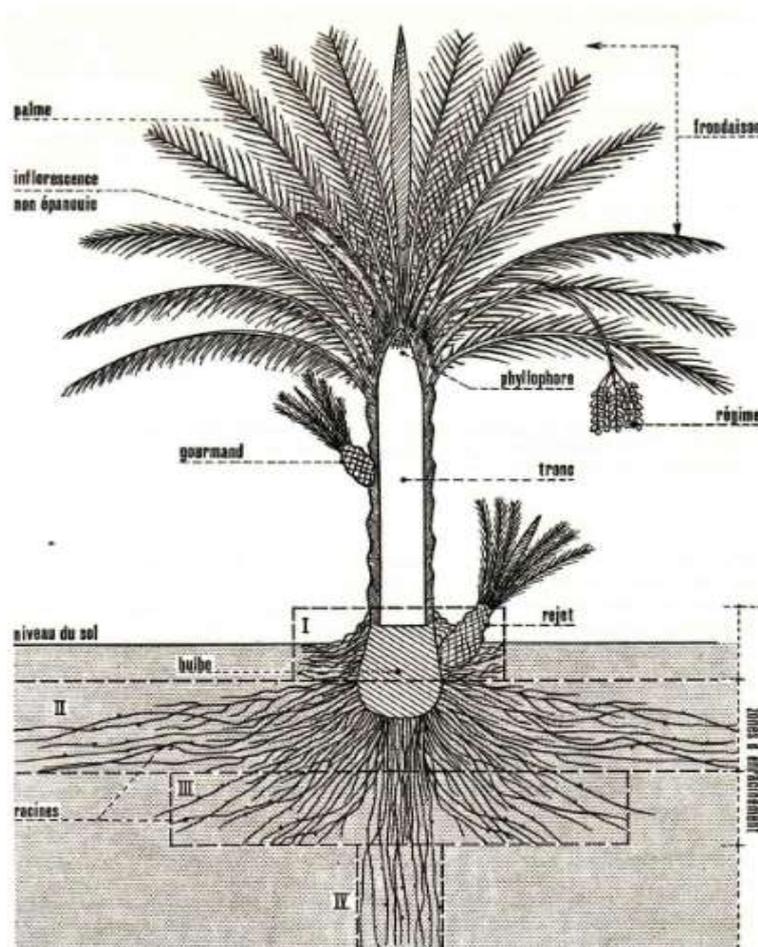


Figure 1 : appareil végétatif de palmier dattier (Munier, 1973)

II.1.1. Système racinaire

Le système racinaire du palmier dattier est de type fasciculé, les racines ne se ramifient pas et n'ont relativement que peu de radicelles (**Peyron, 2000**)(figure 1)

Il présente plusieurs zones d'enracinement :

➤ **Les racines respiratoire « 0 à 20 cm »** : est situé dans la base de palmier dattier ;il possède plusieurs racines épiphytes qui peuvent pousser à partir de la base du tronc (**Munier, 1973**)

➤ **Les racines de nutrition « 20 à 100 cm »** : elle possède le pourcentage des racines le plus élevé dans la région et elles ont des sous racines (**Munier, 1973**)

➤ **Les racines d'absorption « 100 à 200 cm »** : leur longueur varient selon les conditions de culture et le niveau des eaux souterraines (**Peyron, 2000**)

➤ **Les racines d'absorption de profondeur « plus de 200 cm »**:Sont des racines formant un faisceau pivotant qui peut atteindre des profondeurs allant jusqu'à 17 mètres. (**Peyron, 2000**)

II.1.2. Tronc (stipe)

Le tronc est de forme cylindrique, Marron vert, et non ramifié avec une couronne moins dense que l'espèce *Phoenix canariensis* ; avec une hauteur plus de 30 (**Sedra, 2003**) et de diamètre de 30 à 45cm par an (**Boucetta, 1995**). La hauteur et la vitesse de croissance varient selon les cultivars, l'âge et le poids des rejets dont ils sont issus lors de la plantation (**TourerN, 1967**) Le fibrillium "Lif" est la partie qui recouvert le stipe des jeunes palmiers il ne persiste pas à l'état adulte que dans la partie coronaire. Les stipes peuvent se ramifier dans le cas ou ils se développent des gourmands ou des rejets aériens « rkebs » (**Djerbi, 1994**).(figure 1)

II.1.3. Couronne et les feuilles

La couronne du dattier est un ensemble de palmes (ou feuilles) vertes (**figure 2**) avec un nombre de 50 à 200 palmiers dans un dattier adulte (**Peyron, 2000**).Ces palmes sont émises par le bourgeon terminal ou « phyllophore » (**figure 1**). On distingue en conséquence la corolle basale, la corolle centrale et les palmes du cœur. Le bourgeon apical ou terminal est responsable de la croissance en hauteur du palmier et du développement des feuilles et des bourgeons axillaires (**Girard, 1962**)

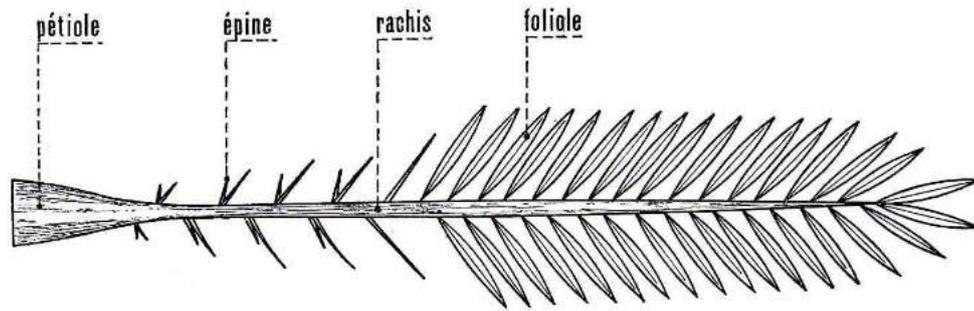


Figure 2 :schéma d'une palm Invalid source specified. (Munier, 1973)

II.2. Appareil reproducteur

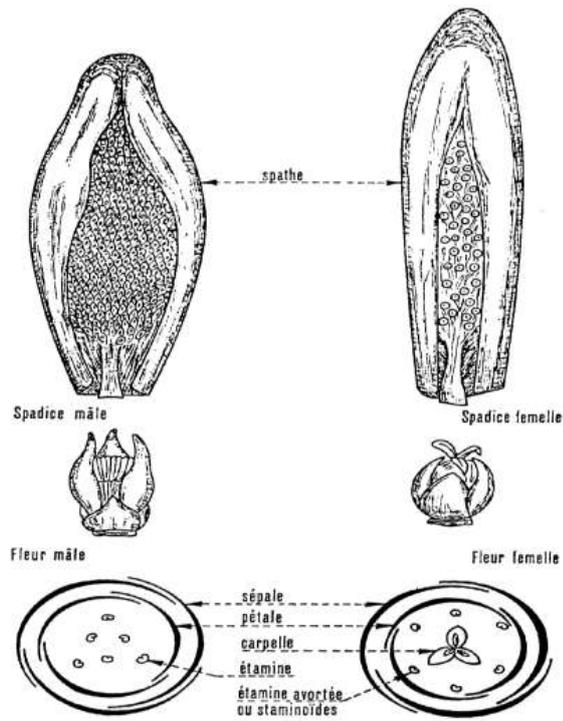


Figure 3 : les inflorescences et des fleurs mâles et femelles du palmier dattier (Munier, 1973)

II.2.1. Inflorescences

Le palmier dattier est une espèce dioïque ; c'est-à-dire chaque individu ne possède que des inflorescences de même sexe ; mâles ou femelles. Les inflorescences mâles donnent du pollen tandis que les inflorescences femelles donnent des fruits « dattes ». Ces deux types d'inflorescences appelés « spathes » sont portés par des palmiers séparés. L'inflorescence se développe dans la région coronale du stipe à partir de bourgeon auxiliaire. Ils ont la forme de grappes d'épis, recouvert par une grande bractée ligneuse fermée et de forme allongée. (TourerN, 1967)

II.2.2. les fleurs femelles

Les fleurs femelles sont sphériques, cupuliforme, comporte trois sépales soudés, avec un diamètre de 3 à 4 mm;. Elle possède une couleur entre ivoire et vert claire. Les fleurs femelles se forment d'un calice court, de trois sépales soudés et une corolle formée de trois pétales ovales et de six étamines avortées ou staminoïdes (Munier, 1973)(figure 3)

II.2.3. les fleurs mâles

Les fleurs mâles sont plus allongées que les femelles, d'une couleur blanc ivoire. Le calice est court et cupuliforme, constitué de trois sépales soudés et une corolle composée de trois pétales allongées et pointus avec trois étamines remplies de pollen. Après l'ouverture de la spathe mâle (à partir de fin janvier), la fleur libère du pollen et elle exhale une odeur caractéristique. (TourerN, 1967)(Figure 3)

III Répartitions géographiques

Le palmier dattier est une espèce tolérante à la sécheresse. C'est une espèce bien connue avec de nombreuses variétés exigeant un climat chaud et sec pour donner des dattes de bonnes qualités nutritionnelles (Hadrami, 1998).

III.1.1. Dans le monde

En raison des conditions topographiques spécifiques du microclimat qui permettent au fruit de mûrir. La culture des palmiers dattiers revêt une importance socio-économique ; grâce à ses fruits et au microclimat qu'il crée dans le vaste désert, supporte de multiples cultures dans les sous-bois (Hadrami, 1998)

généralement issus de graines et se caractérisent par des qualités des pollens très variables d'un individu à un autre. Et cela revient à la marginalisation des pieds mâles de la part des phoeniculteurs car ils les utilisent seulement pour assurer la fécondation de fleurs femelles en utilisant n'importe quel type de pollen (**Chouach-khouane, 2022**).

V palmier dattier male et pollen

Le nom palynologie défini par deux botanistes britanniques (**Williams, 2004**) c'est la science qui étudie les pollens, elle apporte des éléments utiles pour les études phylogénétiques des plantes.

Le pollen ou grain de pollen est l'élément fécondant mâle du gamétophyte mâle ou phanérogame. Ce sont des microparticules naturelles que les plantes utilisent pour transporter en toute sécurité le matériel génétique, parcourant souvent de grandes distances géographiques. Il se forme au niveau de l'anthere au niveau de l'étamine et germe pour produire un tube pollinique qui permet le transfert du noyau au gamétophyte femelle au niveau du pistil de la fleur femelle. (**Atwe, 2004**)

V.1. Présentation et description du Pollen

Le pollen provient du grec « palé » ; c'est-à-dire farine, ou poussière (**Donadieu, 1982**); on le trouve dans les organes mâles de la fleur ; Il s'agit de petits grains, plus ou moins ovoïdes (les diamètres sont à l'échelle du micromètre) (**Blanc, 2010**) qui sont à l'origine des anthères situant à l'extrémité des étamines (**Arruda, 2013**) sa couleur varie du jaune clair au noir et passe par toutes les nuances de brun et de rouge selon l'origine de la fleur. (**Almeida-Muradian, 2005**)

La représentation morphologique initiale du pollen de palmier dattier est apparue suite à des observations par microscopie optique faites par (**Wodehouse, 1935**) Malgré des différences morphologiques spécifiques, mais les grains de pollen ont une structure anatomique uniforme ; elles sont formées d'une partie centrale qui appelle les cellules vivants entouré par une membrane avec une épaisseur entre 0.51 μm à 0.69 μm qui est appelé 'sporoderme' qui permet de protéger les cellules contre l'écrasement ; les dégradations par des ultras violets ou bien l'oxydation de l'air (**Blanc, 2010**). L'enveloppe externe de ces microspores se compose en deux couches internes et externes (**Gharbi, 2011**)

✓ **Interne** appelé également Intine ; Elle est perméable et souple, plus ou moins épaisse, et présente autour du grain de pollen. Elle est constituée de cellulose et de pectine. (**Faegri, 1964**)

✓ **Externe** appelé également Exine ; elle est imperméable et ayant un peu de flexibilité (Meyer, 2004)

L'exine présente un avantage pour les pollens car il permet de protéger les spores et les grains de pollen lors de leur dispersion dans l'air. (Sannier, 2006).

Elle présente :

- Une forme Ellipsoïdale, plus spécifique hétéroploïde monocarpée .
- Un seule ouverture sous forme d'un sillon longitudinal qui occupe le pôle distal ; de type hétéro-polaire .

-représente un type de tectum discontinue, perforé (Tissera, 1982)

Pour la forme, le nombre ; et la lumière des perforations se diffère d'un pollen à un autre (Abdessemed, 2018) (Sannier, 2006).

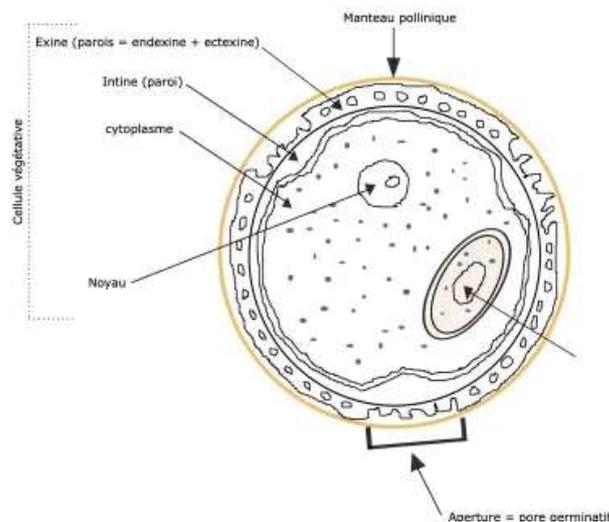


Figure 5 : structure de grain de pollen (Caulten, 2009)

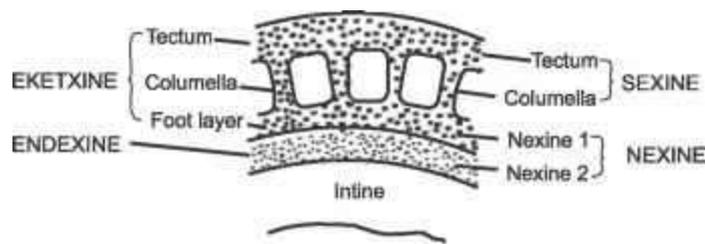


Figure 6 : la structure de la paroi de pollen (Caulten, 2009).

V.2. Composition de pollen

Vue leur composition biochimique, les grains de pollen sont considérés comme une sources naturelles de protéines, minéraux, fibres alimentaires.... D'après (**Salomón-Torres, 2021**) les grains de pollen sont riches et contiennent 5 à 36 % de l'eau, et 64 à 95% des composés solides tels que les vitamines, acide amine, agent antioxydant et des agents antibactériens.

Tableau 1 : composition chimique de grain de pollen de palmier dattier (**Hazem, 2011**)

Paramètre	Pollen
Humidité	28.80%
Cendres	4.57%
Fibre brute	1.37%
Graisse brute	20.74%
Protéine brute	31.11%
Glucides	13.41 %

V.3. Utilisation du pollen

V.3.1. En Agriculture

V.3.1.1. Pollinisation

La pollinisation est une étape culturelle importante dans la production de la datte . Cette étape se réalise naturellement par le vent (anémophile) et les insectes pollinisateurs (entomophile), ou bien manuellement par l'intervention de l'homme, en mettant quelques épillets mâles au milieu de l'inflorescence femelle, cette dernière méthode est la plus fréquente car c'est la plus rentable afin d'assurer une bonne production dattière (**Chaouch-Khouane, 2020**). Cette étape est considérée très critique car tout échec dans la pollinisation aboutit à la formation des fruits parthénocarpiques non comestibles. Plusieurs paramètres s'interviennent pour la réussite de l'opération de pollinisation, entre autres, la qualité et la quantité du pollen, ainsi que les facteurs climatiques adéquats (**Chaouch-Khouane, 2020**)

Les critères de sélection d'un bon pollinisateur :

Parmi les critères de sélection on cite :

- ✓ **La période d'éclatement des spathes :** Le moment de floraison de spathe chez les mâles et les femelles doit être coïncidé (**Peyron, 2000**)*in* (**Chouach-khouane, 2022**)
- ✓ **Une bonne qualité germinative :** selon les observations pour la période de germination, les premières ou les dernières spathes de dokkars ou des pieds adultes possèdent un pouvoir germinatif faible (**Peyron, 2000**)*in* (**Chouach-khouane, 2022**) .
- ✓ **Taille des inflorescences et rendement de pollen :** Il doit assurer qu'un bon pollinisateur peut donner annuellement en moyenne entre 10 à 30 spathes et donner un rendement de pollen important (**Arar, 2016**)
- ✓ **La compatibilité entre les mâles et femelles** (**Djerbi, 1994**)
- ✓ **Effet metaxénique** (**Lakhoua, 1966**) (**Nixon, 1928**) (**Nixon, 1934**)

V.3.1.2. La métaxénie

La métaxénie agit sur la morphologie du fruit, de la graine et de l'endosperme (**Nixon, 1928**)Le pollen joue un rôle important, à savoir l'effet métaxénie démontrés par (**Nixon, 1934**)c'est-à-dire que le pollen affecte non seulement la maturité des fruits, mais aussi le poids, la taille et le volume des fruits. (**Osman, 1974**)ont montré que le rapport entre le poids des noyaux et le poids total des fruits était influencé par le pollen.

(**Osman, 1974**)a suggéré que les pollens de certaines espèces qui induisent une maturation tardive peuvent être utiles dans des conditions où la maturité précoce est défavorable.Les effets métaxéniques attendus doivent également être pris en compte pour éviter les effets indésirables.

En effet, plusieurs études ont été effectuées sur la métaxénie, et l'effet du pollen sur le fruit chez plusieurs espèces, principalement chez le palmier dattier (**Nixon, 1928**) (**Chouach-khouane, 2022**) (**Rezazadeh, 2013**), (**Hafez, 2014**) (**Salomon-Torres, 2017**)ce qui rend le choix d'un bon pollen à utiliser pour la fécondation est indispensable pour assurer une meilleure production de dattes en quantité et qualité.

V.3.2. En pharmacologie et médecine traditionnelle

Le pollen du palmier dattier possède des molécules actives qui lui en confèrent des propriétés pharmacologiques intéressantes, on peut citer :

V.3.2.1. La propriété antioxydante

Actuellement, l'utilisation d'antioxydants à base de plantes pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et réduire les effets négatifs du stress oxydatif sur les cellules et les tissus du corps attire l'attention des chercheurs. Le pollen et les graines du palmier dattier ont un fort pouvoir antioxydant dû à la présence de nombreux composés aux effets cicatrisants et antioxydants (**Bentrad, 2017**) Ainsi, d'autres travaux ont prouvé qu'il y a une corrélation entre la teneur en polyphénols et la capacité antioxydante de pollen du palmier dattier qui provoque l'amélioration de neutralisation des radicaux libres (**Benouamane, 2022**)

V.3.2.2. La propriété enzymatique

C'est la capacité d'inhiber un enzyme responsable à un effet nocif ou bien une maladie grave tels que : anti-brunissement, ou bien réglage de des taux de glucose par quantité élevée de polyphénols et flavonoïdes (**Al-Okbi, 2022**)

V.3.2.3. La propriété antifongique

C'est l'effet du substrat sur les microorganismes, c'est-à-dire la capacité de traiter les mycoses ; ou bien l'infection causée par le champignon ; Autrement dit, la capacité de l'extrait à inhiber la croissance de champignon *Fusarium oxysporum* (**Bentrad, 2017**)

V.3.3. La fertilité mâle

Certains chercheurs ont décrit l'importance de pollen de datte en médecine traditionnelle. Il est largement utilisé pour traiter l'infertilité masculine. De même ce pollen a un effet aphrodisiaque dû peut être attribué à la présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes et de saponines dans l'extrait (**Abedi et al.2014 in (Bentrad, 2017)**) Les composés gonadotropes et stéroïdiens du pollen de palmier dattier jouent un rôle dans le traitement de l'infertilité masculine. Certaines études ont trouvé des changements positifs aux niveaux des hormonaux qui jouent un rôle sur l'infertilité masculine.

Le nombre limité d'études menées sur ce sujet indique que davantage de recherches sont nécessaires. **(Bentrad, 2017)** En effet, Il pourrait avoir le potentiel d'améliorer les facteurs de fertilité ; le nombre et la motilité des spermatozoïdes, le rapport de l'épididyme ou des testicules au poids corporel et le taux d'œstradiol, l'augmentation de l'hormone lutéinisante et de la testostérone et l'augmentation du diamètre des tubules séminifères ont été révélés lors du traitement des rats avec des pollens de palmier dattier a augmenté aux trois doses appliquées (120, 240 et 360 mg/kg), ce qui indique que **Mehraban F. et al., 2014 in (Al-Okbi, 2022)**.

Chapitre II
Les substances bioactives d'origine
végétale

Chapitre II Les substances bioactives d'origine végétale

Dans ce chapitre nous parlons des composées phénoliques et leurs rôles dans le stress oxydatif, les activités biologiques (antioxydants, enzymatiques ...) et l'activité antifongique

Bien que toutes les plantes possèdent plusieurs molécules actives, qui sont issue du métabolisme cellulaire ou bien du milieu extérieur et car elles se diffèrent avec sa caractérisation et sa fonction, on peut l'utiliser dans les domaines thérapeutiques. Elles se divisent en deux catégories : les métabolites primaires et les métabolites secondaires **(Bruneton, 1999)**

VI Métabolites primaires

Les métabolites primaires se trouve dans toutes les cellules et elles sont nécessaires pour la vie de la plante car elles participent à des nombreuses fonctions essentielles tels que, la photosynthèse, respiration, croissance et développement de la plante **(Croteau, 2000)** Parmi ces métabolites : glucides, lipides, protides, acides aminés et protéines.

Les métabolites secondaires se forment à partir de ces molécules à travers différentes réactions chimiques. **(Bruneton, 1999)**

VII Métabolites secondaires

Le terme "métabolites secondaires", probablement introduit en **1891 par Albrecht Kossel**, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques chez les plantes ; qui n'exerce aucune fonction directe aux niveaux de l'activité fondamentale de l'organisme végétale, telles que la défense, le développement, la régulation de la communication de cellule à cellule et le cycle catalytique **(Guillaume, 2008)**

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 ont des structures définies et sont très diversifiés, et sont produites en petites quantités seulement. Ces molécules peuvent être utilisées comme des marqueurs discriminants spécifiques à des espèces, des familles ou des genres de plantes, permettant la construction de taxonomies chimiques **(Hartmann, 2007)**

VII.1. Classification des métabolites secondaires

Les composés de métabolismes secondaires sont classés en 3 grandes classes ; les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes

Tableau 2 : Les grandes classes des métabolites secondaires (Merghem, 2009)

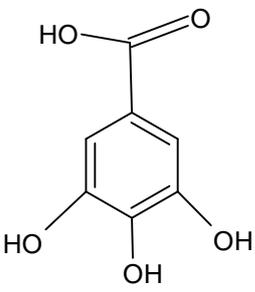
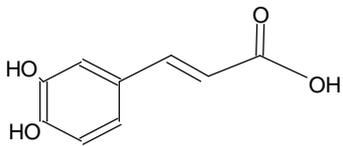
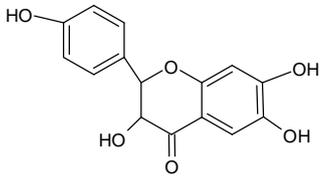
Les classes	Les exemples
Les composés phénoliques	Phénols simple(C3), flavonoïdes (C6-C3-C6)
Les terpénoïdes	Les tétras terpènes (C40) « caroténoïdes »
Les alcaloïdes	Quinine, atropine(C ₁₇ H ₂₃ NO ₃)

VII.1.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont un groupe de substances présentes et diversifiées allant de molécules simples à des structures très complexes (Reynaud, 2007) Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits végétaux car ils sont présents dans la plupart des organes et des tissus utilisés ou consommés par l'homme (Cheynier, 2006)

Ils sont classés selon la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau de benzénique : dérivés C₆C₁, dérivé C₆ C₃ (phenylpropanoïde) et les composés C₆-C₃-C₆ (la classe la plus importante)

Tableau 3 : Quelques composés phénoliques basiques : acide gallique (a), acide caféique (b) pélargonidine Invalid source specified.

dérivé de C ₆ C ₁	dérivés en C ₆ C ₃ ou bien phenylpropanoïdes	C'est la classe la plus importante de C ₆ -C ₃ -C ₆
 <p>acide gallique</p>	 <p>acide caféique</p>	 <p>Quercétine</p>

Le terme flavonoïde (flavus, dérivé du latin «jaune») décrit un très large éventail de substances naturelles appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de divers organes végétaux (Yeza, 2014) Les flavonoïdes sont des pigments végétaux presque omniprésents qui sont presque toujours solubles dans l'eau (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (Collin, 2011) La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation permettent de distinguer différents flavonoïdes.

Les flavonoïdes ont une classe principale dans les composés phénoliques à cause de leurs importances dans la physiologie de la plante et leurs rôles de pigmentations (Claudine, 2004) Elles se localisent dans les feuilles, les fleurs et les fruits (Bruneton, 1999) nous citerons : (Merghem, 2009)

D'une part, on a Les anthocyanes : c'est la classe qui donne par l'ionisation des couleurs différents, exemple : pélagonidine donne couleur rouge-magenta

D'autre part, les flavonoïdes ont des phytoconstituants de principes actifs-solubles dans et on les trouve dans plusieurs plantes médicinales qui possèdent un rôle thérapeutique, nous citons : **flavanones, flavones, flavonols**

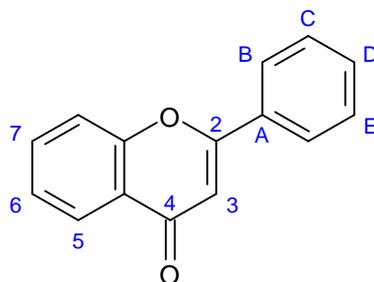
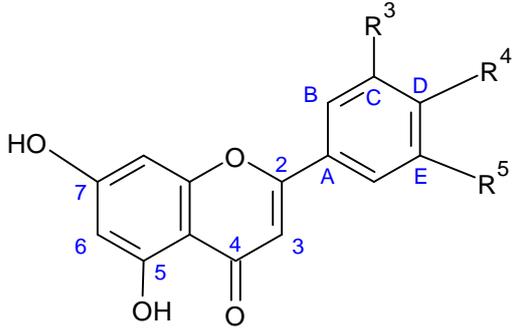
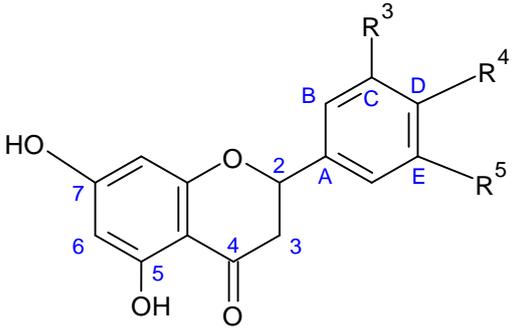
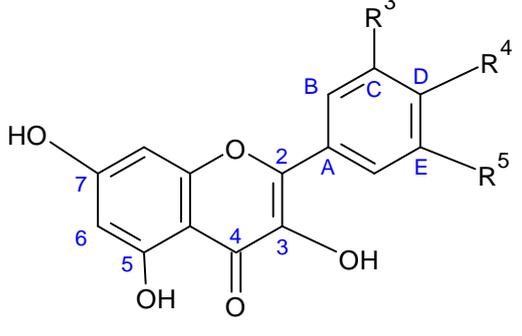
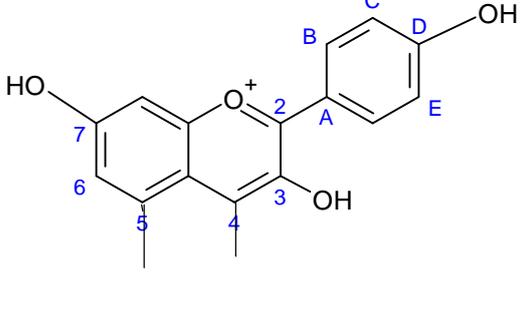


Figure 7: Structure des bases de flavonoïdes (Collin, 2011)

Tableau 4: les différentes classes des flavonoïdes (Cheynier, 2006)

 <p>Flavones</p>	 <p>Flavanones</p>
 <p>flavonols</p>	 <p>Anthocyanidine : exemple :pélagondine</p>

VIII Les activités biologiques des polyphénols

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro*, résultant de leur activité réductrice (effets antioxydants) et de leur affinité pour diverses protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

Aujourd'hui, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical, et on sait qu'ils ont des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anticancéreuses. Ils ont également un effet positif sur l'obésité, le diabète. L'activité biologique des polyphénols est fréquemment évaluée *in vitro*, y compris les protéines purifiées, les extraits cellulaires et les cellules entières cultivées.

Néanmoins, pour démontrer les effets des polyphénols sur la santé *in vivo*, une meilleure compréhension de la biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après leur absorption finale à travers la paroi intestinale) et la combinaison d'études cliniques pertinentes sont essentielles.

VIII.1. Effet antioxydant**VIII.1.1. Les antioxydants**

Le terme « antioxydant » est défini comme « une substance qui, à de faibles concentrations, en présence d'un substrat facilement oxydant, ralentit ou empêche de manière significative l'oxydation du matériau du substrat». Autrement dit, les antioxydants en tant que substances qui neutralisent ou réduisent les dommages causés par les radicaux libres dans le corps et aident à maintenir des niveaux non cytotoxiques de ERO (espèce réactive de l'oxygène) au niveau cellulaire. Il existe deux types d'antioxydants : endogènes (ex: catalase...) et exogènes (ex : glutathion) (**Vansant, 2004**) (**Mohammedi, 2013**)

VIII.1.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les espèces réactives des dérivés de l'oxygène (ERO) et l'activité antioxydants de la cellule (**Pizzino, 2017**)**En effet**, nos mauvaises habitudes alimentaires contribuent à une augmentation de concentration des ERO qui sont produits dans notre corps. C'est un potentiel associé à un risque accru de développement de stress oxydative ; et de nombreuse maladies telle que : les maladies cardiovasculaires et le cancer (**ding, 2003**)

VIII.1.3. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique avec un ou plusieurs électrons isolés dans sa couche externe, ce qui lui confère une instabilité et une réactivité élevée (**Ortiz, 2013**). Les espèces radicalaires tentent de réparer l'électron isolé en attaquant la molécule où l'électron aurait pu être arraché. (**Afanasev, 2009**)Ce sont des éléments indispensables à la vie ; car ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques dans les processus de croissance et de défense de l'organisme. En effet, ils interviennent dans le fonctionnement de certaines enzymes. (**Guillouty, 2016**)

VIII.1.3.1. Espèce réactive de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène sont les produits d'activation de l'oxygène moléculaire par le métabolisme cellulaire normal (**Preiser, 2012**); elles se divisent en deux classes ; radicalaires et non radicalaires (**tableaux 5**). La classe des ERO radicalaire présente les radicaux libres ; qui sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant un non-électron s'apparier dans leurs orbitales extérieures. (**Burton, 2011**)Ces radicaux libres ont un nombre impair d'électrons, ce qui les rend instables, réactifs et puissants, il se stabilise en retirant des électrons d'autres composés. La molécule du composé ciblé perd un électron et devient lui-même un radical libre, déclenchant une série de réactions des chaînes qui finissent par endommager les cellules vivantes (**Phaniendr, 2014**)

La forme non radicalaire est créée lorsque deux radicaux libres partagent un électron non apparié. (Burton, 2011)

Tableaux 5 : liste de classe radicalaires et non radicalaires des ERO (Preiser, 2012)

ERO radicalaire	ERO non radicalaire
Anion super oxydé $O_2^{\cdot-}$	<i>Oxygène singulet 1O_2</i>
Dioxyde de carbone $CO_2^{\cdot-}$	<i>Hydroperoxyde ROOH</i>
Radical alcoyle RO^{\cdot}	<i>Ozone O_3</i>
Radical hydroxyle OH^{\cdot}	<i>Peroxyde d'hydrogène H_2O_2</i>
Radical peroxyde ROO^{\cdot}	<i>Acide hypochlorique HOCl</i>

I.1.1.1. Origine du stress oxydatif (origine des ERO)

I.1.1.1.1. Origine Endogène

Les espèces endogènes réactives de l'oxygène peuvent avoir deux sources ; enzymatique et non enzymatique. Premièrement, l'enzymatique comprennent les enzymes qui stimulent les réactions génératrices de ERO telles que **la xanthine oxydase et la NADPH oxydase**, tandis que les sources non enzymatiques concernent les organes cellulaires tels que les mitochondries, les peroxysomes et Réticulum endoplasmique (RE) où la consommation d'oxygène est élevée. (Bhattacharyya, 2014)

I.1.1.1.2. Origine exogène

Ce sont principalement des oxydants environnementaux tels que les pesticides, les métaux lourds (fer, cuivre, cadmium, mercure et arsenic), la fumée de tabac, l'alcool, la poussière. (Liguori, 2018) Et le rayonnement solaire et électromagnétique (rayons ultraviolets). Certains médicaments comme la cyclosporine, le tacrolimus, la gentamycine et la bléomycine peuvent également être envisagés

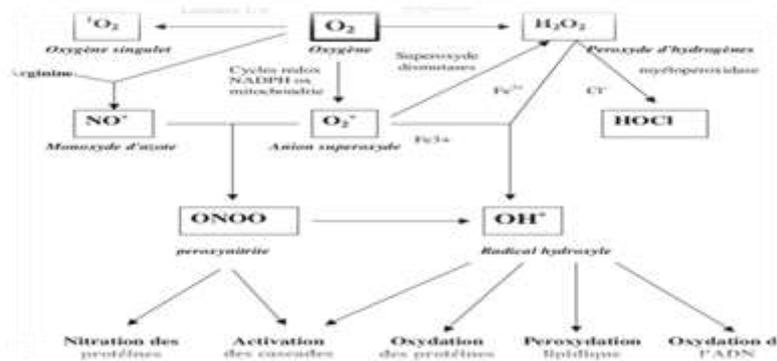


Figure 8: Origine des différents radicaux libres oxygénés et Espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Dalton, 2002)

I.2. Effet inhibiteur des enzymes

Grâce à la propriété des polyphénols d'interagir avec les protéines, ils ont la capacité d'inhiber certaines enzymes constituant des cibles biologiques.

I.2.1. Alpha amylase

L'alpha amylase est l'une des enzymes industrielles les plus importantes et les plus anciennes. C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, endoglycanases, hydrolases, et agissant sur les liaisons α (1-4) de l'amidon. L'effet présente un mélange de glucose, de maltose et de dextrine dès le départ. La réaction finale produit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons α (1-6) aux points de ramification de la chaîne (Alais, 2008). Elle existe chez les animaux, les plantes et les micro-organismes, et leur structure tridimensionnelle et la structure tissulaire des parties actives sont similaires. elles sont d'une grande importance, tant pour leurs applications industrielles et biotechnologiques, que pour leur implication dans certains désordres métaboliques (Diabète, obésité, etc.) (Mercier, 1985) Plusieurs composés phénoliques ont une activité inhibitrice de l' α -amylase (Sales, 2012) Ces dernières années, de nombreuses tentatives ont été faites pour définir inhibiteurs efficaces de l' α -amylase à partir de ressources naturelles pour le développement de nouveaux composés antidiabétiques pour le traitement du diabète sucré (Kumar, 2011) (Saha, 2012)

Récemment, ce type de polyphénol joue un rôle de régulateur de la sensibilité à l'insuline et de facteur préventif du diabète et de l'obésité (Kao, 2006) Ces auteurs ont découvert que l' Epigallocatechine gallate (EGCG) perturbe l'insuline en réduisant l'expression des gènes qui contrôlent la gluconéogenèse, réduisant ainsi la production hépatique de glucose et augmentant la gluconéogenèse. (Hanhineva, 2010); (Bahadoran, 2013)

Aussi, une étude menée par **(Kumar, 2011)** décrit les effets des polyphénols sur le métabolisme du glucose à trois niveaux : diminution de l'absorption intestinale du glucose, augmentation de la sensibilité des récepteurs pancréatiques au glucose, et amélioration de l'absorption du glucose par les tissus périphériques.

I.2.2. Inhibition des enzymes impliqués dans le brunissement enzymatique

Ce phénomène peut entraîner l'oxydation et la polymérisation des composés phénoliques du fait de l'activité enzymatique du phénol oxydase (**PPO**) et/ou de la peroxydase (**POD**), conduisant à la formation de pigments bruns.

I.2.2.1. Mécanisme de l'activité PPO

En présence d'oxygène, le PPO catalyse l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) et ensuite, l'oxydation des o-diphénols en o-quinones respectives (activité catécholase) **(Robb, 1984)** Le PPO peut insérer de l'oxygène orthogonal au groupe hydroxyle existant dans le cycle aromatique, suivi de l'oxydation de diphénol en quinone correspondante; L'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction **(Meyer, 2004)**

Un brunissement enzymatique a été observé chez des végétaux riches en composés phénoliques (**(Cheftel, 1984); (Jeantet, 2006)**). En effet, le degré de brunissement dépend de la teneur en phénol et de l'activité polyphénoloxydase (PPO) Invalid source specified. La couleur brune des fruits après récolte est principalement due à la décomposition des anthocyanes et composés phénoliques oxydants (**(Whitaker, 1995) (Sanchez-Ferrer, 1995)**). Divers composés phénoliques sont oxydés par le PPO **(Sapers, 1993)**

I.2.2.2. Mécanisme de l'activité de POD

La peroxydase est un groupe d'enzymes qui catalysent les réactions d'oxydation en réduisant le peroxyde d'hydrogène en eau tout en oxydant une variété de substrats **(Bucheli, 1994)**; La deuxième catégorie est celle des donneurs d'hydrogène, tels que les composés phénoliques, les nitrites, l'acide ascorbique et les amines.

C'est en raison de son rôle de catalyseur de l'oxydation des composés phénoliques, qui en présence d'eau oxygénée conduit à la formation de produits de dégradation bruns, que la POD est impliquée dans la dégradation des composés phénoliques et réduit la couleur et la saveur des produits horticoles **(Terefe, 2014)**

VII.3. Effet anti-inflammatoire

L'inflammation est un mécanisme avec des bienfaits sur le corps. Leur but principal, est l'élimination des agents pathogènes et réparations des lésions cellulaires.

L'inflammation, soit néfaste par l'agressivité du pathogène, sa persistance, la localisation de l'inflammation, la dérégulation du processus inflammatoire, ou bien par des

anomalies quantitatives ou qualitatives des cellules impliquées dans l'inflammation. (Rousselet, 2005).

Les anti-inflammatoires se divisent en trois catégories : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (Ziltener, 2010) stéroïdiens (corticostéroïdes) (Thomas, 2017) naturels (Maroon, 2010).

L'évaluation de cette activité consiste à mesurer le pourcentage d'inhibiteur de la dénaturation thermique (72°C) de protéine BSA (Bovine sérum albumen) par les extraits de pollen de la plante *Phoenix dactylifera L.* lorsque la température permet de dénaturer le BSA donc elle permet de modifier leurs propriétés par l'apparition des antigènes hypersensibles de type III et peut être liée à plusieurs maladies. (Dharsana, 2014).

VII.4. Effet anti-lithiasique

C'est une activité qui se réalise par la présence des inhibiteurs capables de former des produits chimiques solubles en se fixant à la surface du cristal de grain pour empêcher la croissance et agrégat réduisant ainsi le risque de cristallisation (Sbahi, 2017) et ils réagissent sur les différentes étapes de la formation des cristaux : nucléation et agrégation (Daudon, 2012).

L'évaluation de cette activité consiste à mesurer le pourcentage d'inhibiteur de l'extrait aqueux pollen de *Phoenix dactylifera* sur la cristallisation d'oxalocalcique *in vitro*, basée sur le principe de la mesure de la turbidité, suivie d'une étude microscopique (Abu Zarin, 2020)

VII.5. Evaluation *in-vitro* des activités antifongiques

De nombreux flavonoïdes ont des propriétés antifongiques inhibent les cellulases, les xylanases et les pectinases microbiennes, chélatent les métaux requis par les enzymes et forment des structures cristallines dures qui agissent comme des barrières physiques contre les agents pathogènes. Les flavonoïdes jouent également un rôle important dans la résistance fongique post-récolte des fruits et légumes. En fait, des niveaux plus élevés de flavonoïdes dans le pollen de palmier sont souvent corrélés avec des niveaux plus faibles d'agents pathogènes Cette observation est également utilisée pour augmenter la durabilité du pollen et des dattes. Par exemple, l'irradiation UV de *Phoenix dactylifera* augmente la concentration de flavonoïdes et réduit la contamination par *Fusarium oxysporum*. (FOL) (Bentrad, 2017)

A titre d'exemple, la fusariose est une maladie causée par des champignons du genre *Fusarium*. Chez la tomate, cette maladie existe sous deux formes différentes : la fusariose (fusariose) causée par champignon *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* signifie **Fol** et pourriture fusarienne du collet et des racines causée par le champignon *Fusarium oxysporum f.sp.radicis-lycopersici* abrégé en **Forl**.

Le champignon *Fusarium oxysporum* est distribué dans le monde entier et provoque une grave flétrissure. Il existe plus de 120 formes spéciales avec des gammes d'hôtes correspondantes. Dans le milieu de culture, les colonies de *Fusarium* isolées sont généralement roses, jaunes, rouges ou violettes, souvent violettes, et rares à nombreuses. Les champignons du genre *Fusarium* ont des hyphes incolores et septés (**Booth, 1971**) La caractéristique commune de *Fusarium* est la production de macroconidies multicellulaires en forme de croissant et d'autres spores asexuées; les microconidies unicellulaires ou bicellulaires de formes diverses, ainsi que les spores de chlamydospores, sont des formes résistant.

Partie expérimentale

Chapitre 1 :
Matériel végétal et démarches
méthodologiques

Chapitre 1 : Matériel végétale et démarches méthodologiques

Notre expérimentation vise à étudier plusieurs activités biologiques *in vitro* associées à *Phoenix dactylifera L.*. Pour se faire, différents extraits de pollen ont été utilisées pour évaluer leurs propriétés antioxydantes, antidiabétiques et anti-inflammatoires. A cet effet, l'extraction et l'évaluation des activités biologiques et anti-fongique ont été réalisé au niveau du Laboratoire de Biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologies (CRBt).

I Matériel végétal

Afin de réaliser notre étude, nous avons utilisé trois types de pollen qui appartiennent à trois différents pieds mâles (Dokkars) de l'espèce "*phoenix dactylifera*". Ces pieds mâles ont été prouvés préalablement, sur le plan moléculaire, qu'ils n'ont pas le même profil génétique (**Chaouch-Khouane, 2020**) Ces pollens ont été récoltés de la région de Biskra, en période de pollinisation (Mars-Avril). Ainsi, un autre type de pollen a été récolté à partir d'une autre espèce *Phoenix canariensis* de la région de Ali-Mendjeli, Constantine et utilisée en tant que « Out group » pour faire la comparaison.

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

Systématique de *Phoenix canariensis*

Groupe	<i>Spadiciflores</i>
Ordre	<i>Palmales</i>
Famille	<i>Arecaceae</i>
Sous-famille	<i>Coryphoïdaea</i>
Tribu	<i>Phoeniceae</i>
Genre	<i>Phoenix</i>
Espèce	<i>Phoenix canariensis L.</i>



Figure 9 : Le pollen de *Phoenix canariensis*

II Extraction des métabolites par macération

L'extraction par macération consiste le contact direct entre le substrat et les solvants afin d'extraire les composés actifs. Elle se fait à température ambiante et avec une agitation continue à l'aide des solvants ayant la capacité de s'évaporer facilement.

Pour notre étude nous avons utilisé un solvant volatil polaire qui est 'le méthanol '.

Mode opératoire

II.1.Macération

Nous avons pris quelques grammes de poudre de pollen macère dans le solvant (méthanol) à raison de 80 ml de solvant pour chaque 20g de poudre, à température ambiante et sous agitation continue pendant 24 heures.



Figure 10 : Les étapes de la macération

II.2.Filtration

Après 24 heures d'agitation, nous avons filtrer les mélanges à l'aide d'un papier filtre (Wattman) sous l'action d'une pompe à vide.



Figure 11 : L'étape de filtration sous-vide après macération

II.3.Evaporation

C'est la dernière étape de l'extraction, elle permet d'échapper le solvant par distillation à l'aide de l'évaporateur rotatif sous une température de 40° C pour le méthanol, jusqu'à ce qu'à l'évaporation totale du solvant pour obtenir l'extrait brut.



Figure 12 : L'étape de l'évaporation du solvant

Après l'évaporation, le produit issu de cette extraction est retiré du ballon pour mesurer le rendement.

II.4. Rendement de l'extrait

Après l'extraction, la mesure du rendement de l'extrait est l'étape la plus importante pour connaître la quantité et le pourcentage de l'extrait obtenu par cette méthode. Ce rendement est calculé en comparant le poids de l'extrait après évaporation à son poids initial

$$(Pa - Pv / Pe) \times 100 = \% \text{ Rendement}$$

Pa=poids de ballon contenant l'extrait

Pv = poids de ballon vide

Pe=Poids de l'échantillon

III.1. Etude colorimétrique des polyphénols

III.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

La quantification des polyphénols totaux dans notre étude a été déterminée par la méthode colorimétrique du réactif de **Folin Ciocalteu** (mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$)). Lors de l'oxydation des polyphénols en milieu alcalin, le Folin Ciocalteu (FCR) se réduit à un mélange d'oxyde tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleutée dont le maximum d'absorbance se situe dans le visible à **765 nm**. La couleur produite est proportionnelle à la teneur totale en polyphénols de l'extrait. La méthode de dosage réalisée est celle décrite par (**Müller L., 2010**)

Mode opératoire

Le protocole adopté pour la détermination des polyphénols totaux est celui de (**Müller L., 2010**) La méthode consiste à mettre 20 μ l de chaque extrait (1 mg/ml) avec 100 μ l de FCR dilué (1 :10) et 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%) puis mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h, puis la lecture à **765 nm** avec un lecteur microplaque. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

Une gamme d'étalonnage a été préparée en parallèle en prenant 1 mg de l'acide gallique dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S₁ (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des tubes eppendorfs comme la suite:

1.562 μ g /ml	—————>	1.562 μ l de S1+ 198.43 μ l de MeOH
3.125 μ g /ml	—————>	3.125 μ l de S1+ 196.87 μ l de MeOH
6.25 μ g /ml	—————>	6.25 μ l de S1+ 193.75 μ l de MeOH
12.5 μ g /ml	—————>	12.5 μ l de S1+ 187.5 μ l de MeOH
25 μ g/ml	—————>	25 μ l de S1+ 175 μ l de MeOH
50 μ g /ml	—————>	50 μ l de S1+ 150 μ l de MeOH
75 μ g/ml	—————>	75 μ l de S1+ 125 μ l de MeOH
100 μ g/ml	—————>	100 μ l de S1+ 100 μ de MeOH

III.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

Les flavonoïdes sont un groupe majeur d'antioxydants phénoliques dérivés de plantes médicinales (Chen, 2020) Ils se composent de flavanols, d'anthocyanes, d'isoflavonoïdes, de flavanones et de flavones. Les flavanones et les flavones se trouvent généralement dans le même fruit et sont liés ensemble par des enzymes spécifiques, mais les flavones et les flavanols ne partagent pas ce phénomène et sont rarement trouvés ensemble.

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. La méthode de (Öztürk, 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

Mode opératoire

Le protocole adopté pour le dosage des flavonoïdes totaux est celui de (Öztürk, 2007) avec des optimisations faites par le laboratoire de biochimie de CRBt. Il consiste à déposer 50 μ l de chaque extrait (1 mg/ml) avec 130 μ l de méthanol, 10 μ l acétate de potassium (CH_3COOK) (1 M) et 10 μ l de nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) (10%). Après une incubation de 40 min à température ambiante, une lecture d'absorbance se fait à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μ l extrait + 150 μ l méthanol).

Une gamme d'étalonnage a été préparée en parallèle en prenant 1 mg de Quercétine dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S_1 (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des tubes eppendorfs comme suite :

1.562 μ g /ml	→	1.562 μ l de S_1 + 198.43 μ l de MeOH
3.125 μ g /ml	→	3.125 μ l de S_1 + 196.87 μ l de MeOH
6.25 μ g /ml	→	6.25 μ l de S_1 + 193.75 μ l de MeOH
12.5 μ g /ml	→	12.5 μ l de S_1 + 187.5 μ l de MeOH
25 μ g/ml	→	25 μ l de S_1 + 175 μ l de MeOH
50 μ g /ml	→	50 μ l de S_1 + 150 μ l de MeOH
75 μ g/ml	→	75 μ l de S_1 + 125 μ l de MeOH
100 μ g/ml	→	100 μ l de S_1 + 100 μ l de MeOH

Etude des activités biologiques

III.1.3. Evaluation des activités anti-oxydantes

L'évaluation des activités antioxydantes a été réalisée sur des microplaques et différentes concentrations ont été préparées à partir d'une solution mère (20 mg/ml)

10 mg /ml	→	250 µl de SM+ 250 ml de MeOH
8 mg /ml	→	200 µl de SM+ 300 ml de MeOH
6 mg /ml	→	150 µl de SM+ 350 ml de MeOH
4 mg /ml	→	100 µl de SM+ 400 ml de MeOH
2 mg/ml	→	50 µl de SM+ 450 ml de MeOH
1 mg /ml	→	250 µl de S (2 mg/ml) + 250µl de MeOH
0.5 mg/ml	→	250 µl de S (1 mg /ml) + 250 µl de MeOH

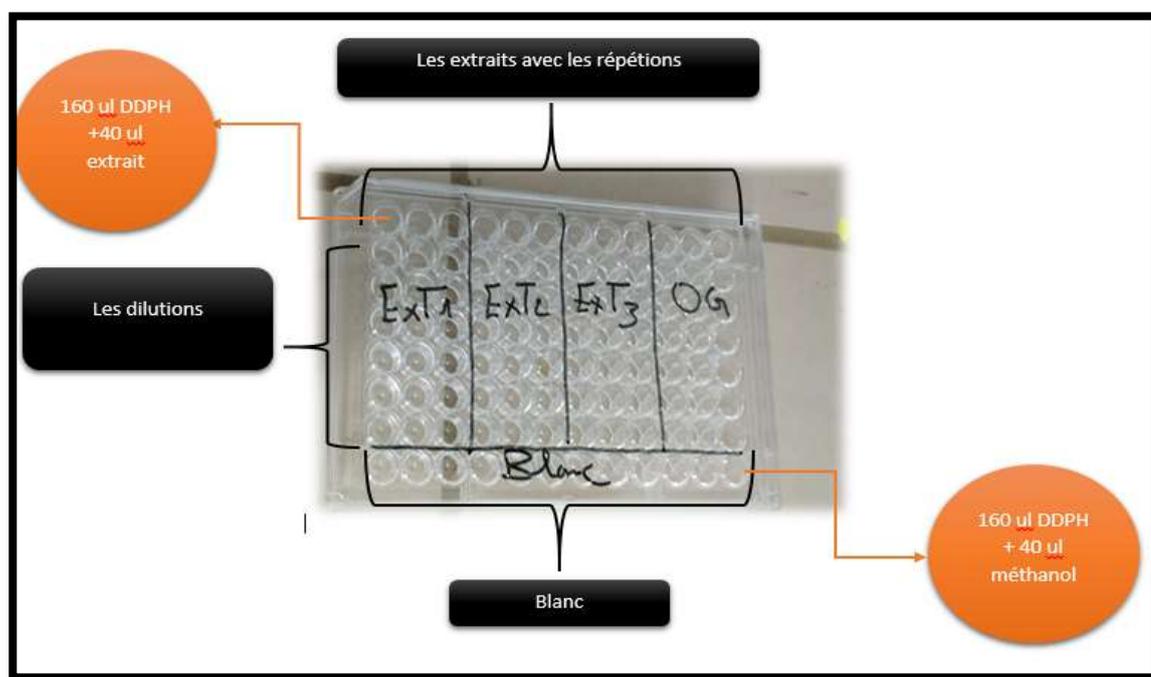


Figure 13 : Exemple de l'utilisation de la microplaque pour les activités antioxydantes

III.1.3.1. Evaluation des activités antioxydantes non enzymatiques

III.1.3.1.1. le piégeage du radical DPPH (diphényle-picryl-hydrazyle)

Principe

Ce test renseigne sur le pouvoir anti-radicalaire direct de différentes substances phénoliques présentes dans l'extrait. La réduction des radicaux DPPH (cation radical libre et stable) par les antioxydants (des composés capables de transfère des atomes d'hydrogène) peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible en mesurant la réduction d'absorbance à

517 nm provoquée par la présence d'extraits phénoliques. DPPH est initialement violet et cette couleur peut se disparaître pour être jaune dans la forme DPPH-H ; non radicalaire. Ce changement de couleur représente la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de l'activité enzymatique. (Molyneux, 2004)



Figure 14: la réduction de DPPH par l'extrait

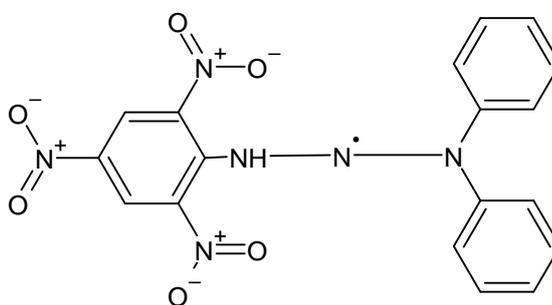


Figure 15 : Structure du radical stable DPPH (Molyneux, 2004)

Mode opératoire

Pour ce faire, différentes concentrations ont été préparées pour chaque extraits avec le méthanol ; 10, 8, 6, 4, 2, 1 et 0.5 mg/ml.

La méthode utilisée est celle de (Molyneux, 2004). Dans une microplaque à 96 puits, cette activité consiste à mettre 40 µl de chaque concentration d'un extrait avec 160 µl de solution de DPPH préalablement préparée à 0.1 mM. En parallèle, un contrôle négatif a été préparé en substituant l'extrait par le méthanol. Après 30 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur

de microplaques. Le pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de chaque extrait est calculé selon la formule suivante

$$\text{Taux d'inhibition} = \frac{[\text{Abs contrôle}(-) - \text{Abs Echantillon}]}{\text{Abs contrôle}(-)} \times 100$$

Où :

Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon

Abs Contrôle (-) : Absorbance du contrôle négatif

Ensuite, l'activité antioxydant est estimée par la détermination de la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) extraite de l'équation de la courbe de régression obtenue par les taux d'inhibition en fonction des concentrations étudiées.

III.1.3.1.2. Pouvoir de réduction ferrique (FRAP ; Ferrous Reducing Antioxidant Power)

Principe

Le test FRAP est une méthode colorimétrique de transfert d'électrons permettant de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} en donnant une couleur bleu-vert, qui s'absorbe en maximum dans une longueur d'onde de 700 nm (Oyaizu, 1986)

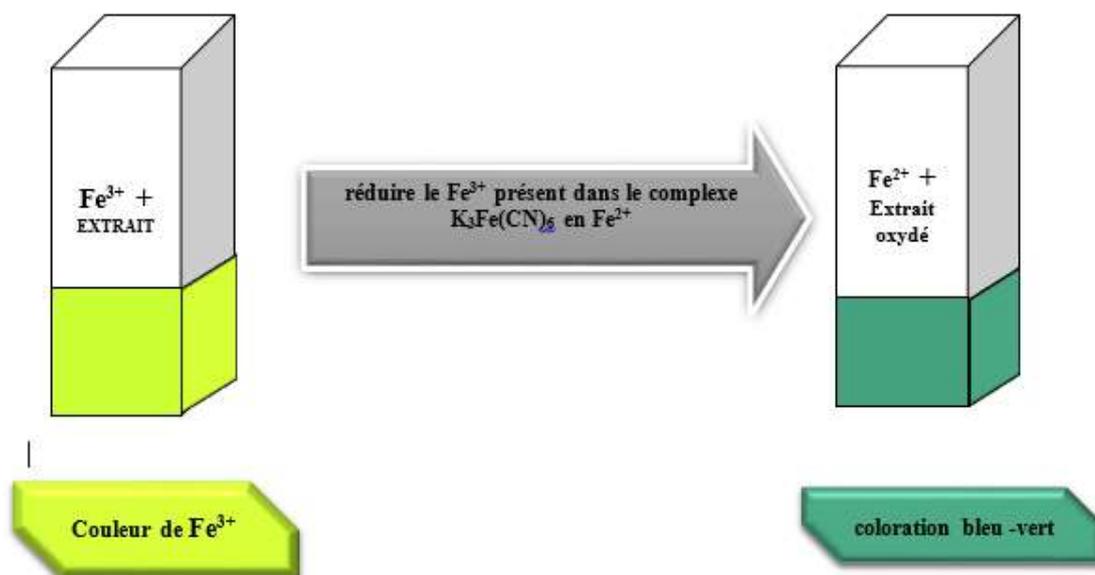


Figure 16 : la réduction du complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ par l'extrait

Mode opératoire

L'activité pouvoir réducteur est déterminée par la méthode de (Oyaizu, 1986) avec une légère modification. Cette méthode consiste à mettre dans une microplaque de 96 puits, un volume de 10 μl d'extrait (à différentes concentrations) en mélange avec 40 μl de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 50 μl d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%). La plaque est ensuite incubée à 50°C pendant 20 min. Puis, un ajout de 50 μl tri-chloro acetic acid (TCA) (10%), 40 μl H_2O distillée et 10 μl de la solution FeCl_3 (0.1%) et une lecture est faite à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur des plaques.

Les résultats ont permis de calculer la concentration efficace (IC_{50}) de l'extrait, qui correspond à une absorbance égale à 0,5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations étudiées ($A_{0,5}$).

III.1.3.1.3. Piégeage de l' ABTS (2,2 ' – azynobis- [3 – ethylbenzothiazoline – 6 – sulfonic acid]

Principe

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire par le test ABTS a été réalisée selon la méthode de (Re, 1999) Ce processus est un antioxydant qui récupère les radicaux cationiques préformés d'ABTS^{•+} générés par l'oxydation de la molécule stable de 2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou ABTS par le Persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Le passage du radical ABTS^{•+} bleu-verdâtre à la forme non radicalaire s'accompagne de la perte de cette coloration, mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm. Cette réduction de l'intensité de la coloration dépend de l'activité antioxydante du composé testé (Re, 1999)



Figure 17 : L'oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$)

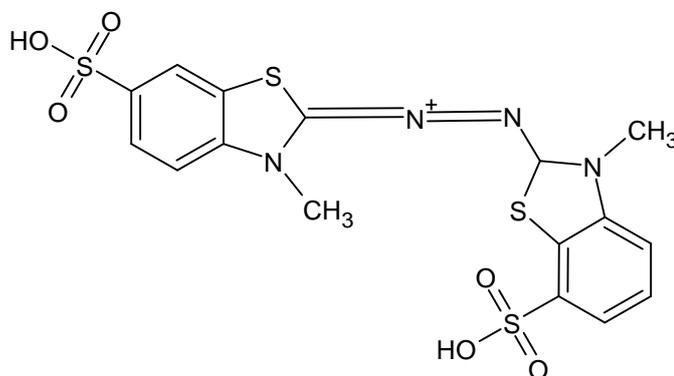


Figure 18 : structure du radical cation $ABTS^{\bullet+}$ (Miller, 1997)

Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, nous déposons 40 μ l d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 160 μ l de solution de ABTS préalablement préparée (Ce radical $ABTS^{\bullet+}$ est produit en faisant réagir 2 mM de l'ABTS avec 2.45 mM de persulfate de potassium pendant 16 heures à l'obscurité et à température ambiante). Après 10 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. En parallèle, un blanc est préparé en mettant 40 μ l de méthanol avec 160 μ l d'ABTS. Ensuite, le pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de chaque extrait est estimé selon la même formule que celle de DPPH et la concentration inhibitrice à 50% (IC_{50}) est déterminée de la même manière aussi.

III.1.3.1.4. Activité de Phénantroline

Principe

L'activité de la phénanthroline a été déterminée par la **méthode (Szydłowska-Czerniaka A, 2008)** Il est basé sur la réduction du Fer (Fe^{+3}) en Fer (Fe^{+2}) en présence d'antioxydants. Seul le fer (Fe^{+2}) se complexe avec la phénanthroline après la réaction d'oxydo-réduction et prend la couleur orange pour le complexe Ferrioxine (Fe^{+2} - phénanthroline).

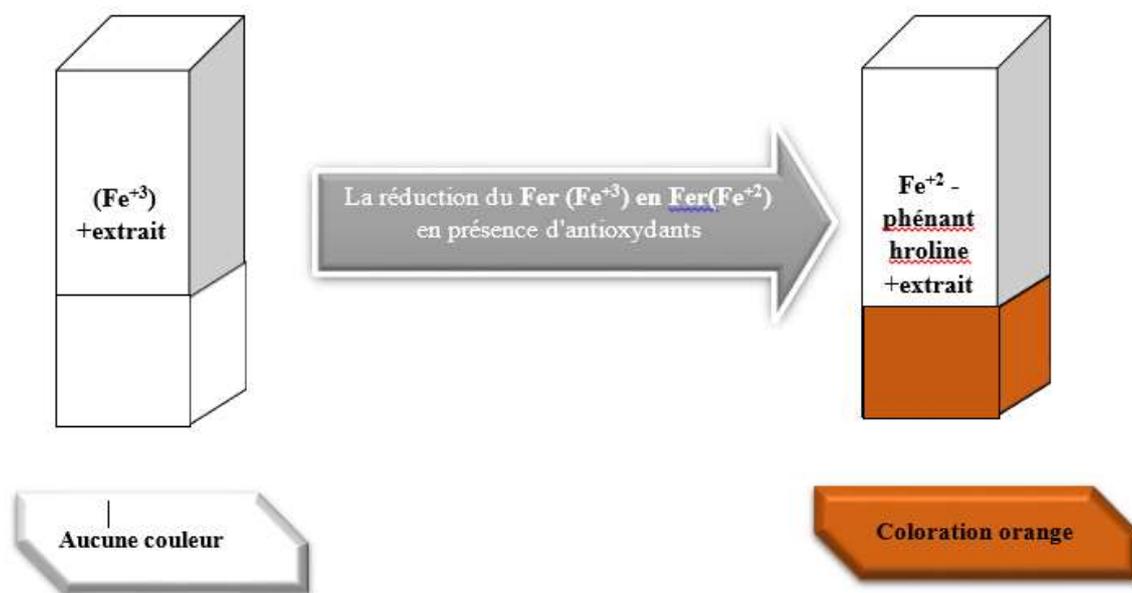


Figure 19 : la réduction de Fer (Fe^{+3}) en Fer (Fe^{+2})

Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, nous déposons 10 μl d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 50 μl ferrique chlorure FeCl_3 (0.2%) préalablement préparée (0.02g de FeCl_3 dans 10ml de H_2O) et 30 μl Phenanthroline (0.5%) (0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de MeOH) et 110 μl de méthanol MeOH . Après 20 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 510 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. En parallèle, un blanc est préparé en mettant 10 μl de méthanol avec 50 μl ferrique chlorure FeCl_3 et 30 μl Phenanthroline et 110 μl de méthanol MeOH . Les résultats ont permis de calculer la concentration efficace (IC_{50}) de l'extrait, qui correspond à une absorbance égale à 0,5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire des absorbances en fonction des concentrations étudiées ($A_{0.5}$).

III.1.3.2. Evaluation des activités antioxydantes enzymatiques

III.1.3.2.1. Evaluation de l'activité anti-brunissement

Principe

Le brunissement enzymatique est le résultat de la transformation de composés phénoliques en polymères colorés par des systèmes enzymatiques spécifiques. Les produits du brunissement enzymatique entraînent des changements dans la couleur et les propriétés sensorielles et nutritionnelles des plantes.

La réduction des niveaux d'antioxydants phénoliques et d'acide ascorbique accélère le processus de bronzage enzymatique (**Ponce, 2004**)

Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, nous avons effectué un test anti-péroxydase (POD), en déposant 40 µl d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 60 µl d'extrait enzymatique (E) préalablement préparée (30 g de pomme de terre dans 100 ml d'eau distillé, préparé d'après le protocole de Invalid source specified.. Après 5 min d'incubation à 25 °C, on ajout de 200 µl de solution de substrat S1 préalablement préparée, l'absorbance a été mesurée à 470 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. En parallèle, un blanc est préparé en mettant 40 µl de méthanol avec 60 µl d'extrait enzymatique (E) et 200 µl de solution de substrat S1.

Ensuite, le pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de chaque extrait est estimé selon la formule suivante et la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) est déterminée de la même manière aussi.

Calcul de pourcentage d'inhibition

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

- Activité enzymatique initiale (A_i) = D DO /min mesurée en absence d'extrait
- Activité enzymatique résiduelle (A_r) = DDO /min mesurée en présence d'extrait.

III.1.4. Evaluation de l'activité alpha amylase (antidiabétique)

Principe

L'activité inhibitrice de l'α-amylase a été réalisée en utilisant la méthode iode/iodure de potassium (**IKI**) (**Zengin, 2014**) avec quelques modifications. Plusieurs composés phénoliques possèdent une activité inhibitrice de l'α-amylase. Ces dernières années, il y a de nombreux efforts qui ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de l'α-amylase à partir des sources naturelles afin de développer de nouveaux composés antidiabétiques. (**Kumar, 2011**)

Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, nous déposons 25 µl d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 50 µl solution d'α-amylase (1U) préalablement préparée. Après 10 min d'incubation à 37 °C, Après pré-incubation, une solution d'amidon 50 µl (0.1%) a été ajoutée pour initier la réaction puis incubée à 37°C pendant 10 minutes.

La réaction a ensuite été stoppée par l'ajout de 25 µl de HCl (1M). Puis 100 µl de solution iodure-iodure de potassium IKI est additionner pour révéler la réaction. L'absorbance est mesurée à 510 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. 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.

Ensuite, le pourcentage d'inhibition pour différentes concentrations de chaque extrait est estimé selon la formule suivante et la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) est déterminée de la même manière aussi.

Calcul de pourcentage d'inhibition

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

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+125µl de tampon]

III.1.5. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

Principe

L'activité Anti-inflammatoire *in-vitro* est déterminée par la méthode de (**Kandikattu, 2013**)avec des légères modifications.

Le principe consiste à mesurer le pouvoir inhibiteur par la dénaturation thermique (72°C) de la protéine BSA (bovine sérum albumen) par les extraits dilués dans l'eau distillée de *Phoenix dactylifera L* et de l'extrait de *Phoenix canariensis* pour évaluer la propriété anti-inflammatoire. Dans ce test, la dénaturation de la BSA est provoquée par un traitement thermique, qui dénature la BSA ou bien une autre protéine native en altérant leurs propriétés. La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à cuve HELIOS EPSILON (Thermo scientifique)

Mode opératoire

La préparation des dilutions se fait à partir d'une solution mère 16 mg dans 4 ml de l'eau distillé.

Dans des tubes à essai, 500 µl de l'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) en ont été déposés puis l'addition de 500 µl de solution de BSA (0.2%) (0,2 g de BSA est dissoute dans 100 ml de tampon Tris-HCl), ensuite, l'incubation se fait à 37 C° pendant 15 min dans la cuve, puis dans un bain marie à 72°C pendant 5 min.

En parallèle, un blanc est préparé en mettant 500 µl d'H₂O avec 500 µl BSA et un blanc de l'extrait 500 µl de l'extrait avec 500 µl tampon. Après refroidissement, la turbidité est mesurée à 660 nm avec un spectrophotomètre à cuve. L'activité anti-inflammatoire est exprimée en pourcentage d'inhibition et elle est calculée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [\text{Abs control} - (\text{Abs extrait} - \text{Abs blanc extrait}) / \text{Abs control}] * 100$$

III.1.6. Activité anti-lithiasique

Principe

Le terme lithiase urinaire anciennement connue sous le nom de "maladie des pierre " fait référence à la maladie qui se caractérise par la formation de calculs dans les reins ou dans les voies de l'excrétion urinaire (cavité rénale, uretères, vessie).

Il existe plusieurs types de calculs qui calculent le calcium représentatif de la majorité des pathologies de la géluse et incluent des calculs spécifiques basés sur l'oxalate de calcium (75%) et le phosphate de calcium. Les calculs d'acide urique sont courants tandis que les calculs de magnésium (struvite) sont moins courants. Les calculs de cystine sont plus rares (Battu, 2016).

Mode opératoire

III.1.6.1.1. Test de nucléation

Dans une microplaque à 96 puits, nous déposons 40 µl d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 80 µl de calcium chloride CaCl₂ préalablement préparée (0.058 g de CaCl₂ dans 100 ml de tampon Tris-HCl à pH 6.6) puis 40 µl de l'oxalate de sodium NaC₂O₄ (0.01 g d'oxalate de sodium dans 100 ml de tampon Tris-HCl à pH 6.6), l'absorbance a été mesurée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Pour le blanc est mélange entre 40 µl de l'eau distillée et 80 µl de calcium chloride CaCl₂ et 40 µl l'oxalate de sodium NaC₂O₄ . La lecture à 0, 30, 60, 180, 360 min.

III.2.4.1.2. Test d'agrégation

Dans une microplaque à 96 puits, nous déposons 40 µl d'échantillon (chaque extrait à différentes concentrations) avec 120 µl de COM préalablement préparée [C'est un Mélange de deux solutions (oxalate de sodium + calcium chloride (200ml :200ml)) puis mises dans un bain marie pendant une heure à 60 °C jusqu'à précipitation des cristaux COM .ces cristaux sont ensuite séchés dans une étuve à 37 °C] . Pour le blanc, nous avons mélangé 40 µl de l'eau distillé avec 120 µl de COM. Quant au blanc de l'extrait, nous avons mélangé 40 ul d'extrait avec 120 ul tampon Tris-HCl . La lecture s'est faite à 0, 30, 60, 180, 360 min.

Ensuite, le pourcentage d'inhibition pour les différentes concentrations de chaque extrait est estimé selon la même formule que celle de DPPH et la concentration inhibitrice à 50% (CI₅₀) est déterminée de la même manière aussi.

A partir des résultats de pourcentage d'inhibition des échantillons, on observe à l'aide d'un microscope inversé équipé par un appareil photo numérique avec un grossissement 10× pour visualiser la formation des cristaux d'oxalate de calcium (le cas d'absence d'activité) ou bien l'inhibition de formation des cristaux (le cas de l'activité lithiasique) (Abu Zarin, 2020)

III.3. Evaluation de l'activité antifongique

Principe

C'est l'effet du substrat sur les micro-organismes, c'est-à-dire la capacité à traiter les infections fongiques donc quel que soit le type de flavonoïde considéré, il apparaît que les propriétés lipophiles des composés augmentent l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique. De plus, la présence de chaînes d'isoprène semble être importante pour l'activité antifongique (Bentrad, 2017)

Mode opératoire

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 de 21 g glucose, bien l'agiter pour que le jus de pomme de terre et glucose soit bien homogénéisé ; après nous avons rajouter doucement l'agar avec agitation et le stérilisé à l'autoclave pendant 2h à 121 °C. Après stérilisation, le milieu est refroidi, ensuite nous avons additionné nos extraits avec les concentrations choisies, puis coulé (environ 25 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri jusqu'à la solidification), les boîtes de pétri sous hotte.

	Pour 1l	Pour 1400 ml
Pomme de terre	200 g	280 g
Agar	15 g	28 g
Glucose	20 g	21 g

Le champignon utilisé pour l'évaluation de l'activité antifongique c'est *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL) strain 4287 (disponible au niveau du laboratoire de mycologie au CRBt et les concentrations utilisées des extraits sont : 0.09 mg /ml, 0.18 mg/ml et 0.36 mg /ml ,et sont préparer dans le DMSO, et 04 répétitions ont été faites pour chaque extrait et pour chaque concentration. Un blanc a été préparé en ajoutant le DMSO au milieu de culture au lieu de l'extrait dilué. Une fois les boites de pétrie coulées sont prêtes, un petit disque de champignon est déposé au milieu de chaque boite, puis les incubées dans une étuve à 25 °C pendant 5 à 6 jours .A la fin, les lectures des résultats sont obtenues en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque avec une règle (mm). Les résultats sont exprimés en diamètre de zone d'inhibition et peuvent être exprimés en lettres selon la sensibilité de la souche (**Ponce A. G., 2003**)

III.4. Traitement des résultats

Les résultats obtenus ont été présentés sous forme moyenn \pm ecartype, puis, une analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur suivi par un test de multi-comparaison *tukey* dans le but de déterminer la différenciation entre les types de pollen utilisés quant à leurs activités testés en se basant sur leurs IC₅₀ et A_{0.5}; polyphénols totaux , flavonoïdes totaux ,DPPH, ABTS, FRAP, Phénantroline, anti-brunissement et anti-inflammatoire. Nous avons utilisé le logiciel XLSTAT version 2016 avec un *P* value fixée à 0.05.

Chapitre II : Résultats et discussion

I.1. Rendement d'extraction des pollens

Afin d'étudier la bio-activité des différents types de pollens, objets de notre étude, l'extraction des composés actifs a été effectuée par macération en utilisant le méthanol comme solvant polaire et un pourcentage de rendement de chaque extrait a été calculé, indiqué dans le tableau ci-dessous.

Extrait	PPD 1	PPD 2	PPD 3	PPC
Rendement (%)	9.23 %	5.60 %	9.87 %	6.25 %

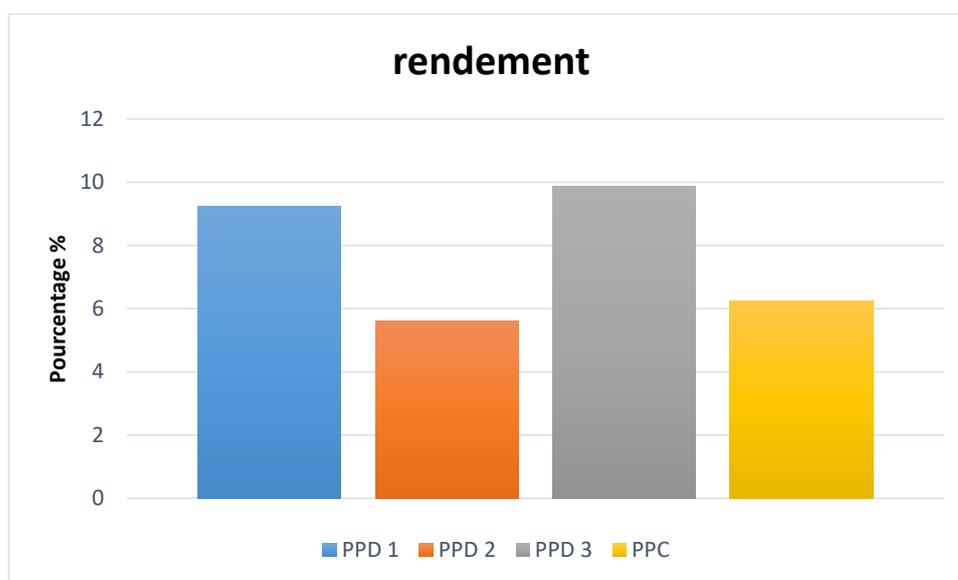


Figure 20 : Rendements d'extraction des différents types de pollens

Les résultats obtenus du pourcentage du rendement d'extraction montre que l'extrait DPP 3 a le pourcentage le plus élevé avec **9.87%** suivi par les extraits PPD 1 et PPD 2 avec **9.23 %** et **5.6 %** respectivement. En comparant avec l'espèce *Phoenix canariensis*, ceci a une valeur de **6.25 %**. Cette différence est probablement due aux caractéristiques intrinsèques des espèces et des individus .

I.2. Dosage des composées phénoliques

Une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation d'un spectrophotomètre UV-Visible a été utilisée pour déterminer la quantité des composés phénoliques totales et des flavonoïdes totales dans les différents types de pollen étudiés.

Il est connu que les polyphénols sont des molécules bioactives caractérisées par leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Pour cela, leur estimation en termes de quantité dans les extraits étudiés est importante. Le pollen de palmier dattier est connu pour sa richesse en polyphénols, flavonoïdes et autres composés phénoliques spécifiques aux végétaux. (Tamma, 2020).

Le dosage de polyphénols totaux (TPC) a été effectué par comparaison de la DO observée à celle obtenue avec un étalon d'acide gallique de concentrations connues. Le coefficient de corrélation de la courbe standard obtenu est $R^2 = 0,980$. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est dans l'annexe 2

Les résultats obtenus de la teneur en polyphénols totaux pour nos extraits sont exprimés en mg d'équivalents acide gallique par gramme de matière sèche (EAG /g MS) et sont présentés dans la figure 21 allant de 10.21 ± 4.20 à 47.67 ± 4.69 mg EAG/g MS.

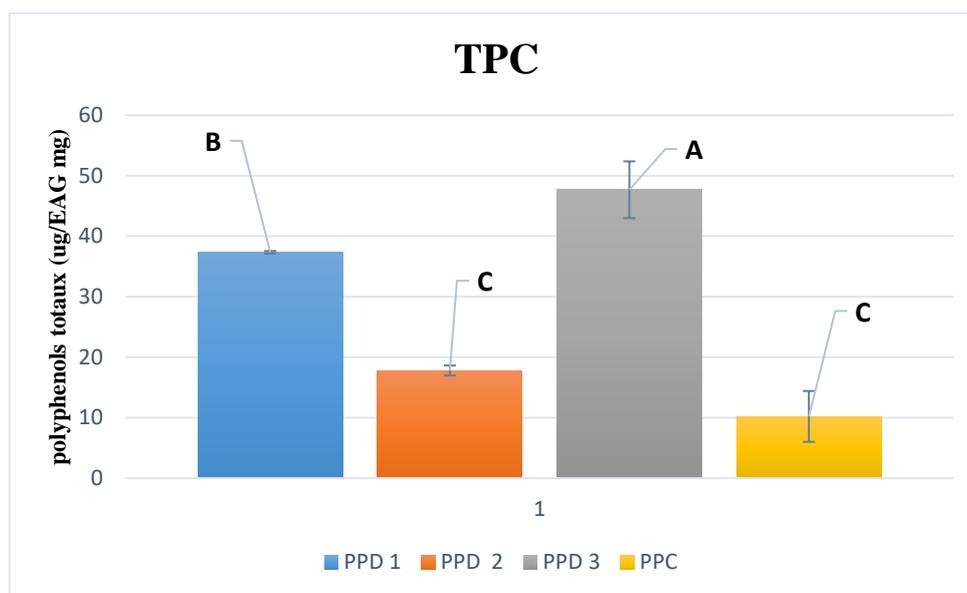


Figure 21 : Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de pollen de *Phoenix dactylifera L* et *Phoenix canariensis*.

Nous remarquons qu'il y'a une variation de la teneur en polyphénols avec une différence significative et hautement significative ($p < 0.05$ et $p < 0.0001$) entre les trois types de pollen de *Phoenix dactylifera*, mêmes s'ils appartiennent à la même espèce dont les valeurs sont ; 47.67 ± 4.69 mg EAG/g MS pour PPD 3 , puis 37.34 ± 0.21 mg EAG/g MS pour PPD 1 et enfin 17.80 ± 0.82 mg EAG/g MS pour PPD 2. Ce dernier extrait ayant une faible valeur proche de celle de *Phoenix canariensis* (PPC) la plus faible valeur avec 10.21 ± 4.20 mg EAG/g MS (pas de différence significative entre eux), et par conséquent, il semble que l'espèce *Phoenix dactylifera* est plus riche en polyphénols que l'espèce *Phoenix canariensis*.

Une étude menée par (Benouamane, 2022) sur un type de pollen de *Phoenix dactylifera* provenant de la région de Biskra, la même région que la notre, montre que l'extrait méthanolique présente un teneur en polyphénols de 7 ± 0.9 mg EAG/g MS inférieur à ceux trouvés dans notre étude.

De même pour l'extrait de l'éthanol à une valeur de 13 ± 2 mg EAG/g MS, qui est inférieur à nos extraits provenant de cette même espèce. L'extrait de l'acétone a un teneur (20 ± 4 mg EAG/g MS) faible par rapport à nos extraits PPD1 et PPD3

Ainsi, selon l'étude de (Sadeq, 2021) menée sur l'extrait de l'éthanol ;eau de pollen de palmier dattier , la teneur en polyphénols totaux est 7.82 ± 0.09 mg GAE/ g est de même inférieure par rapport à nos résultats pour les deux espèces étudiées. Les flavonoïdes sont un groupe majeur d'antioxydants phénoliques dérivés de plantes médicinales (Chen, 2020). Leur présence dans les extraits végétaux peut expliquer certaines activités biologiques.

Le dosage de flavonoïdes totaux (TFC) a été effectué par comparaison de la DO observée à celle obtenu avec un étalon de quercétine à des concentrations connues. Le coefficient de corrélation de la courbe standard obtenu est $R^2 = 0,995$. La courbe d'étalonnage de la quercétine est dans l'annexe 2

Les résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes totaux pour nos extraits sont exprimés en mg d'équivalents Quercétine par gramme de matière sèche (EAG /g Ms) et sont présentés dans la figure 22, variant de 4.00 ± 0.55 à 9.24 ± 1.82 mg QE/g.

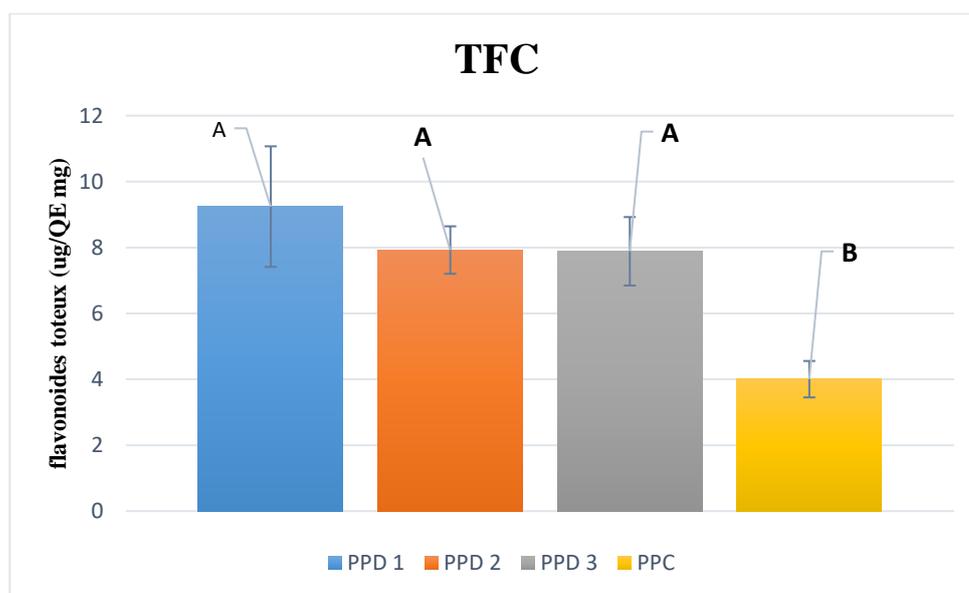


Figure 22 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de pollen de *Phoenix dactylifera L* et *Phoenix canariensis*

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 deux espèces *Phoenix dactylifera L* et *Phoenix canariensis*. L'extrait (PPC) de la première espèce semblent avoir une quantité de flavonoïdes totaux plus élevée que celle de L'espèce ornementale de palmier, ce dernier présente une valeur de 4.00 ± 0.55 mg QE /g.

En revanche, les extraits de l'espèce cultivée *Phoenix dactylifera* (PPD1, PPD2 et PPD3) montrent une variabilité non significative des teneurs de flavonoïdes totaux (**9.24 ± 1.82, 7.93 ± 0.72 et 7.88 ± 1.03 mg QE /g, respectivement**). Cette variation est peut-être due aux facteurs pédo-écologiques et caractéristiques intrinsèques des espèces et des individus au sein de la même espèce

Dans ce même contexte, l'étude menée par (Sadeq, 2021) sur l'extrait issu de l'**éthanol ;eau**, de pollen de palmier dattier, montre que la teneur en flavonoïdes totaux est beaucoup plus inférieure à nos résultats avec une valeur de **2.48 ± 0.05 mg QE/g**

L'étude de (Benouamane, 2022) montre que la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique du pollen de *Phoenix dactylifera* présente une valeur légèrement faible par rapport à nos extraits de la même espèce. Par contre, les extraits issus à partir des autres solvants (Ethanol et acétone) présentent des valeurs soit plus faible (**5.2± 0.9 mg QE/g**) ou plus élevé (**12. 7± 1.2 mg QE /g, respectivement**)

I.3. Activités biologiques des extraits

I.3.1. Activité de piégeage du radical libre DPPH

Le test DPPH est le test indirect le plus ancien pour déterminer l'activité antioxydante. Le DPPH a été proposé pour la première fois en 1950 en tant que produit naturel donneur de protons. Plus tard, ce test a été quantifié pour déterminer le potentiel antioxydant des composés phénoliques individuels et d'échantillons alimentaires et biologiquement significatifs (Roginsky, 2005) Le radical DPPH porte une couleur violet foncé et est l'un des rares radicaux azotés organiques stables. Le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (a.a-diphényl-B-picrylhydrazyl) a été l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams W, 1995)

Dans cette expérience l'activité antioxydant DPPH a été évaluée par la mesure de pourcentage d'inhibition dans les différents types de pollen étudiés à **50%** d'inhibition. Cette méthode est basée sur la capacité de l'extrait méthanolique à réduire le DPPH passant de couleur violet vers neutre incolore. Les résultats obtenus permettent de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition pour les quatre extraits étudiés, par rapport aux antioxydants standards (trolox et acide ascorbique) qui sont rapportés dans la **figure 23**.

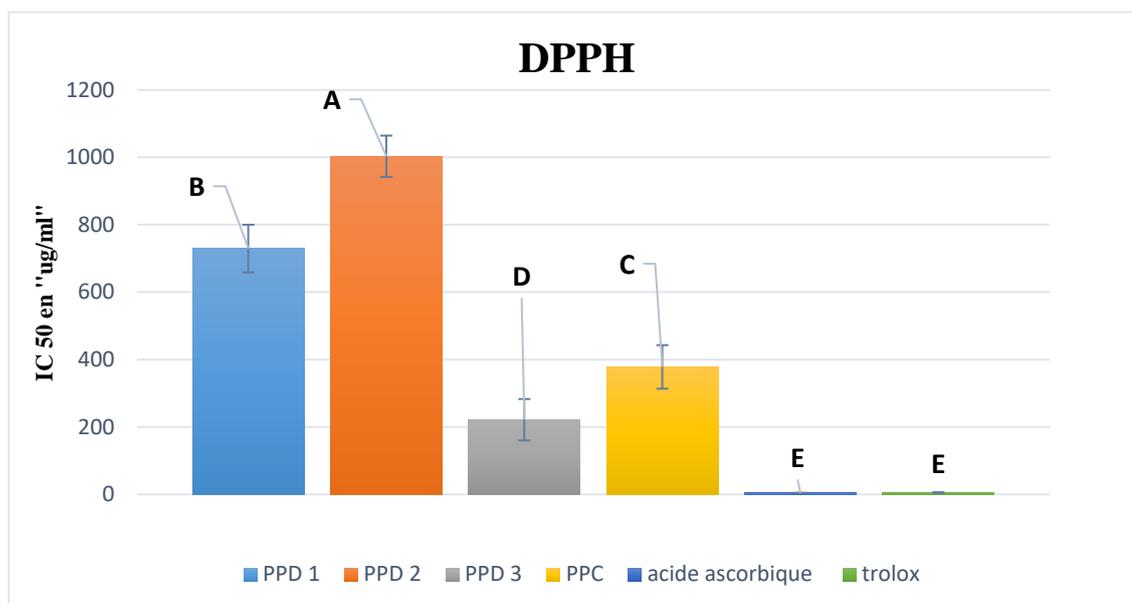


Figure 23 : Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de pollen par rapport aux standards (**trolox , acide ascorbique**)

D'après les valeurs d'IC₅₀ obtenues dans notre étude ; l'analyse de l'ANOVA montre que nos extraits sont statistiquement différents les uns des autres et par rapport aux standards trolox et acide ascorbique (**p<0.001 et p<0.05**). L'extrait PP2 possède une très faible activité de piégeage du radical libre DPPH car la concentration d'atteindre l'IC₅₀ est élevée (**800 µg/ml**) par rapport aux autres extraits de pollen et aux standards. (**IC₅₀= 4.39±0.01 µg/ml**) ; alors que PPD3 possède la meilleure activité par rapport à nos extraits **IC₅₀=221.45±61.42 µg/ml**. Entre ces deux extrêmes se situent les deux autres extraits PPD1 (**729.23 ± 70.84 µg/ml**) et PPC (*Phoenix canariensis*) (**378.017± 64.66 µg/ml**). En effet, on peut dire que les extraits avec une faible activité possèdent des composés phénoliques ayant une faible capacité à neutraliser les radicaux de DPPH, et *vis-versa*. Car les polyphénols ayant la caractéristique en leur structure d'avoir des groupements hydroxyles. Ces derniers permettent de neutraliser les radicaux libres par la donation des électrons ou des atomes hydrogène. A cet effet, ils sont considérés comme les antioxydants d'origine naturelle les plus importants

En comparant avec l'étude réalisée par (**Benouamane, 2022**), utilisant des différents solvants à différente polarité pour extraire les métabolites du pollen. L'extrait méthanolique décèle la valeur **IC₅₀=3600 ± 900 µg/ml**, nos résultats présentent des valeurs beaucoup moins faibles ce qui explique une activité antioxydante plus importante.

De même pour l'extrait éthanolique de cette même étude avec $IC_{50}=2200 \pm 300 \mu\text{g/ml}$, par contre son extrait acétonique a une valeur $IC_{50}= 500 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ est plus élevée par rapport à PPD 3 et PPC et plus faible par rapport à PPD 1 et PPD 2.

Dans ce même contexte, l'étude réalisée par (Sadeq, 2021)(avec l'éthanol ; eau) révèle une $IC_{50}=1820 \pm 27 \mu\text{g/ml}$ plus élevé à nos résultats expliquant une activité plus faible

I.3.2. L'activité de piégeage de radical-cation ABTS (scavenging activity)

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical libre stable largement utilisé pour évaluer la capacité antioxydante des fluides biologiques, des mélanges complexes ou des composés purs. Ce radical libre est capable de réagir avec les antioxydants classiques de type phénol et thiol, mais également avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron (Rice-Evans, 1995)

Dans cette expérimentation, l'activité antioxydant ABTS a été évaluée par la mesure de pourcentage d'inhibition des extraits des pollens étudiés à 50%. La réduction de l'ABTS par l'extrait de pollen passe de couleur bleu vert vers neutre incolore, les résultats obtenus permettent de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition de nos quatre extraits, par rapport aux antioxydants standards (trolox et acide ascorbique) dans la figure 24

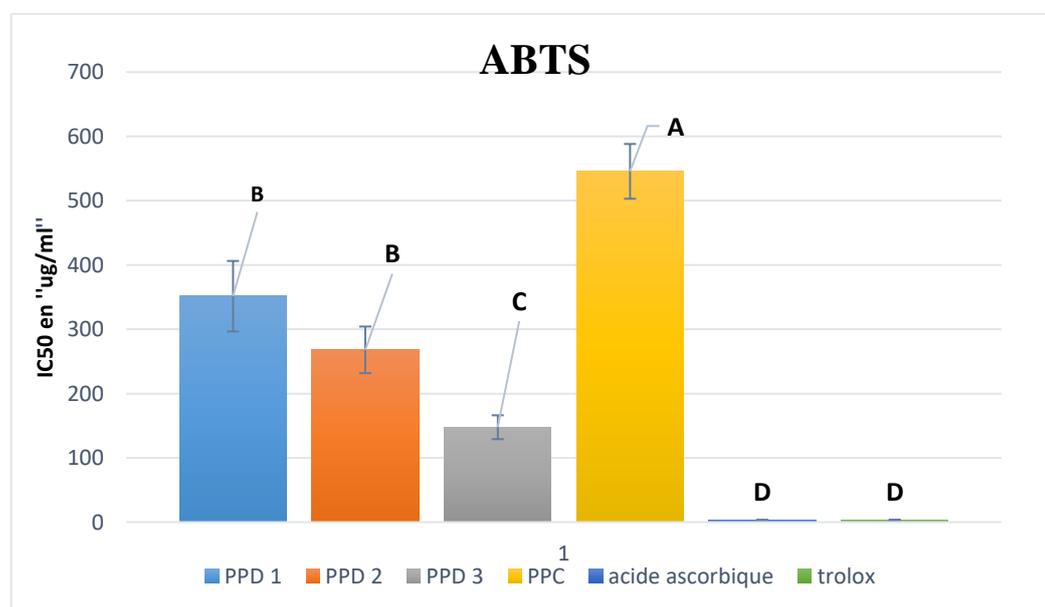


Figure 24 : Activité de piégeage du radical ABTS des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox, acide ascorbique)

D'après les valeurs d' IC_{50} obtenues dans notre étude ; une différence significative a été signalé entre les différents extraits des pollens utilisés ($p<0.05$), néanmoins les deux extraits PPD1 et PPD2 sont proche.

l'extrait **PPC** (*Phoenix canariensis*) possède l'activité la plus faible de piégeage de radical-cation ABTS à travers la valeur élevée de $IC_{50}=545.59 \pm 42.06 \mu\text{g/ml}$. ($IC_{50}=3.21 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$) ; alors que **PPD 3** possède la meilleure activité avec $IC_{50}=147.66 \pm 18.55 \mu\text{g/ml}$. Nos résultats ont révélé qu'il y a une variation entre les extraits étudiés quant à l'effet antioxydant par ABTS et que les extraits de pollen proviennent de *Phoenix dactylifera* ont une capacité de réduire le radical ABTS plus importante que celui de *Phoenix canariensis*.

I.3.3. Le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

Le test FRAP est une méthode colorimétrique de transfert d'électrons permettant de mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire le Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} en donnant une couleur bleu-vert, qui s'absorbe en maximum dans une longueur d'onde de 700 nm (Oyaizu, 1986). La formation de ce complexe montre le pouvoir réducteur qui détermine la capacité du composé à agir comme antioxydant.

Dans notre étude, l'activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique FRAP a été évaluée par la mesure $A_{0.5}$ dans les quatre extraits de pollen cibles. et les résultats obtenus permettent de tracer l'histogramme des absorbances en fonction des concentrations étudiées ($A_{0.5}$) par rapport aux antioxydants standards (trolox et acide ascorbique) la figure 25

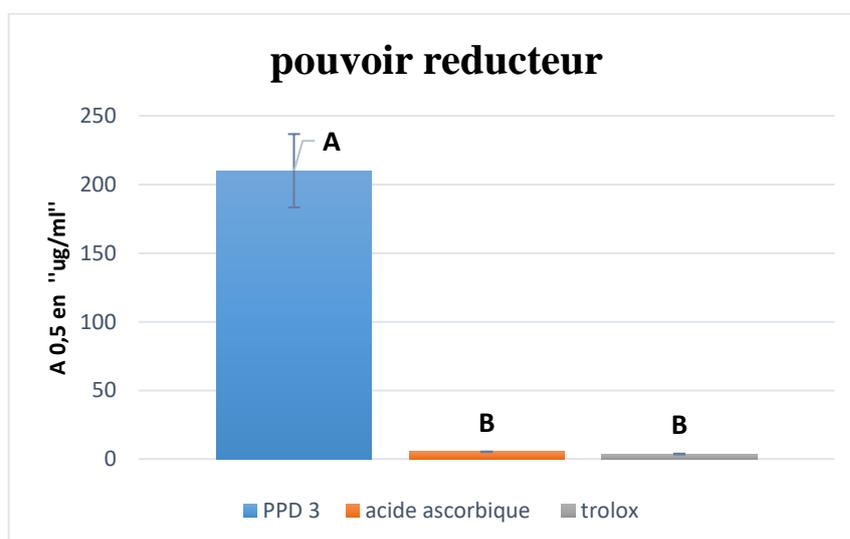


Figure 25 : Activité de pouvoir réducteur de l'ion ferrique FRAP des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox , acide ascorbique)

En se basant sur la mesure d' $A_{0.5}$ obtenue pour les extraits testés, seul l'extrait PPD3 possédant une activité de pouvoir réducteur avec une concentration de $220 \pm 26.70 \mu\text{g/ml}$ tandis que les deux autres extraits (**PPD1 , PPD2 et PPC**) ne révèle pas d'activité ($A_{0.5} > 500 \mu\text{g/ml}$).

En comparant avec le résultat trouvé par (Sadeq, 2021) de cette même activité, sur l'extrait éthanolique de pollen mâle de palmier dattier, cette étude montre que l'IC₅₀= **585± 2.6 µg/ml** elle est élevée et donc une activité plus faible par rapport à notre extrait PPD3. Concernant les autres extraits la valeur de A_{0.5} > 500 µg/ml

I.3.4. Activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺²-phénanthroline

L'activité de la phénanthroline a été déterminée par la méthode (Szydłowska-Czerniaka A, 2008) Il est basé sur la réduction du fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) en présence d'antioxydants. Seul le fer (Fe⁺²) se complexe avec l'orthophénanthroline après la réaction d'oxydo-réduction pour donner le complexe ferreux (Fe⁺² - phénanthroline) de couleur orange qui s'absorbe dans le spectre UV à **510 nm**.

L'activité de phénanthroline a été évaluée par la mesure A_{0.5} dans les extraits de pollen utilisés et les résultats obtenus permettent de tracer l'histogramme des absorbances en fonction des concentrations étudiées (A_{0.5}) de nos quatre extraits, par rapport aux antioxydants standards (trolox et acide ascorbique) dans la **figure 26**.

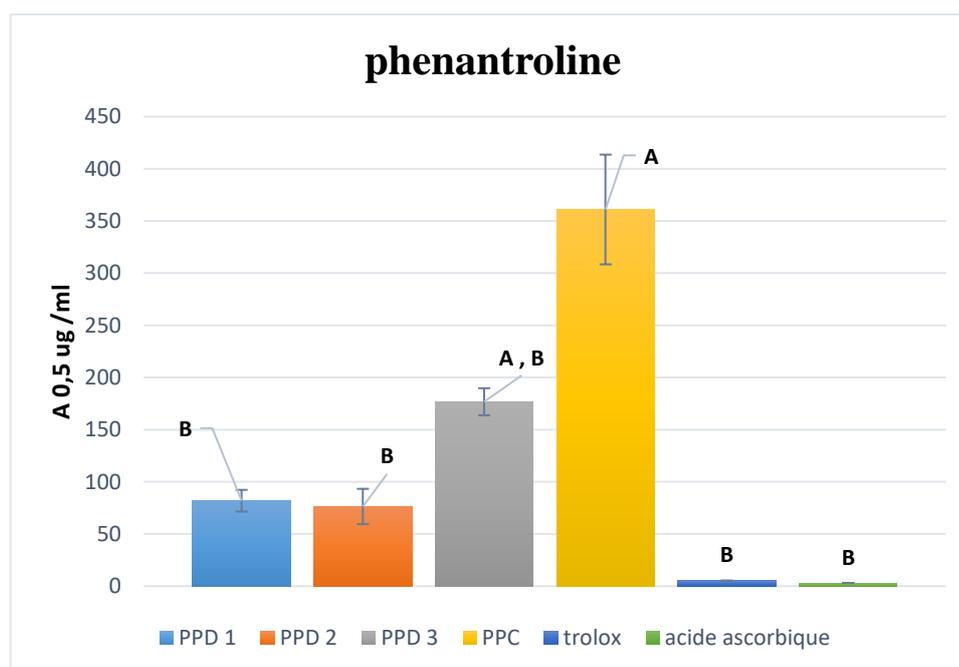


Figure 26 : Activité de phénanthroline des extraits de pollen par rapport aux standards (trolox ; acide ascorbique)

D'après la valeur d' A_{0.5} obtenues dans notre étude ; il n'y a pas de variabilité significative entre les extraits de pollen provenant de *Phoenix dactylifera*, contrairement à celui de *Phoenix canariensis* (A_{0.5}= **361.011±52.58 µg/ml**), ainsi, le test *Tukey* montre que PPD1(A_{0.5}= **81.91±10.38 µg/ml**), PPD2 (A_{0.5}=**76.35±16.94 µg/ml**) et PPD3 (A_{0.5}=

$176.76 \pm 12.95 \mu\text{g/ml}$) appartiennent au même groupe que les standard et par conséquent, ces extraits ont une bonne activité de réduction de fer.

I.3.5. Activité anti-brunissement

Le brunissement enzymatique est le résultat de la transformation de composés phénoliques en polymères colorés par des systèmes enzymatiques spécifiques. Afin de l'éviter, nous avons testé différents extraits méthanoliques des différents pollens pour évaluer leur capacité anti-oxydante à inhiber la réaction enzymatique en mesurant le pourcentage d'inhibition à 50%. Le résultat obtenu permet de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition de 3 extraits, par rapport aux antioxydants standards dans la **figure 27**

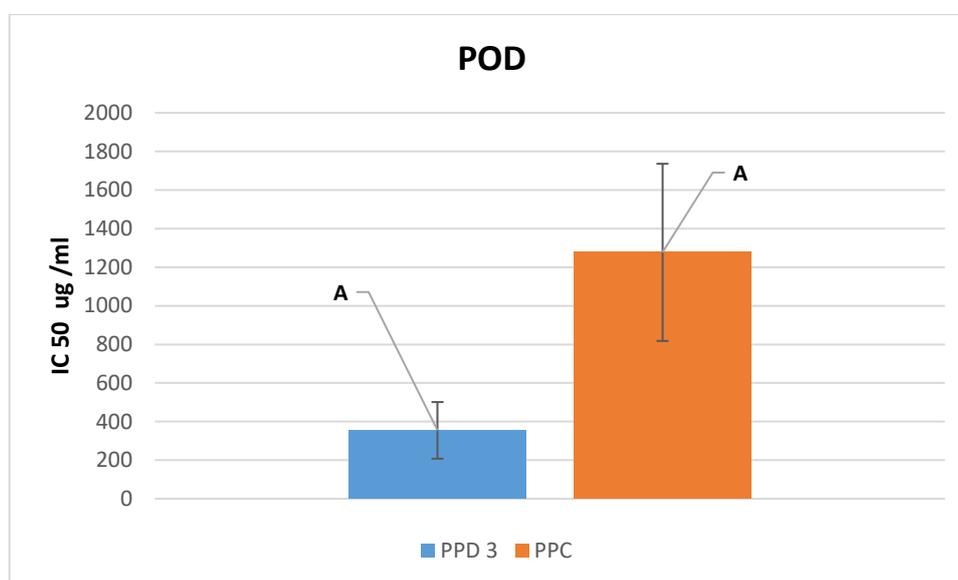


Figure 27 : Activité anti-brunissement des extraits de pollen étudiés

Nos résultats montrent que deux extraits sur quatre testés semblent avoir une activité anti-brunissement, il s'agit de PPD3 de l'espèce *Phoenix dactylifera* et PPC de l'espèce *Phoenix canariensis*, dont le premier a une valeur d'IC₅₀ = $354.45 \pm 146.79 \mu\text{g/ml}$ plus inférieur et donc a plus d'activité par rapport PPC avec IC₅₀ = $1276.99 \pm 459.27 \mu\text{g/ml}$

I.3.6. Activité inhibitrice de l'alpha amylase

Dans notre étude, l'activité alpha amylase a été évaluée par la mesure de pourcentage d'inhibition d'enzyme à 50% par les extraits du pollen étudiés. Cette activité est réalisée à l'aide de la méthode iode/iodure de potassium (IKI) basée sur l'inhibition de l'enzyme alpha amylase par l'extrait passant d'une couleur claire vers une couleur foncé. Cette enzyme est considérée comme un principale cible pour les médicaments dans le traitement du diabète de type 2 en prévenant l'hyperglycémie postprandial en inhibant la dégradation des glucides

complexe (amidon) en sucres simples qui s'absorbent par l'intestin. Le résultat obtenu permet de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition d'enzyme par les extraits.

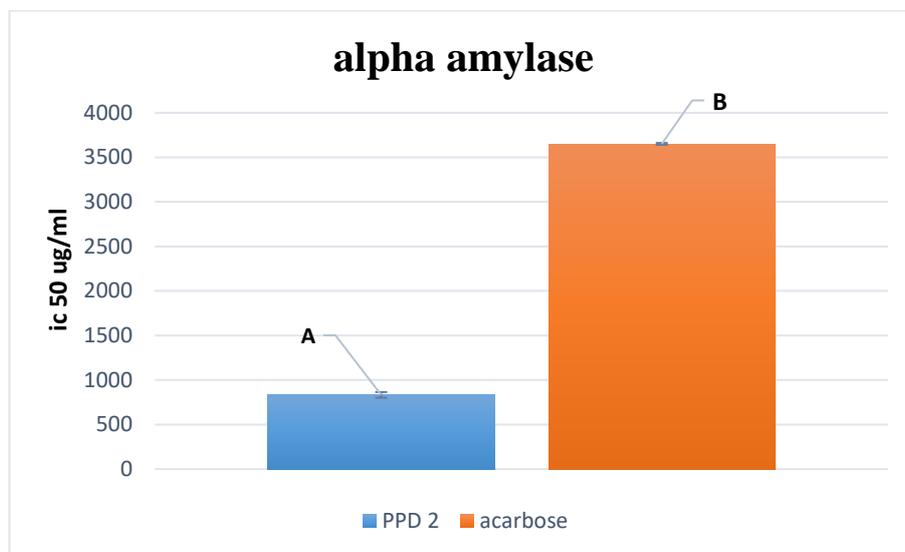


Figure 28 : Activité alpha amylase des extraits de pollen étudiés avec le standard (acarbose)

D'après la valeur d'IC₅₀ obtenues dans notre étude ; seul l'extrait du pollen DPP2 atteint IC₅₀ ≈ 833.32 ± 32.05 µg/ml et il paraît qu'il a une meilleure activité d'inhibition de l'enzyme alpha amylase que le standard acarbose. Par contre la valeur IC₅₀ des autres extraits est bien plus de 2000 µg/ml.

I.3.7. Activité lithiasique

Nous avons entrepris l'étude in-vitro sur l'inhibition de la cristallisation oxalo-calcique en présence d'extraits de pollen de *Phoenix* (Test de nucléation) et aussi par la dégradation des cristaux COM (Test de dégradation). Trois extraits ont été évalués ; PPD2, PPD3 et PPC. Cette activité anti lithiasique a été évaluée par la mesure de pourcentage d'inhibition de cristallisation des pollens à 50%. Les résultats obtenus permettent de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition de ces extraits, par rapport au standard (acide citrique) présentant dans la figure 29.

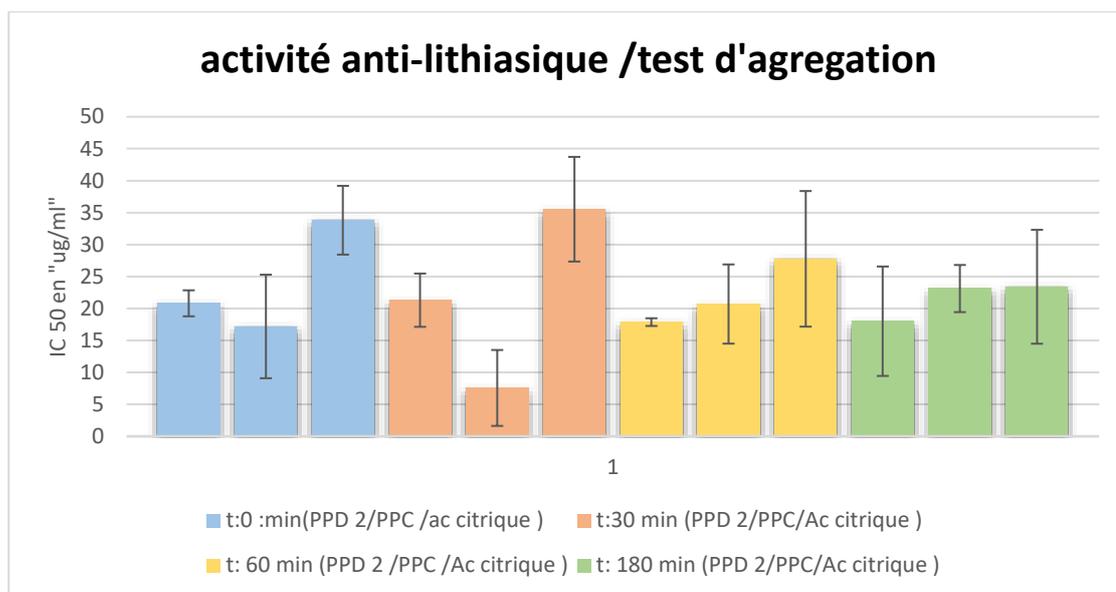
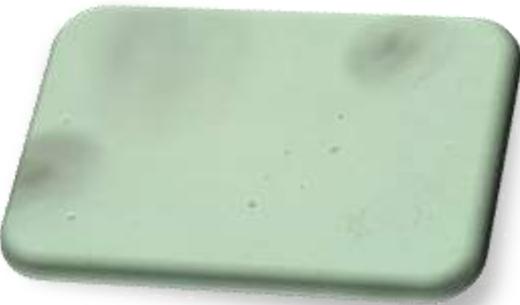
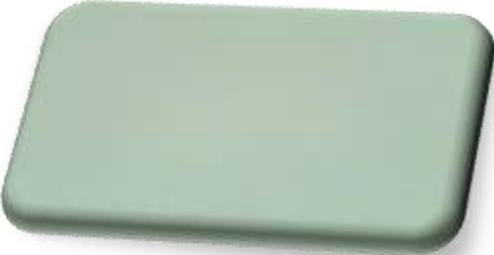


Figure 29: Activité anti-lithiasique (test d'agregation) des extraits des pollens étudiés par rapport au standard (**acide citrique**)

D'après les résultats obtenus, nos extraits ne présentent aucun effet sur l'inhibition de la formation des cristaux suite au test de nucléation. Par contre, le test de dégradation a révélé la présence d'une forte activité anti-lithiasique pour deux extraits PPD2 (IC₅₀ allant de 17.87 ± 8.09 jusqu'à 21.29 ± 4.17 $\mu\text{g/ml}$) et PPC (IC₅₀ allant de 7.56 ± 5.93 jusqu'à 23.12 ± 3.68 $\mu\text{g/ml}$). Ces deux extraits ont une activité au cours du temps meilleur que celle du standard (acide citrique) (IC₅₀ allant de 23.39 ± 8.90 jusqu'à 35.53 ± 8.18 $\mu\text{g/ml}$)

L'étude de l'activité anti-lithiasique a été suivie par une observation microscopique, les résultats obtenus de cette dernière sont fortement corrélés avec ceux de la mesure de la D.O ce qui renforce nos résultats

Tableau 6 : Observation microscopique des résultats de l'activité anti-lithiasique

 <p>PPD 2</p>	 <p>Blanc PPD2</p>
 <p>PPD 3</p>	 <p>Blanc PPD 3</p>
 <p>PPC</p>	 <p>Blanc PPC</p>
 <p>Acide citrique</p>	 <p>Blanc (control negatif)</p>

I.3.8. Activité anti-inflammatoire

Cette activité est Basée sur le pouvoir inhibiteur de la dénaturation thermique de la protéine BSA (bovine sérum albumen) par les extraits et le résultat obtenu permet de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition de 3 extraits ; PPD2, PPD3 et PPC , par rapport au standard (voltarène) dans la **figure 30**.

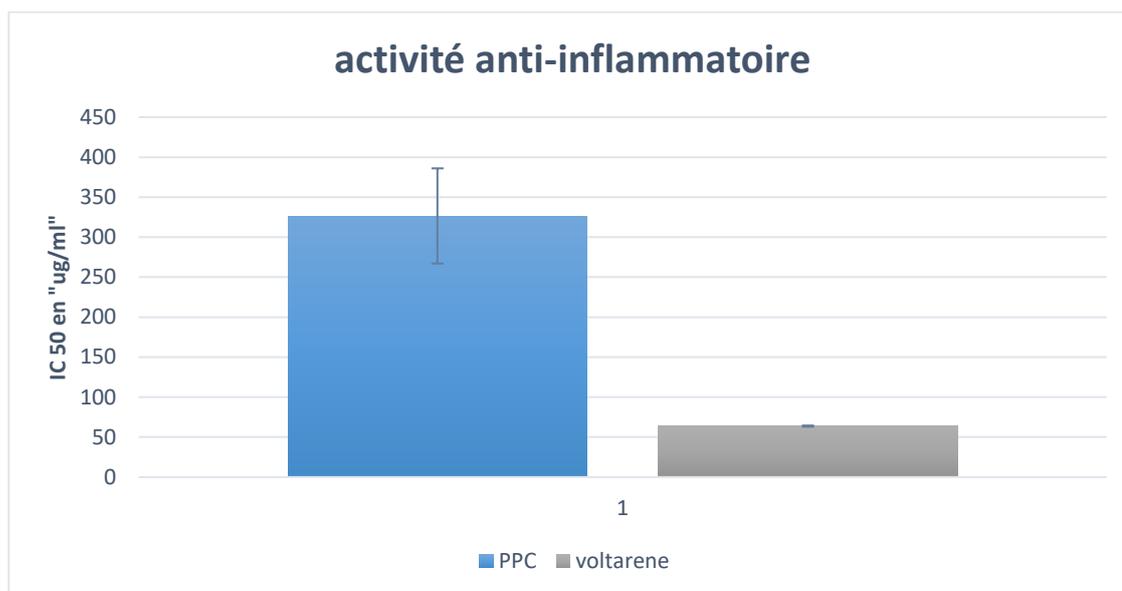


Figure 30 : Activité anti-inflammatoire de l'extrait PPC par rapport au standard (Voltarène)

Seul l'extrait PPC de pollen provient de l'espèce Phoenix canariensis a révélé une activité anti-inflammatoire avec concentration d'inhibition de $IC_{50}=326.50 \pm 59.48 \mu\text{g/ml}$ par rapport aux autres extraits.

I.4. Activité antifongique

Dans cette expérimentation l'activité antifongique a été évaluée par la mesure de pourcentage d'inhibition de développement du champignon à **50%**. Cette méthode est Basée sur le pouvoir inhibiteur des infections fongiques donc quel que soit le type de flavonoïde considéré par les extraits, le résultat obtenu permet de tracer l'histogramme de pourcentage d'inhibition de 3 extraits, et de témoin positif (DMSO) dans la **figure 31 et figure 32**

Trois concentrations ont été testées (0.09 mg /ml, 0.18 mg/ml et 0.36 mg /ml) pour l'évaluation des pourcentages d'inhibition des quatre extraits étudiés

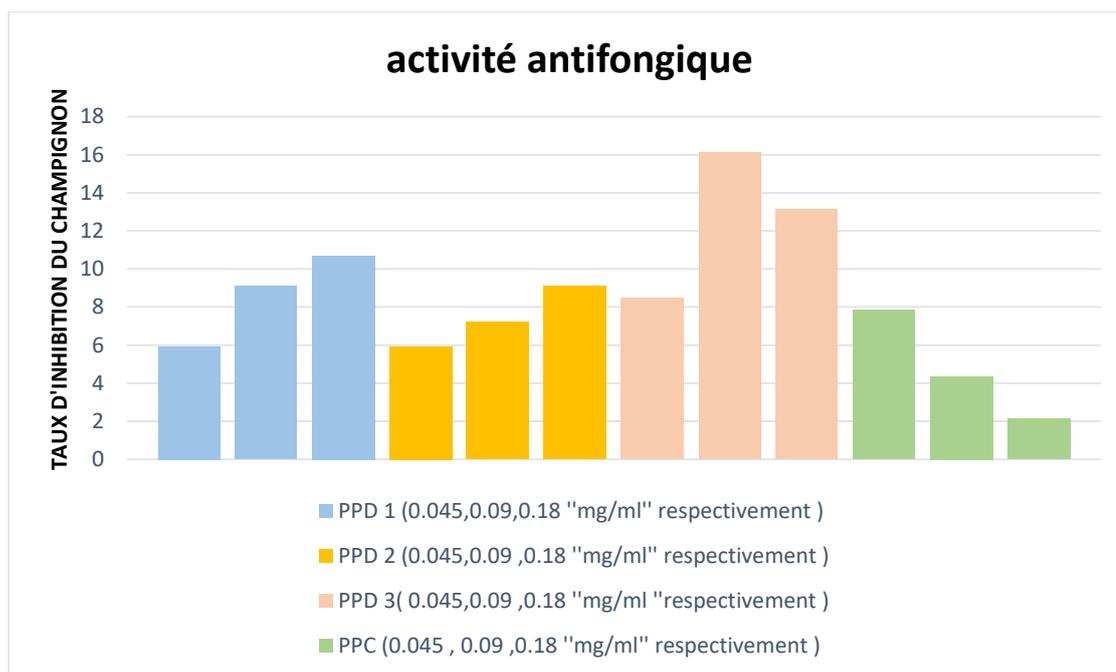


Figure 31 : Taux d'inhibition de l'activité antifongique des extraits du pollen étudiés

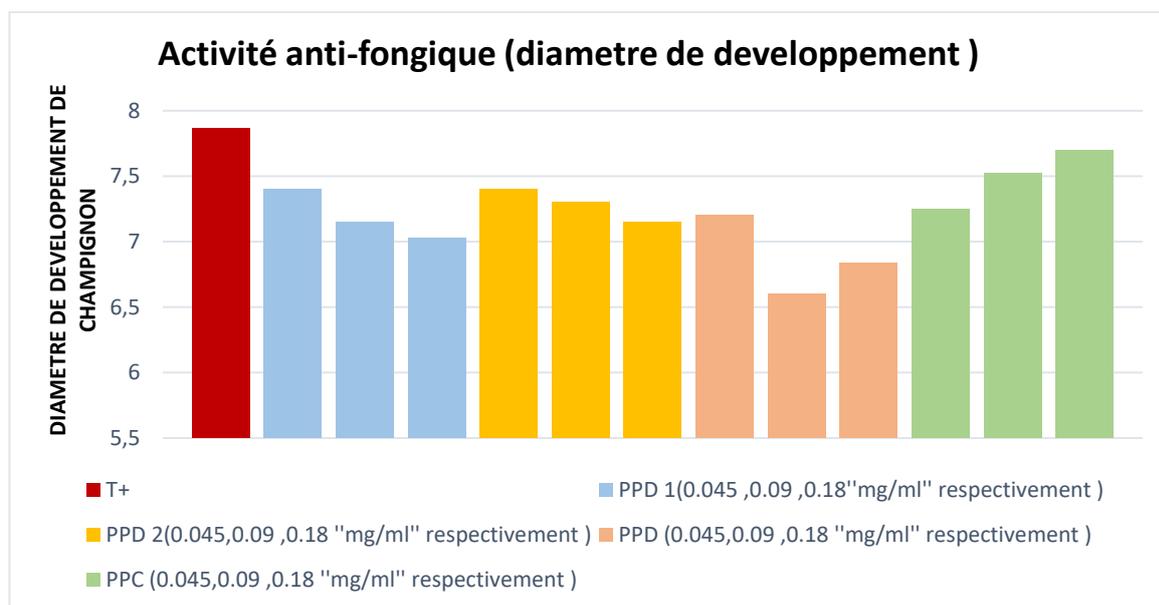


Figure 32 : Effet des extraits du pollen avec différentes concentrations sur le diamètre de développement du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*

Les résultats de l'activité antifongique montrent que nos extraits avec les différentes concentrations utilisées possèdent des très faibles taux d'inhibition (< 50%) dont le plus grand taux d'inhibition de développement du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici* est celui de l'extrait **PPD3 (16.10%)** à la concentration **90 µg /ml**.

Conclusion générale

Conclusion :

Le présent travail est consacré à l'étude phytochimique, biologique et anti-fongique de certains types de pollens du genre *Phoenix*, notamment *Phoenix dactylifera*, provenant à partir des pieds mâles ayant des profils génétiques différents, en étudiant leur diversité génétique sur le plan phytochimique et biologique.

D'après nos connaissances, très peu de travaux bibliographiques ont été réalisés sur le pollen du palmier dattier *Phoenix dactylifera* et par conséquent, peu d'informations sur le plan phytochimique et biologique existent pour ce matériel végétal.

Afin d'approfondir nos connaissances sur ce thème, nous avons procédé au dosage des composés phénoliques; les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux, à l'évaluation de l'effet antioxydant non enzymatique et anti-brunissement, à l'évaluation des activités; anti-diabétique, anti-lithiasique, anti-inflammatoire et anti-fongique. Cette étude a été effectuée sur des extraits méthanoliques.

Les résultats obtenus montrent qu'il y'a une variation 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*) quant à leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux. La première espèce semble avoir des teneurs plus élevés par rapport à la deuxième espèce.

De même, pour les activités biologiques et phytochimiques des types de pollen étudiés, les résultats obtenus montrent qu'ils présentent des variations remarquables entre eux.

Il est constaté que le type de pollen PPD3 présente la teneur en polyphénols la plus élevée, en outre, il s'est mentionné avoir des meilleurs valeurs IC50 pour la plupart des activités antioxydantes (DPPH-ABTS) et d'une valeur IC50 semblable aux autres types de pollen de *Phoenix dactylifera* pour l'activité de phénantroline meilleur que celle de *Phoenix canariensis*. Ainsi, il paraît avoir une valeur IC50 de l'activité anti-brunissement (POD) proche de celle de PPC. Par ailleurs, tous les types de pollen du palmier dattier semblent avoir des valeurs semblables de flavonoïdes totaux, plus importantes que celle de palmier *canariensis*

L'extrait du pollen PPC ayant les plus faibles teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux semble avoir une activité anti-inflammatoire *in vitro* la plus élevée en inhibant la dénaturation de la BSA

Il est très important de signaler qu'à l'issue des résultats de l'activité alpha-amylase et de l'anti-lithiasique que certains extraits ont révélé des valeurs IC50 meilleurs que celles des

standards utilisés. Il s'agit de l'extrait PPD2 pour la première activité, et de ce même extrait et PPC pour la deuxième activité

Concernant l'activité antifongique *in vitro*, nos résultats montrent que les extraits de pollen étudiés présentent des très faibles taux d'inhibition de développement du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici* avec des petites variations entre les types de pollen.

Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude, nous pouvons citer comme perspective :

-  Réalisation d'une étude phytochimique approfondie qui consiste à la purification, l'identification et la caractérisation des composés actifs.
-  Faire des études expérimentales « in vivo » sur des espèces animales.
-  Approfondir l'étude avec d'autres activités biologiques bêta-carotane, anti-cholinestérase, anticancéreuse et l'activité antimicrobienne.
-  Utilisation d'autres solvants d'extraction et comparaison des résultats

Références bibliographiques

REFERENCES

- Abdessemed. (2018). Etude palynologique de trois variétés de dokkar de palmier dattier .Mémoire de master .Université de M'sila .
- Abu Zarin, M. T. (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. . pp. 1-12.
- Afanasev. (2009). Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals. CPC Press. pp. 1-71.
- Alais. (2008). Production and characterization of α -amylase. Biochimie alimentaire. pp. 66-71.
- Almeida-Muradian. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of food composition and analysis. pp. 105-111.
- Al-Okbi. (2022). Date Palm as Source of Nutraceuticals for Health Promotion: a Review. Current Nutrition Reports. pp. 1-18.
- Arar. (2016). . Situation des pieds mâles (Dokkars) dans les périmètres de mise en valeur Région d'Oued Righ (Doctoral dissertation, UNIVERSITE KASDI MERBAH–OUARGLA-).
- Arruda. (2013). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. Journal of Food Composition and Analysis. pp. 100-105.
- Atwe. (2004). Pollen grains for oral vaccination. Journal of Controlled Release., pp. 45-52.
- Bahadoran, Z. M. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. Journal of diabetes and metabolic disorders. pp. 12-43. .
- Battu, C. (2016). L'accompagnement nutritionnel d'un patient présentant une lithiase urinaire. Actualités Pharmaceutiques. pp. 53-56.
- Benouamane. (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 solvent.
- Benouamane. (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 solvent.
- Bentrad. (2017). Studies on chemical composition and antimicrobial activities of bioactive molecules from date palm (Phoenix dactylifera L.) pollens and seeds. African journal of Traditional, , Complementary and alternative Medicines. pp. 242-256.

Références bibliographiques

- Bentrad, N. G.-T. (2017). Studies on chemical composition and antimicrobial activities of bioactive molecules from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollens and seeds. *African journal of Traditional, , Complementary and alternative Medicines*. pp. 242-256.
- Bhattacharyya. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*. pp. 329-354.
- Blanc. (2010). Propriétés et usage médical des produits de la ruche (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, université de Limoges).
- Booth, C. (1971). . The genus fusarium. UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Boucetta, S. (1995). Contribution à l'étude de quelques caractéristiques morphologiques et biochimiques du fruit de quelques cultivars de palmier dattier (*phoenix dactylifera* L.) dans la région d'Oued El-biod«Tifelfel » Thèse Ing.Agro,I.N.E.S.BATNA,.
- Boughediri. (1993). Note sur la viabilité du pollen de palmier dattier au cours de sa conservation à long terme. *Revue du réseau pour l'amélioration de la productivité agricole en milieu aride*. . pp. 267-278.
- Brand-Williams W, C. M. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*. . pp. 25-30.
- Bransfield. (1999). Etude de l'effet de la pollinisation de différents pollens et de l'acide gibbéréllique (AG3) sur la production et la qualité des dattes produites par le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), variété «Deglet Nour» .
- Bruneton. (1999). . Pharmacognosie et Phytochimie, Plantes médicinales, 3^o édition. Lavoisier.
- Bucheli. (1994). Contribution of enzymic browning to color in sugarcane juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. . pp. 257-261.
- Burton. (2011). . Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. pp. 287-299.
- Caulten. (2009). Pollen and spore, Application with specials amphasis on aerobiology and allergy.ed Science Publishers. pp. 1-23.
- Chaouch-Khouane. (2020). Molecular identification of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.)" Deglet noor" pollinator through analysis of genetic diversity of Algerian male and female ecotypes using SSRs markers.
- Cheftel. (1984). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments Vol. I. Technique et documentation. Lavoisier (4ème ed.). Paris. . pp. 333-363.

Références bibliographiques

- Chehma. (2001). Valorisation des Sous-Produits du Palmier Dattier en Vue de leur Utilisation en Alimentation du Bétail .
- Chen, S. L. (2020). Investigation of Chemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effects of Alfalfa Flavonoids on Growth Performance. *Oxidativ.*
- Cheyrier. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.
- Chouach-khouane. (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 .
- Claudine, M. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability, *American journal for Clinical Nutrition.* pp. 727-747.
- Collin. (2011). Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC. pp. 5-13-16-235.
- Croteau. (2000). . Natural products secondary metabolites. Eds, *Biochemistry and Molecular Biology Plant.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, 11D, Crystallinum, Australian National Herbarium,. pp. 10-1318.
- Dalton. (2002). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Signalling.*
- Daudon, M. T. (2012). . Lithiase urinaire. 2èd. Paris, Lavoisier. p. 641.
- Dharsana, J. N. (2014). Preliminary scening of Anti inflammatory and Antioxidant activity of *Morinda umbellata*. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences.*
- ding. (2003). role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiology letters* . pp. 1-7.
- Djerbi. (1994). Précis de phoeniciculture. Ed. FAO, Rome. pp. 23-191.
- Donadiou. (1982). 'Pollen: thérapeutique naturelles "; 5 ème Ed Maloine SA.
- Dransfield, J. U. (2008). *Genera palmarum-the evolution and classification of the palms.*
- Elhoumaizi, M. S. (2002). . Phenotypic diversity of datepalm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Morocco. *Genet. Resour. Crop Evol.* pp. 483-490. Récupéré sur <https://doi.org/10.1023/A:1020968513494>
- Elsafy, M. &. (2015). Phenotypic Diversity of Date Palm Cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Sudan Estimated by Vegetative and Fruit Characteristics. *International Journal of Biodiversity.* .
- Faegri. (1964). *Textbook of pollen analysis: New York, Hafner Pub.* .
- Gharbi. (2011). Les produits de la ruche: origines-fonctions naturelles-compositionpropriétés thérapeutiques: apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire (Doctoral dissertation),. .

Références bibliographiques

- Girard. (1962). Le palmier dattier. MARA, Direction Départementale de l'agriculture des oasis. CFPA. sidi -Mahdi Touggourt (oasis). . p. 136.
- Gros-Balthazard. (2012). Sur les origines, l'histoire évolutive et biogéographique du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.): l'apport de la génétique et de la morphométrie (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- Gros-Balthazard. (2013). . Origines et domestication du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). État de l'art et perspectives d'étude. Revue d'ethnoécologie,.
- Guillaume. (2008). Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Biochimie et moléculaire ; Thème, Etude phytochimique et activités biologiques d'une plante médicinale : *Euphorbia characias* L.
- Guillouty. (2016). . Plantes médicinales et antioxydants. FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES: UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER.
- Hadrami, I. E. (1998). Biotechnologies végétales et amélioration du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), pivot de l'agriculture oasienne marocaine.
- Hafez. (2014). Effect of pollen grain sources on yield and fruit quality of Samany date palm. International Journal of Agricultural Research. . pp. 164-168.
- Hanhineva, K. T.-P. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. Int J Mol Sci. pp. 1365-1402.
- Hannachi. (1998). Inventaire variétal de la palmeraie algérienne.
- Hartmann. (2007). . From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry. pp. 2831-2843.
- Hazem. (2011). Chemical composition and nutritional value of palm pollen grains. Global J Biotechnol Biochem. pp. 1-7.
- Jeantet. (2006). Sciences des aliments, Tec et Doc, Lavoisier, Paris. .
- Kao. (2006). Tea obesity, and diabetes. Mol. Nutr. Food Res. pp. 188-210.
- Kumar. (2011). α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. Pharmacognosy Reviews. . pp. 19-29.
- Lakhoua. (1966). Report of activities. Laboratory of Fruit-tree Cultivation of the Tunisian National Institute of Agronomic Research. Report of activities. Laboratory of Fruit-tree Cultivation of the Tunisian National Institute of Agronomic Research.
- Liguori. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. Clinical Interventions in Aging. . pp. 757-772.

Références bibliographiques

- Maroon, J. C. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical neurology international*.
- Meraneh. (2010). Détermination du sexe chez le palmier dattier: Approches histocytologiques et moléculaires (Doctoral dissertation, Thèse doctorat. diversité et adaptation des plantes. Université Montpellier 2. pp. 14-66.
- Mercier. (1985). Les enzymes amylolytiques. *Hydrolases et dépolymérasés*. pp. 110-140.
- Merghem. (2009). . *Eléments de biochimie végétale*. Edition Bahaeddine.
- Meyer. (2004). *Botanique : Biologie et Physiologie Végétale*. Paris: Maloine.
- Miller. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chem.* . . pp. 331-337.
- Mohammedi. (2013). . *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie*. Thèse de Doctorat en Biologie. Université aboubekr Belkaid. Algérie. . pp. 169-170.
- Molyneux. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. pp. 211-219.
- Moore, S. &. (1963). . *Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment*.
- Müller L., G. S. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*. . pp. 992-999.
- Munier, P. (1973). *Le palmier dattier-techniques agricoles et productions tropicales*.
- Nixon. (1928). Immediate influence of pollen in determining the size and time of ripening of the fruit of the date palm. *Journ. Of heredit*. pp. 240-255.
- Nixon. (1934). *Metaxenia in dates*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*. pp. 221-226.
- Ortiz. (2013). . *Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach*.clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*. pp. 1-14.
- Osman. (1974). Gonadal and epididymal sperm reserves in the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Reproduction and Fertility*. pp. 425-430.
- Oyaizu. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. . pp. 307-315.
- Öztürk, M. A.-Ö. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food chemistry*., pp. 623-630.

Références bibliographiques

- Peyron, G. (2000). Cultiver le palmier-dattier. Cultiver le palmier-dattier. pp. 1-112.
- Phaniendr. (2014). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry. pp. 11-26.
- Pizzino. (2017). . Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative medicine and cellular longevity.
- Preiser. (2012). Oxidative Stress. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.
- Re. (1999). . Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. Free Radical Bio. Med. . pp. 1231-1237.
- Reynaud. (2007). La botanique d'A à Z : 1662 définitions. Dunod, Paris.
- Rezazadeh. (2013). Influence of pollen source on fruit production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Barhi in humid coastal regions of southern Iran. Scientia Horticulturae. pp. 182-188.
- Rice-Evans, C. A. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free radical research. pp. 375-383. Récupéré sur. Récupéré sur <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. Dans: Lontie, R. (Ed), Copper proteins and copper enzymes. CRC Press, Boca Raton, FL. . pp. 207-240.
- Roginsky, V. a. (2005). Review of Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity in Food. Food Chemistry, pp. 235-254. Récupéré sur. Récupéré sur <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.004>
- Rousselet, M. C. (2005). . Inflammation et pathologie inflammatoire. Chapitre 3. pp. 1-58.
- Sadeq. (2021). Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of pollen extracts from micromeria fruticosa, achillea fragrantissima, and phoenix.
- Saha. (2012). Inhibitory potential of traditional herbs on a-amylase activity. Pharm Biol.
- Sales. (2012). α amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. Pharmaceut Sci. . pp. 142-183.
- Salomon-Torres. (2017). Effect of pollenizers on production and fruit characteristics of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar Medjool in Mexico. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. pp. 338-347.
- Salomón-Torres, R. K.-V.-A.-A.-U.-S.-T. (2021). Date Palm Pollen: Features, Production, Extraction and Pollination Methods.
- Sanchez-Ferrer. (1995). Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. Biochim. Biophys. pp. 1-11

Références bibliographiques

- Sannier. (2006). Diversité et évolution de la microsporogénèse chez les palmiers (Arecaceae) en relation avec la détermination du type apertural (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
- Sbahi, K. (2017). Etude épidémiologique, paramétrique et phytothérapeutique de la lithiase ..Thèse pour obtention du doctorat en Sciences.Mostaganem, Université Abdelhamid Ibn badis,.
- Sedra, M. H. (2003). Le palmier dattier base de la mise en valeur des oasis au Maroc: techniques phoenicicoles et création d'oasis. INRA Editions.
- Szydłowska-Czerniaka A, D. C. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; . pp. 899-905.
- Tamma, N. E. (2020). . A COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF THE PHENOLIC EXTRACTS FROM PALM POLLEN GROWING IN OUED SOUF (ALGERIA). researchGate.
- Terefe. (2014). Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, part 1: high-pressure processing. *Critical reviews in food science and nutrition* . pp. 24-63.
- Thomas. (2017). Evaluation of efficacy of 1% curcuminoids as local application in management of oral lichen planus–interventional study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*.
- Tissera. (1982).). A Scanning Electron Microscope Study of Pollen of Phoenix (Arecaceae) 1. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. pp. 883-887.
- TourerN. (1967). Le palmier dattier culture et production. Al awamia.
- Uhl, N. W. (1971). The palm gynoecium. *American Journal of Botany*. . pp. 945-992.
- Vansant. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ».
- Whitaker. (1995). Polyphenol oxidase. Dans: Wong, D.W.S. (Ed), *Food Enzymes Structure and Mechanism*, Chapman and Hall, New York. pp. 271-307.
- Williams, H. H. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*.
- Wodehouse. (1935). Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. *Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine*.
- Yezza. (2014). index des métabolites secondaires végétaux, université kasdi merbah, Ouargla faculté des sciences de la nature et de la vie département des sciences biologiques. .

Références bibliographiques

Zaid. (2002). Date palm cultivation . Ed. FAO, Rome, Italie. p. 292.

Ziltener. (2010). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes:anupdate. Ann.Phys.Rehab.Med. . pp. 278-288.

Résumé

Résumé

L'objectif principal de cette étude est d'étudier sur le plan phytochimique, biologique et anti-fongique quelques types de pollens du genre *Phoenix*, notamment *Phoenix dactylifera*, en prenant en considération leur variabilité génétique prouvée préalablement par des marqueurs moléculaires.

Nous avons procédé à une macération par le solvant méthanol, puis les extraits obtenus ont subi au dosage des composés phénoliques; les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux, à l'évaluation de l'effet antioxydant non enzymatique et anti-brunissement, à l'évaluation des activités; anti-diabétique, anti-lithiasique, anti-inflammatoire et anti-fongique.

Les résultats obtenus pour la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux montrent qu'il y a une variation significative entre les types de pollen utilisés allant de 10.21 ± 4.20 mg EAG / g MS jusqu'à 47.67 ± 4.69 mg EAG / g MS. De même, des variations entre ces extraits de pollen ont été observées pour les différents tests de l'évaluation biologique et anti-fongique. L'extrait PPD3 présente la meilleure activité anti-oxydante trouvée par la plupart des tests utilisés.

Concernant l'activité fongique, aucun des extraits de pollen utilisés n'a exercé d'effet inhibiteur considérable sur le développement du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*. En revanche, l'extrait du pollen PPC (*Phoenix canariensis*) ayant les plus faibles teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux semble avoir une activité anti-inflammatoire *in vitro* la plus élevée. Ainsi, certains extraits ont montré des meilleures activités pour l'alpha-amylase (PPD2) et l'anti-lithiasique (PPD2 et PPC), non seulement par rapport aux autres extraits, mais aussi par rapport aux standards utilisés.

Mot clés : pollens , palmier dattier , *Phoenix* , *in vitro* , activités biologique activités antifongique

abstract

Abstract :

The main aim of this study is to investigate the phytochemical, biological and anti-fungal properties of several types of *Phoenix* pollen, in particular *Phoenix dactylifera*, taking into account their genetic variability previously proven by molecular markers.

The extracts obtained were then assayed for phenolic compounds, total polyphenols and total flavonoids, evaluated for their non-enzymatic antioxidant and anti-browning effects, and assessed for their anti-diabetic, anti-lithiasic, anti-inflammatory and anti-fungal activities.

The results obtained for total polyphenol and flavonoid content show significant variation between the pollen types used, ranging from 10.21 ± 4.20 mg EAG / g DM to 47.67 ± 4.69 mg EAG / g DM. Similarly, variations between these pollen extracts were observed for the various biological and anti-fungal evaluation tests. The PPD3 extract presented the best antioxidant activity found by most of the tests used. For fungal activity, none of the pollen extracts used exerted any significant inhibitory effect on the development of the fungus *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*. In contrast, the PPC (*Phoenix canariensis*) pollen extract with the lowest total polyphenol and flavonoid content appeared to have the highest in vitro anti-inflammatory activity. Some extracts showed better alpha-amylase (PPD2) and anti-lithiasis (PPD2 and PPC) activities, not only compared with other extracts, but also with the standards used.

Key words: *pollens, date palm, Phoenix, in vitro, biological activities antifungal activities*

ملخص

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو دراسة بعض أنواع حبوب اللقاح من جنس *Phoenix* على المستوى الكيميائي النباتي، البيولوجي والمضاد للفطريات، بالأخص *Phoenix dactylifera*، مع الأخذ في الاعتبار تنوعها الجيني الذي أثبتته العلامات الجزيئية سابقاً.

أجرينا الإستخلاص بواسطة مذيب الميثانول، ثم خضعت المستخلصات التي تم الحصول عليها لفحص المركبات الفينولية؛ إجمالي البوليفينول والفلافونويد الكلي، تقييم مضادات الأكسدة غير الأنزيمية وتأثير مضاد للسمره، تقييم الأنشطة؛ مضاد للسكري، مضاد للحساسية، مضاد للالتهابات ومضاد للفطريات.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها لمحتوى البوليفينول والفلافونويد الكلي أن هناك تبايناً كبيراً بين أنواع حبوب اللقاح المستخدمة تتراوح من 4.20 ± 10.21 مجم / EAG جم DM حتى 4.69 ± 47.67 مجم / EAG جم DM. وبالمثل، لوحظت اختلافات بين مستخلصات حبوب اللقاح هذه في الاختبارات المختلفة للتقييم البيولوجي والمضاد للفطريات. يُظهر مستخلص PPD3 أفضل نشاط مضاد للأكسدة وجد في معظم الاختبارات المستخدمة. فيما يتعلق بالنشاط الفطري، لم يكن لأي من مستخلصات حبوب اللقاح المستخدمة تأثير مثبط كبير على تطور الفطر *Fusarium oxysporum*

f.sp.Lycopersici من ناحية أخرى، يبدو أن مستخلص حبوب اللقاح (*Phoenix canariensis*) PPC الذي يحتوي على أقل مستويات من إجمالي البوليفينول والفلافونويد لديه أعلى نشاط مضاد للالتهابات في المختبر. وهكذا، أظهرت بعض المقطعات فعالية أفضل لألفا أميليز (PPD2) ومضادات التحسس (PPD2) و (PPC)، ليس فقط مقارنة بالمستخلصات الأخرى، ولكن أيضاً مقارنة بالمعايير المستخدمة

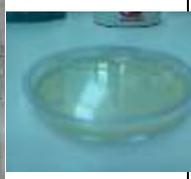
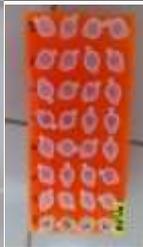
الكلمات المفتاحية: نخيل التمر، حبوب الطلع، فينيكس، في المختبر، الأنشطة البيولوجية، ومضادات الفطريات

Annexe

Annexe 01 : Matériels du laboratoire et instruments :

Instruments	Matériels
1. Tubes eppendorf	A. Évaporateur rotatif (FISHER SCIENTIFIC)
2. Erlenmeyers	B. Une étuve ventilée (MEMMERT)
3. Eprouvettes	C. Agitateur magnétique (FISHER SCIENTIFIC)
4. Flacons	D. Ultrason (GRANT)
5. Spatules	E. Balance de précision (EXPLORER)
6. Micropipettes de volumes différents	F. pH mètre (METTLER TOLEDO)
7. Microplaques 96 puits	G. Spectrophotomètre (HELIOS EPSILON)
8. Papier filtre Wattman	H. Lecteur de microplaque (Perkin Elmer)
9. Boîtes de pétri	I. Bain marie (MEMMERT)
10. Bêchers	J. <u>STERILISATEUR (MEMMERT)</u>
11. Portoirs	K. Bec benzène
12. Verres à montre	L. Vortex
13. Embouts	M. Autoclave
14. Tube à essais	

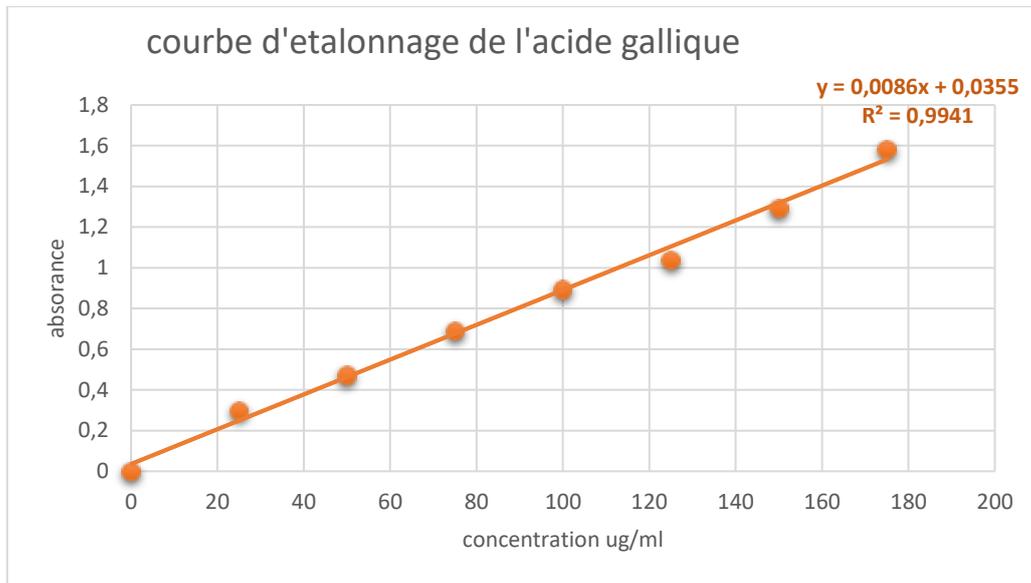
Annexe

					
1	2	3	4	5	6
					
7	9	10	11	12	13
					
A	b	c	d	e	f
					
h	k	l	m		

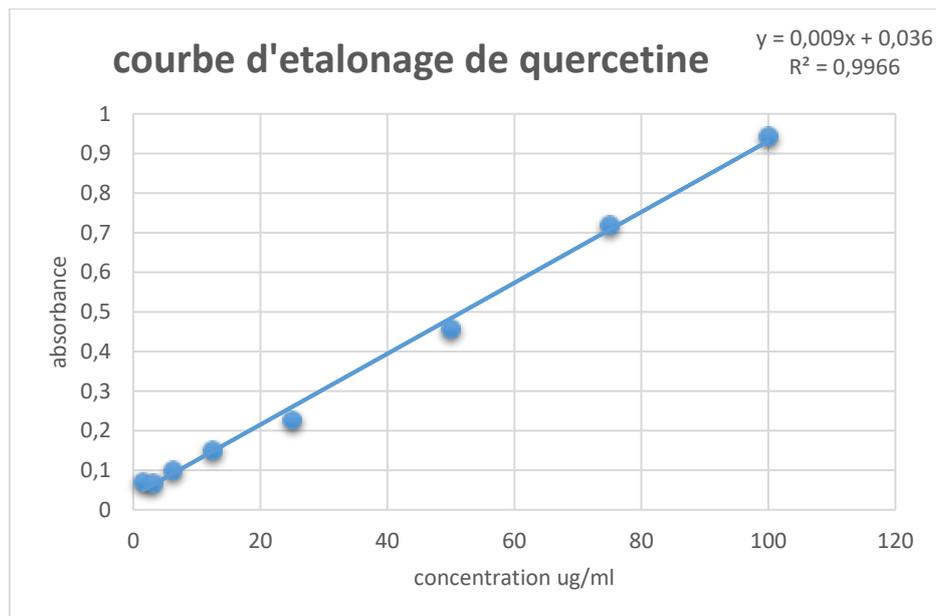
Annexe

Annexe 02 : courbe d'étalonnage pour le dosage :

Courbe d'étalonnage de total phénol :



Courbe d'étalonnage de total flavonoïde :



Annexe

Annexe 03 : les standards de chaque activité :

Reducing power :

	0.0976 µg	0.195µ g	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	A0,5
Trolox	0.07±0. 00	0.08±0. 00	0.09±0. 01	0.13±0. 00	0.19±0. 02	0.28±0. 05	0.60±0. 04	5.25±0. 20
Ascorbic acid	0.07±0. 00	0.09±0. 01	0.12±0. 01	0.17±0. 01	0.25±0. 02	0.47±0. 03	0.79±0. 09	3.62±0. 29

Phenantrolin assay :

	0.0976 µg	0.195µ g	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	A0,5
Trolox	0.25±0. 01	0.24±0. 01	0.26±0. 01	0.26±0. 00	0.32±0. 01	0.38±0. 01	0.56±0. 02	5.21±0. 27
Ascorbic acid	0.26±0. 01	0.29±0. 00	0.29±0. 02	0.31±0. 01	0.37±0. 01	0.50±0. 00	0.80±0. 00	3.08±0. 02

DPPH assay :

	0.7812 5	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC50
Trolox	6.42±0. 91	13.33±2 .14	30.19±0 .67	61.48±2 .98	87.16±0 .28	88.46±0 .11	87.72±0 .47	5.12±0. 21
Ascorbic acid	0.31±1. 02	12.90±0 .28	29.69±0 .39	76.67±0 .37	84.94±0 .84	87.78±0 .49	86.36±0 .21	4.39±0. 01

ABTS assay :

	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC50
Trolox	14.74±0 .37	26.15±0 .65	51.70±1 .51	89.72±0 .67	92.89±0 .19	92.89±0 .19	91.84±1 .19	3.21±0 .06
Ascorbic acid	13.43±0 .82	28.76±0 .67	52.94±0 .94	93.21±0 .11	93.08±0 .19	92.40±0 .88	92.96±0 .11	3.04±0 .05

Alpha amylase :

	62.5	125	250	500	1000	2000	4000	IC50
Acarbose	7.76± 0.17	8.08±0. 30	9.46±0. 11	10.70±0. 96	31.81±3. 54	53.05±0. 19	91.84±1. 59	3650.93± 10.70

Voltarène :

	31.25	62.5	125	250	IC50			
Voltarène	34.11 ±0.5	51.37±0 .91	76.87±1 .24	99.23±0. 41				63.78±0.73

Annexe

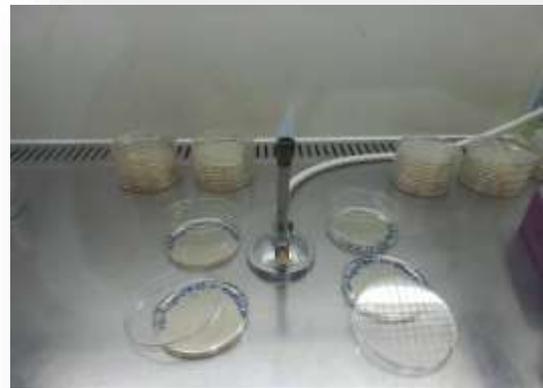
Annexe 04 de l'activité fongique :

Les étapes de l'activité anti fongique :

1. Notre milieu de culture contient de PDA et les 3 dilutions avec des différentes concentrations
2. Repartir sur les boite de pétri avec des répétitions (chaque concentration avec 3 répétitions)
3. Laisser les boites de Pétri à température ambiante jusqu'au refroidissement du milieu PDA puis déposer un petit disque du champignon référence au milieu de chaque boite.
4. Puis incuber les boites dans une étuve à 25 °C pendant 5 à 6 jours
(Pour la croissance de champignon et observer s'il y a une inhibition)



1



2



3



4

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : Hamal Choubeila

Bouhanika Malak Rym

Contribution à l'étude phytochimique de quelque type de pollen

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biochimie.

Resumé :

L'objectif principal de cette étude est d'étudier sur le plan phytochimique, biologique et anti-fongique quelques types de pollens du genre *Phoenix*, notamment *Phoenix dactylifera*, en prenant en considération leur variabilité génétique prouvé préalablement par des marqueurs moléculaires.

Nous avons procédé à une macération par le solvant méthanol, puis les extraits obtenus ont subi au dosage des composés phénoliques; les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux, à l'évaluation de l'effet antioxydant non enzymatique et anti-brunissement, à l'évaluation des activités; anti-diabétique, anti-lithiasique, anti-inflammatoire et anti-fongique.

Les résultats obtenus pour la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux montrent qu'ils y'a une variation significative entre les types de pollen utilisés allant de 10.21 ± 4.20 mg EAG / g MS jusqu'à 47.67 ± 4.69 mg EAG / g MS. De même, des variations entre ces extraits de pollen ont été observées pour les différents tests de l'évaluation biologique et anti-fongique. L'extrait PPD3 présente la meilleure activité anti-oxydante trouvée par la plupart des tests utilisés. Concernant l'activité fongique, aucun des extraits de pollen utilisés n'a exercé d'effet inhibiteur considérable sur le développement du champignon *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*. En revanche, l'extrait du pollen PPC (*Phoenix canariensis*) ayant les plus faibles teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux semble avoir une activité anti-inflammatoire *in vitro* la plus élevée. Ainsi, certains extraits ont montré des meilleurs activités pour l'alpha-amylase (PPD2) et l'anti-lithiasique (PPD2 et PPC), non seulement par rapport aux autres extraits, mais aussi par rapport aux standards utilisés

Mots-clefs : pollens , palmier dattier , Phoenix , in vitro , activités biologique activités antifongique

Laboratoires de recherche : Laboratoire de biochimie CRBt

Encadreur : M^{me} CHAOUCH KHOUANE Asma (MRB – CRBt).

Examineur 1 : M^r. KITOUNI Rachid (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : M^{me} GALI Lynda (MRA – CRBt).

Annexe