

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED KHIDER- BISKRA



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Agronomiques

N°d'ordre :.....

N°de Série :.....

THESE

Pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Production et Amélioration végétales

THEME

Caractérisation génétique et pharmacologique du pollen et des pennes du palmier
dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans la région de Biskra

Présentée par : M^{elle} Benouamane Ourida

Devant le Jury :

Président : Mr. MHAOUA Mohamed Sghir Professeur Université de Biskra
Directeur de thèse : Mr. BENAZIZA Abdelaziz M.C.A Université de Biskra

Co- directeur : Mr. CHINA Bernard Docteur en sciences I S S P Belgique

Examineurs :

Mr. BENBELKACEM Abdelkader Directeur de Recherche INRAA, Constantine
M^{me}. BABA HANI Souad Professeur Université de Ouargla

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout je remercie le bon Dieu, le Tout Puissant qui m'a donné le courage, la force, la patience de continuer jusqu'au bout pour terminer ce modeste travail.

Je voudrai exprimer, grandement, mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères, en premier lieu à mon Directeur de thèse **Mr Benaziza Abdelaziz** : MCA à l'Université de Mohamed khider- Biskra, qui a bien voulu diriger ce travail avec beaucoup de compétence. J'ai eu le privilège de bénéficier de son enseignement et de sa grande expérience. Je le remercie pour son encadrement très précieux et pour la confiance qu'il m'a accordée. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et tout mon respect.

Je tiens à remercier chaleureusement, **Mr Ernesto Francisco Simo Alfonso** : Professeur à l'Université de Valence, pour m'avoir accueilli et accepté d'effectuer mon stage dans son laboratoire, pour sa disponibilité, son aide scientifique. Je lui suis reconnaissante également pour ses conseils, ses multiples corrections qui ont permis à ce travail de prendre forme.

J'ai eu le plaisir de connaître, à son laboratoire, la compagnie fraternelle et amicale de tous les membres. Je tiens à remercier toute l'équipe « Laboratorio 10 » pour leur sympathie, leur aide et leur bonne humeur Oscar, Anca, José Manuel, Mery, Enrique, Paulina.

Un grand merci à Maria Vergara Barberan et Maria Jesus Lerma Garcia, pour leurs bons et précieux conseils sur la chimie analytique, notamment sur les techniques de chromatographie, pour leur contribution à la rédaction et l'interprétation de certains résultats, ainsi que pour leur disponibilité, tout au long de mon stage.

Je remercie le Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique Algérien et l'Université de Valence pour leur soutien financier et pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos recherches.

Je suis, particulièrement, reconnaissante au Docteur **Bernard China**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire en Belgique pour effectuer une bonne partie de ce travail. Merci pour son aide, ses conseils judicieux, son soutien scientifique et moral et sa disponibilité tout au long de mon parcours de thèse et pour tout ce qu'il m'a appris en biologie moléculaire. Merci de m'avoir consacré du temps pour corriger ma thèse, avec rigueur et patience. Un grand merci de m'avoir guidé pendant toutes ces années. Ce travail n'aurait pas été le même sans son Co-encadrement.

Je suis très grée à **Mr Mhaoua Mohamed Sghir** : Professeur à l'Université Mohamed khider Biskra de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Une grande part de ma reconnaissance s'adresse à **Mme Babahabi Souad**, Professeur à l'Université de Kasdi Merbah Ouargla qui a bien voulu examiner ce manuscrit et évaluer ce travail.

J'adresse ma gratitude au Directeur de Recherche **Benbelkacem Abdelkader** : Directeur à l'INRAA-Constantine qui m'a fait honneur d'avoir accepté notre invitation pour examiner et participer à ce jury de thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je ne m'adressais pas aux agriculteurs **Mrs Said, Larbi** et **Taher** qui m'ont beaucoup aidé sur le terrain pour réaliser les sorties de la collecte, d'échantillonnage et de reconnaissance des pollinisateurs.

Enfin, J'aimerais bien adresser mes sincères remerciements à **Mr Foughalia Hamid** et **Mme Djididi Mawahib** pour leur aide et leur participation aux manipulations au laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA), ainsi que toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici ma sincère reconnaissance et mes vifs remerciements.

Dédicace

J'adresse mes profonds remerciements à la plus chère personne dans ma vie « ma mère » qui m'a appris que le savoir, c'est un grand plaisir d'obtenir un diplôme de Doctorat en Sciences pour moi et surtout pour elle, c'est grâce à, son soutien moral et financier durant toute ma carrière, sa souffrance et son affection que j'ai pu surmonter tous les problèmes et continuer jusqu'au bout, sans elle, cela n'aurait pas été possible, ce travail est le fruit et la récompense de sa patience. Je lui dédie ce modeste travail que Dieu la protège, la bénisse et lui préserve une longue vie.

A mes petites chères sœurs : Aicha et Nour

A mon oncle Salih et sa famille

Sans oublier le petit Mahdi

A mes amis : Linda et Ghania, Sofia et Kader

Ourida

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Table des matières	
Liste des tableaux	II
Liste des figures.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des annexes.....	V
Introduction générale.....	1

Partie 1 : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le palmier dattier

1	Présentation de l'espèce	6
2	Classification botanique	6
3	Classification selon Munier	7
4	Origine et histoire.....	7
5	Description morphologique du palmier dattier	7
5.1	L'appareil végétatif.....	9
5.1.1	Les palmes.....	9
5.1.2	Le stipe	9
5.1.3	Les racines.....	10
5.1.4	La couronne (frondaison).....	10
5.1.5	Les inflorescences	11
5.1.6	Les organes floraux	11
5.1.7	Le fruit.....	12
6	Répartition géographique	13
6.1	Dans le monde	13
6.2	En Algérie	14

7	L'importance économique	14
7.1	Au niveau mondial.....	14
7.2	En Algérie.....	14
7.3	Biskra.....	15

Chapitre II: Les marqueurs moléculaires et les ressources phylogénétiques du palmier dattier

1	Introduction.....	17
2	Biodiversité.....	17
3	Les marqueurs moléculaires.....	18
3.1	Définition.....	18
3.2	But d'utilisation.....	18
3.3	Types des marqueurs.....	19
3.3.1	RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism.....	19
3.3.2	SSR : Simple Sequence repeats.....	19
3.3.3	ISSR : Inter Simple Sequence Repeats.....	20
3.3.4	AFLP: Amplified fragment length polymorphism.....	21
3.3.5	SNP : Single Nucleotide Polymorphism.....	22
3.3.6	RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA.....	22

Chapitre III : Composition chimique et activités biologiques

1	Introduction.....	25
2	La composition chimique des polyphénols.....	25
2.1	Définition.....	25
2.2	Rôles des polyphénols.....	26
2.3	Classification des composés phénoliques.....	26
2.3.1	Les acides phénoliques.....	27
2.3.2	Les flavonoïdes.....	29
2.3.3	Les tanins.....	32
2.3.4	Les stilbènes.....	33
2.3.5	Les lignanes.....	33
2.3.6	Les saponines.....	33

2.4	Méthodes d'analyse	33
2.4.1	HPLC.....	33
2.4.2	Principe.....	35
2.4.3	Notions fondamentales	35
2.4.4	Appareillage	37
2.5	Chromatographie 2D.....	38
2.6	Analyse discriminante linéaire (LDA).....	40
2.7	Stress oxydatif	42
2.8	Antioxydants	43
2.8.1	Définition	44
2.8.2	Mesure de la capacité d'un antioxydant	45
2.8.3	Les travaux sur les polyphénols	45
1	Introduction	48
2	Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne	48
2.1	Techniques en milieu liquide (méthode de dilution)	48
2.1.1	Méthode des disques de Sarbach.....	48
2.1.2	Méthode de Marzuella.....	48
2.1.3	Dilution en bouillon	49
2.1.4	Dilution en gélose.....	49
2.2	Techniques en milieu solide (méthode de la diffusion en disque).....	49
2.2.1	Méthode de Vincent	49
2.2.2	Méthode de Morel et Rochaix	49
2.2.3	Méthode en micro-atmosphère.....	49
2.3	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	50
2.4	Mode d'action contre les bactéries	50

Partie 2 : Partie Expérimentale

Etude I. Caractérisation génotypique de dokkars Phœnix dactylifera L	52
1 Préambule.....	53

2	Introduction	54
3	Matériel et méthodes	56
3.1	Région d'échantillonnage.	56
3.2	Matériel végétal	56
3.3	Caractérisation moléculaire.	56
3.3.1	Inter Simple Sequence repeats (ISSR)	56
3.3.2	Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD).....	57
4	Analyse statistiques	57
5	Résultats et Discussion.....	58
5.1	Analyse moléculaire L'ISSR	58
5.1.1	ISSR avec l'amorce biba1 :.....	58
5.1.2	ISSR avec amorce biba2 :	61
5.2	Analyse de RAPD	66
5.2.1	Analyse moléculaire RAPD L'amorce A10.....	66
5.2.2	Analyse moléculaire RAPD pour L'amorce A12	68
5.3	Combinaison des marqueurs	71
5.4	AMOVA	73
5.4.1	Resultats de l'Analyse Moléculaire de la Variance	73
6	Conclusion.....	75
	Etude II. Phytochimie et effet antioxydant	76
1	Introduction	77
2	Matériel et méthodes	79
2.1	Matériel végétal	79
2.2	Produits chimiques.....	79
2.3	Extraction des composés phénoliques	80
2.4	Calcul du Rendement.....	80
2.5	Détermination de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH	81
2.6	Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	81
2.7	Détermination de la teneur des Flavonoïdes totaux (FT).....	82

2.8	Dosage des tanins condensés (TCT).....	82
2.9	L'analyse chromatographique HPLC-MS	83
2.10	LC×LC Analysis	83
2.11	Acquisition, traitement des données brutes LC et construction de modèles LDA	84
3	Analyse Statistique.....	85
4	Résultats et discussion.....	85
4.1	Résultats de rendement des extractions des composés phénoliques.....	85
4.2	Caractérisation des pennes et du pollen des différents cultivars du palmier dattier en termes de composés polyphénoliques	88
4.2.1	Activité antioxydante piégeage du radical libre DPPH.....	88
4.2.2	Polyphénols totaux	89
4.2.3	Flavonoïdes totaux	89
4.2.4	Tanins condensés.....	89
4.3	L'Analyse de Chromatographie liquide de haute performance (HPLC).....	90
4.3.1	Choix des conditions de séparation LC×LC	92
4.3.2	Profils des fractions polyphénoliques des pennes de palmier-dattier de différents cultivars par LC×LC.....	96
4.3.3	Classification des pennes de palmier dattier en fonction de leurs cultivars à l'aide de LDA	99
5	Conclusion.....	101
Etude III. Activité antibiotique.....		103
1	Introduction	104
2	Matériel et méthodes	105
2.1	Réactifs chimiques	105
2.2	Matériel végétal	106
2.3	Micro-organismes testés	107
2.4	Activité antibactérienne des extraits de plantes	107
2.4.1	Préparation des extraits et disques	107
2.4.2	Analyse antibactérienne	109

2.4.3	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	110
3	Analyse statistique.....	112
4	Résultats et discussion.....	112
4.1	Tests de diffusion sur disque	112
4.2	Détermination de CMI et CMB	118
5	Conclusion.....	121
	<i>Conclusion générale et perspectives</i>	122
	<i>Références bibliographiques</i>	122
	<i>Annexes</i>	122
	Résumé	151
	Abstract	151
	المخلص	152

Liste des tableaux

Tableau 1: Profils ISSR pour les différents individus testés avec le marqueur Biba1.....	58
Tableau 2 : Profils d'ISSR des différents cultivars avec le marqueur Biba2	62
Tableau 3: Génotypage des cultivars biskrites de <i>P. dactylifera</i> avec l'amorce A10	66
Tableau 4: Profils de RAPD avec le marqueur A12	69
Tableau 5 : Résumé de l'analyse de l'AMOVA	74
Tableau 6: Rendement d'extraction en phénols solubles, activité antioxydante (IC50), PPT, FT et TC des extraits de pennes et du pollen de différents cultivars de palmier dattier extraits à l'aide de différents solvants.....	86
Tableau 7: La liste des composés phénoliques identifiés dans les pennes et le pollen de palmier dattier.....	91
Tableau 8: Le nombre de pics détectés dans les conditions optimisées LC×LC pour tous les échantillons de pennes du palmier dattier inclus dans cette étude	98
Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par la méthode de diffusion sur disque pour les différents extraits de pennes et du pollen	113
Tableau 10: Détermination de CMI et CMB pour <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> and <i>B. cereus</i> pour les différents extraits de pollen.....	118

Liste des figures

Figure 1: Schéma du palmier dattier (Munier, 1973).	8
Figure 2: Une palme (Peyron, 2000).	9
Figure 3: Tronc de palmier dattier.	9
Figure 4: Quatre types de racines (Peyron, 1995).	10
Figure 5: Inflorescences et fleurs du dattier (Munier, 1973).	11
Figure 6: Jeune inflorescence mâle et femelle	12
Figure 7: Fleur mâle du palmier dattier	12
Figure 8: Fruit et son noyau (Peyron, 2000).	13
Figure 9: Répartition géographique du palmier dattier. (El Hadrami, 2007).	13
Figure 10: Production de dattes des 10 principaux producteurs dans le monde.	14
Figure 11: Production des dattes en Algérie. Source : FAOSTAT, 2022	15
Figure 12: Différentes classes des composés phénoliques	27
Figure 13: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques.	28
Figure 14: Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).	29
Figure 15: Structure de la base des flavonoïdes	29
Figure 16: Structures chimiques des flavanols	30
Figure 17: Structures chimiques des flavanones	31
Figure 18: Structures chimiques des Flavones	31
Figure 19: Structures chimiques des Isoflavones	32
Figure 20 : Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau, 1968).	32
Figure 21: Schéma de la phase stationnaire	36
Figure 22: Schéma de la phase stationnaire et notion de temps de rétention	36
Figure 23: Schéma général d'un système de chromatogramme ² D (Gutierrez., 2021).	39
Figure 24: Chromatogramme obtenu dans la séparation des étalons polyphénols.	40
Figure 25: Processus de détoxyfication des dérivés actifs de l'oxygène.	43
Figure 26: Composés actifs dérivés de l'oxygène.	44
Figure 27-A : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%). Les nombres eprésentaient les tailles (en pb) de l'échelle de poids moléculaire.	59
Figure 27-B : Dendrogramme de l'analyse hiérarchique de clustering par couplage complet.	60
Figure 27-C : Index Jaccard pour le profil de l'ISSR pris 2 par 2.	61
Figure 27 : Génotypage à l'aide du marqueur ISSR biba1	61
Figure 28-A : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Les chiffres représentaient les tailles (en pb) de l'échelle.	63

Figure 28-B : Dendrogramme pour une analyse hiérarchique de regroupement par couplage complet.....	64
Figure 28-C : Indice de Jaccard pour le profil de l'ISSR pris 2 par 2.....	65
Figure 28 : Génotypage ISSR à l'aide du marqueur biba2.....	65
Figure 29 : Indices de Jaccard entre les ADN des différents cultivars du marqueur A10.....	68
Figure 30 : Dendrogramme en complete linkage pour le marqueur A10.....	69
Figure 31 : Indices de Jaccard calculés entre les cultivars pour le marqueur A12.....	71
Figure 32 : Dendrogramme en « complete linkage » sur base des profils générés par le marqueur A12.....	71
Figure 33 : Matrice des indices de Jaccard pour les différents cultivars sur base des 4 marqueurs génétiques (Biba1, biba2, A10 et A12).....	73
Figure 34 : Dendrogramme en « complete linkage » pour l'ensemble des marqueurs génétiques...74	
Figure 35 : Resultats de l'Analyse Moléculaire de la Variance.....	75
Figure 36 : ¹ D-LC chromatogrammes montrant le profil polyphénolique dans l'extrait méthanolique de pennes de cultivar GH obtenus avec les colonnes the Ascentis TM RP-amide (A), Kinetex PS C18 (B) et PFP Kinetex F5 (C).	936
Figure 37 : Initial (A) et optimisé (C) ACN-H ₂ O gradients modifié utilisé en ² D séparation des composés polyphenoliques dans l'extrait méthanolique des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes PFP×C18, avant (B) et après optimisation compè (D).	94
Figure 38 : Optimisation de la séparation LCxLC des composés polyphenoliques des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes the RP-amide×C18.....	95
Figure 39 : Optimisation de la séparation LCxLC, des composés polyphenoliques des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes the RP-amide×PFP.....	96
Figure 40 : Chromatogrammes représentatifs LC×LC montrant les profiles des composés polyphénoliques de HM (A), SF (B), GH (C), HR (D) et DN (E) des extraits méthanoliques des pennes.	97
Figure 41 : Score plot sur un plan oblique l'espace tridimensionnel défini par les trois premières fonctions discriminantes du modèle LDA.	100
Figure 42 : Broyage et tamisage des pennes	106
Figure 43 : Séchage du pollen	106
Figure 44 : Préparation des solutions organiques des pennes et pollen	108
Figure 45 : Préparation des extraits bruts des pennes et de pollen avec DMSO	108

Figure 46: Stérilisation des extraits à travers un filtre à membrane	109
Figure 47: Préparation de l'inoculum.....	110
Figure 48: Test antibiogramme	110
Figure 49: Schéma explicatif de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	111
Figure 50: Activité antibactérienne des extraits de pennes sur des bactéries de (Gram+) Staphylococcus, Listeria, Bacillus et Enterococcus	116
Figure 51: Activité antibactérienne des extraits de pollen sur des bactéries de (Gram+)	117
Figure 52: Détermination des CMI des extraits par la méthode des micro-dilutions de microplaques	119

Liste des abréviations

- (¹D) : Unidimensionnelle
(²D): Bidimensionnelle
(Act): Acétone
(ACN): Acétonitrile
(AFLP): Amplified fragment length polymorphism
(BHT): ButylHydroxyToluène
(AlCl₃·6H₂O): Chlorure d'aluminium
(DAD): Diode Array Detector
(DMSO): Diméthylsulfoxyde
(DPPH): 2, 2- diphényle -1-picrylhydrazyl
(DSA): Direction des Services Agricoles
(EOH): Éthanoliques
(FA): formique acide
(FAO): Food and Agriculture Organization
(FT) : Les Flavonoïdes totaux
(GAE) : galique acide equivalent
(H₂O): molécule d'eau
(H₂O₂): peroxyde d'hydrogene
(HM): Hamray
(SF): Safray
(GH): Ghars
(HR) : Horra
(DN) : Deglet Nour
(HO₂) : radical perhydroxyle
(HPLC-MS) : Haute Performance Liquide Chromatographie -Spectrométrie de Masse
(IPGRI) : The International Plant Genetic Resources Institute
(HCl): L'acide chlorhydrique
(LC × LC) : Liquid Chromatography
(LDA) : Linear Discrimination Analysis
(MADR) : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
(MeOH) : Methanol
(MHA): Muller Hinton
(MADR) : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

(Na): Sodium
(Na₂CO₃): Le carbonate de sodium
(O₂): anionsuperoxide
(OH): radicalhydroxyle
OMS : Organisation Mondial de la Santé
(PPD) : pollen du palmier dattier
(PTT) : Les Polyphénols totaux
(PASA) : Programme d'Appui au Secteur de l'Agriculture
(RAMPO) : Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms
(RAPD) : Random Amplification of Polymorphic DNA
(Rndt): Le rendement
(RO) : Radical alkoxye
(ROS) : Reactive oxygen species
(RONS): Reactive oxygen nitrogen species
(ROO): Radical peroxye
(SNP): Single Nucleotide Polymorphism
(SSR): Simple sequence repeats
(SSRP) : Simple sequence repeat polymorphisms
(STMS) : Sequence targged microsatellite sites
(TFA) : Trifluoroacétique

Liste des Annexes

Annexe I : Le test de DPPH pour les pennes et le pollen des cinq cultivars avec les trois solvants	148
Annexe II : Tableau de Quantification des composés polyphénoliques dans les pennes d'acétone (A), de méthanol (M) et d'éthanol (E) et les extraits polyphénoliques de pollen. Teneur exprimée en mg par g d'extrait en poids sec.....	150
Annexe III : Tableau de Prédicteurs sélectionnés et coefficients normalisés correspondants du modèle LDA construit pour classer les échantillons de pennes de palmier dattier en fonction de leur cultivar	151

Introduction générale

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L, est une plante d'intérêt écologique, économique et social majeur pour de nombreux pays des zones arides. Le développement de la phœniciculture permet de lutter durablement contre l'insécurité alimentaire dans les régions où la désertification est accélérée par les changements climatiques. En effet, le palmier dattier, en créant au milieu du désert un microclimat favorable au développement de cultures sous-jacentes, constitue l'axe principal de l'agriculture dans les régions désertiques et assure la principale ressource vivrière et financière des oasis.

Le patrimoine phœnicicole algérien est connu pour sa richesse exceptionnelle en diversité génétique représentée par plus de 1000 cultivars (Belguedj, 1996 *in* Babahani, 2011). Les cultivars mâles appelés «dokkars » évoluent sur le plan quantitatif et qualitatif, certains ont disparu ou sont rares, sont représentés par des sujets très vieux et leur pérennité est compromise. D'autres cultivars sont apparus en raison de l'allogamie stricte du palmier dattier qui favorise les hybrides. Ceux qui ont une importance économique sont multipliés par voie végétative. Cette richesse génétique, est sujette à une érosion suite à différents facteurs ayant aboutis à la dégradation progressive d'une grande partie de la palmeraie traditionnelle algérienne, entre autres, vieillissement des pieds, déficit hydrique, l'attaque du bayoud, l'exode rurale, désintéressement de jeunes localement, manque de formation ainsi que, l'orientation vers la culture monovariétale dans la nouvelle plantation.

Des divers travaux, visant à inventorier les cultivars de dattiers n'ont pas encore permis de répertorier l'ensemble du patrimoine à travers le pays. De ce fait, il est impératif d'étudier les ressources génétiques du palmier dattier pour identifier, caractériser et évaluer de nouveaux cultivars afin de les conserver. Pour étudier les caractéristiques des différents cultivars, on peut se baser sur la morphologie des différentes parties de la plante. Cette méthode était la méthode traditionnelle et largement utilisée jusqu'à l'avènement de la biologie moléculaire à la fin du XXème siècle (Berche, 2016). Elle permet d'avoir accès au génome de la plante et d'en étudier les caractéristiques notamment dans une perspective de comparaison entre génomes. La caractérisation moléculaire de différents cultivars mâles de *Phoenix dactylifera* L. fût l'une des études de ce travail. Ceci permet de déterminer si les génomes appartiennent au même cultivar ; mais aussi d'étudier la variabilité génétique au sein d'un cultivar et entre individus de cultivars différents.

D'un autre côté, selon l'expression consacrée la nature est la pharmacie d'origine du monde. Les produits naturels dérivés de microbes et de plantes sont la plus grande ressource pour la découverte de médicaments pour la médecine moderne. Le palmier dattier est utilisé en médecine traditionnelle depuis l'antiquité.

Introduction générale

Phoenix dactylifera L., communément appelé palmier dattier, est une plante primitive et a été cultivée pour ses fruits comestibles dans l'oasis désertique du monde arabe depuis des siècles. Les fruits sont une riche source de glucides, fibres alimentaires, certaines vitamines et minéraux essentiels (Adeosun et al, 2016). Les noyaux de dattes sont également une excellente source de fibres et contiennent des quantités considérables de minéraux, de lipides et de protéines. Outre son utilisation diététique, les dattes ont un usage médicinal et sont utilisées pour traiter une variété de maux dans les différents systèmes de médecine traditionnelle (Orabi et Shawky, 2014).

Des investigations phytochimiques ont révélé que les fruits contiennent des anthocyanes, des composés phénoliques, des stérols, caroténoïdes, procyanidines et flavonoïdes, des composés connus pour posséder de multiples effets bénéfiques.

Des études précliniques ont montré que les dattes possèdent des propriétés antiradicalaires, antioxydantes, antimutagène, antimicrobien, anti-inflammatoire, gastroprotecteur, hépatoprotecteur, néphroprotecteur, activités anticancéreuses et immunostimulantes (Baliga et al, 2011).

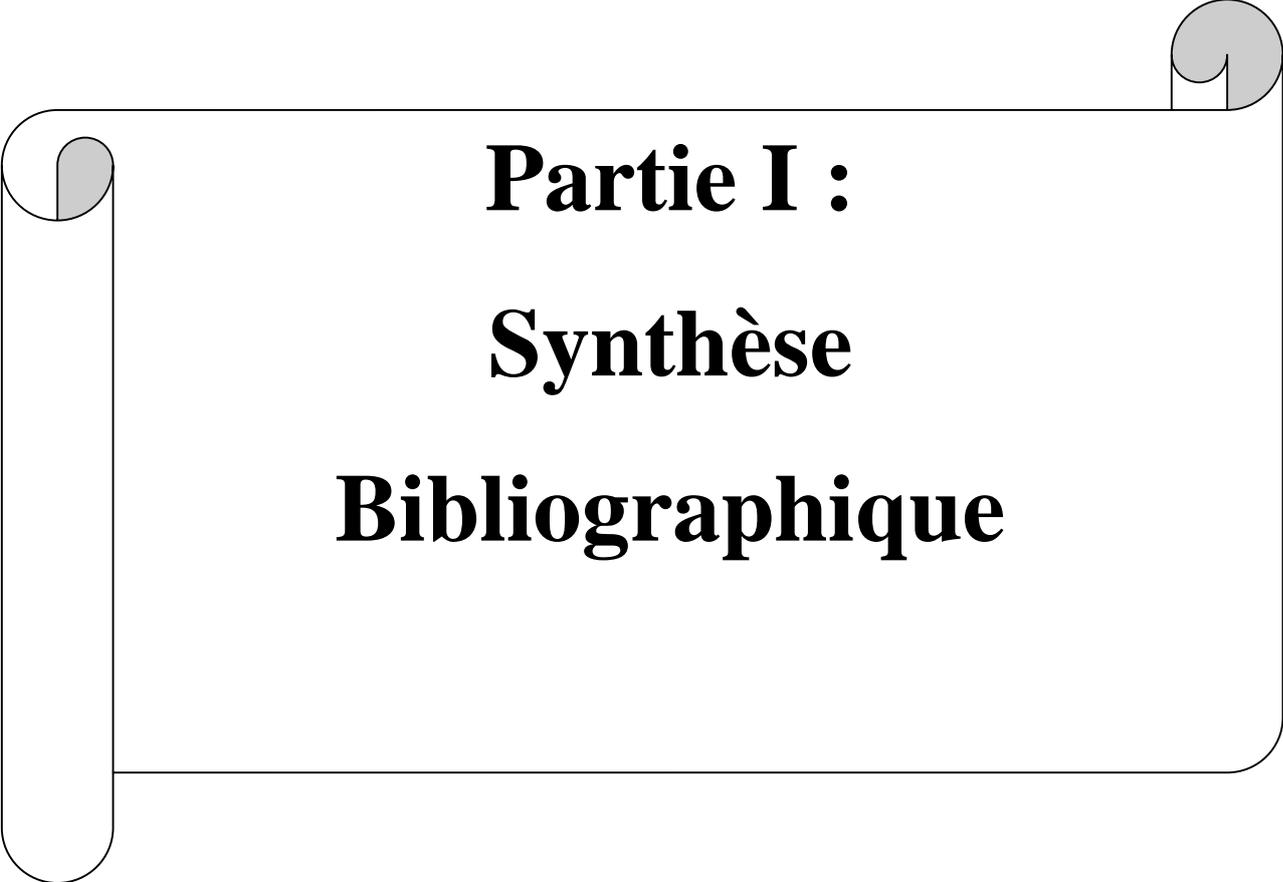
La deuxième partie de la thèse a pour objectifs d'explorer en premier lieu, la composition phénolique des pennes et du pollen de palmiers dattier, pour la valorisation des ressources génétiques, de cinq différents pollinisateurs Algériens, ressemblant à Hamray (HM), Safray (SF), Ghars (GH), Horra (HR), et Deglet Nour (DN), la plupart d'entre eux étudié pour la première fois. La possibilité de discriminer les différents échantillons en fonction de leur variété génétique est également évaluée en seconde étape. À cette fin, trois différents solvants ont été utilisés pour effectuer l'extraction des composés phénoliques des pennes et du pollen. Ensuite, les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins, ainsi que la capacité antioxydante des échantillons ont été déterminés et comparés. Ensuite, l'identification et la quantification des principaux phénols, à effet thérapeutique, présents dans les extraits ont été réalisées par HPLC-MS. En outre, une méthode LC×LC a été développée pour obtenir les empreintes polyphénoliques des différents extraits de pennes, afin de les classer en fonction de leur cultivar en utilisant LDA.

Enfin, parmi les nombreuses activités biologiques attribuées au palmier dattier, ses propriétés antibiotiques sont particulièrement intéressantes. En effet, la résistance aux antibiotiques est un problème majeur partout dans le monde. Les bactéries avaient toujours été une des principales causes de mortalité des humains, jusqu'à la découverte en 1928 du premier antibiotique, la pénicilline. Depuis, d'autres antibiotiques ont été conçus et on espérait un jour pouvoir éradiquer les décès par infection bactérienne. Hélas, les bactéries ont elles aussi développé leur arsenal de défense, devenant de plus en plus résistantes à nos antibiotiques. Au point que l'anti-bio résistance est redevenue une de causes majeures de mortalité, selon une étude publiée le 19 janvier 2022 dans *The*

Introduction générale

Lancet. Près d'une centaine d'instituts de recherche ont collaboré pour réaliser cette nouvelle estimation, qui conclut que les bactéries résistantes aux antibiotiques auraient directement causé près de 1,3 million de décès dans le monde en 2019 et seraient impliquées dans près de 5 millions de décès, dépassant le sida et le paludisme selon l'OMS. Il est donc important de pouvoir trouver de nouvelles molécules avec des propriétés antibiotiques qui seront les nouveaux médicaments de demain.

Ce travail a donc poursuivi deux axes, l'un qui s'inscrit dans la problématique de la biodiversité et la connaissance et la protection du patrimoine naturelle de l'Algérie et l'autre qui s'inscrit dans la caractérisation et la valorisation des produits du palmier dattier à des fins médicinales.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and rounded corners. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving upwards. The text is centered within the scroll's body.

Partie I :
Synthèse
Bibliographique

Chapitre I :

Généralités sur le palmier dattier

1 Présentation de l'espèce

Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera* L, appartient à une grande famille à palme ou "Arécacées". Ses noms en anglais : Date palm ; en arabe : Nakhla ou tamar. C'est **Carlos Linné** « le prince du monde végétal », en 1734 qui a repris le nom de *Phoenix dactylifera* et qui a fait sa description morphologique complète.

En revanche, le nom de dactylifera, du latin : dactylus, dérivant du grec : dactulos qui désigne le doigt en raison de la forme du fruit (**Munier, 1973**). Le palmier dattier est largement cultivé pour son fruit qui de forme ovoïde, qui est un aliment prisé, et sa commercialisation constitue une source de revenu pour les populations des oasis. C'est la plante verte des oasis sahariennes; il est indispensable dans ces régions, car son bois, ses palmes, ses rachis et ses régimes sont valorisés. De plus sa présence lutte contre la désertification. En termes de valorisation, on peut citer l'extraction à partir de la sève de boissons très appréciées comme le lagmi ainsi que la fabrication de confitures, de sirops et de mélasses à partir des dattes (**Moncciero, 1961 in Alloum, 2007**).

Le palmier dattier est une plante monocotylédone, dioïque (individus mâles et femelles sont séparés). Ce genre comprend 12 espèces réparties dans le monde entier. L'espèce, *Phoenix dactylifera* se trouve en Europe méditerranéenne, en Afrique, en Asie occidentale, aux USA, et en Australie.

2 Classification botanique

La famille des *Arecaceae* comprend environ 2500 espèces présentant des morphologies diverses (**Dansfield et al., 2008**). On subdivise les palmiers en 15 groupes taxonomiques distincts sur la base des caractères morphologiques des pennes, des fleurs et de leur répartition géographique (Moore, 1973). Le genre *Phoenix* est inclus dans le groupe des palmiers Phoenicoïdés. La position systématique actuelle, est basée sur des données récentes de « l'international code of botanical nomenclature » (**Moore, 1963 ; Uhl et Moore, 1971 ; Dransfeld, 1999 ; Henderson, 1999 ; Dahir, 2010**).

- Règne : Végétale
- Embranchement : Angiosperme/ Magnoliophida
- Classe : Monocotylédone /Lilopsida
- Ordre : *Arécale*
- Famille : *Palmacées/Arécacées*
- Genre : *Phoenix*
- Espèce : ***Phoenix dactylifera* L.**

Dans une nouvelle classification basée à la fois sur l'analyse de données morphologiques et des séquences de l'ADN nucléaire, une subdivision de la famille des *Arecaceae* en cinq sous-familles :

Coryphoideae, *Calamoideae*, *Nypoideae*, *Ceroxyloideae* et *Arecoideae* a été proposé (Asmussen et al., 2006). Le genre *Phoenix* est ainsi classé actuellement dans la sous famille des *Coryphoideae*.

3 Classification selon Munier, 1973

- Catégorie : Metaphyta
- Division : Tracheophyta
- Classe : Angiosperme
- Famille : Palmacées
- Sous famille : Carphynceae
- Genre : Phoenix
- Espèce : *Phœnix dactylifera* L 1973

4 Origine et histoire

Le palmier dattier cultivé est connu depuis l'antiquité, son origine serait située dans l'ouest de l'Inde, il est répandu dans toutes les zones chaudes (arides et semi -aride) : Afrique du nord, Sahara depuis l'Atlantique vers la mer Rouge ainsi qu'au moyen orient, et de l'est jusqu'à la vallée de l'Indus (Pakistan actuellement), la Mésopotamie (l'Irak actuellement) et le Sud de la Perse (Iran).

Plusieurs hypothèses ont été émises sur son origine, elle se trouverait à Babylone et date de 4 000 ans avant Jésus-Christ (Danthine, 1937). Alors que selon d'autres sources, il trouverait son origine dans la région du golfe persique (Newton et al., 2008, Abssi, 2013).

Des travaux plus récents selon ont montré que le palmier dattier proviendrait de la domestication d'une population sauvage de la même espèce (Daher, 2010 ; Pintaud et al., 2010). A partir de son aire d'origine dans l'ancien continent, la propagation de la culture du palmier dattier progressa en basse Mésopotamie vers l'Iran puis vers la vallée de l'Indus ; à partir de l'Egypte (ouest) la culture du palmier dattier gagna la Libye d'où elle progressa dans différentes directions (Djerbi, 1996) :

Vers le Maghreb : en Tunisie dans le Djérid

En Algérie : dans Souf, Oued Rhir, Tidikel, Saoura, et Ziban.

Au Maroc : dans Tafilalet et la vallée du Draa.

En Mauritanie : dans Adrar de Mauritanie.

5 Description morphologique du palmier dattier

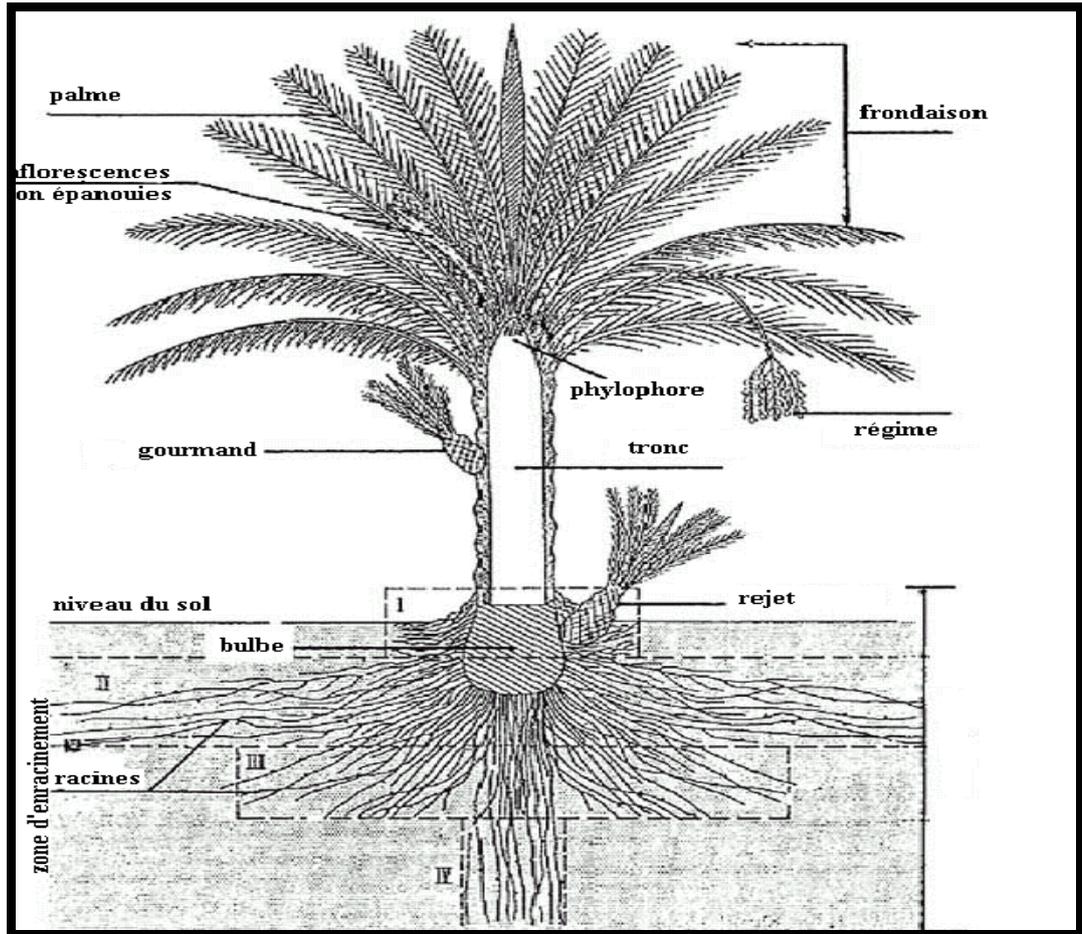


Figure 1: Schéma du palmier dattier (Munier, 1973).

5.1 L'appareil végétatif

Les palmes 5.1.1

Les palmes sont issues du bourgeon terminal, ce sont des pennes composées, pennées, disposées en hélice sur le tronc. Elles sont longues, ont un limbe divisé en deux rangées de pennes étroites, pliées raides, piquantes au sommet, disposées en position oblique le long du rachis, isolées ou groupées, la couleur varie selon les clones (**Munier, 1973 ; Peyron, 2000**).

A l'extrémité inférieure de la palme il y a le rachis qui s'élargit afin de former le pétiole (Kornaf) où sa base est recouverte par le fibrillum ou le lif. Il est semi-cylindrique, dur et relativement rigide portant les épines (chouk ou sreb) (Fig.2).

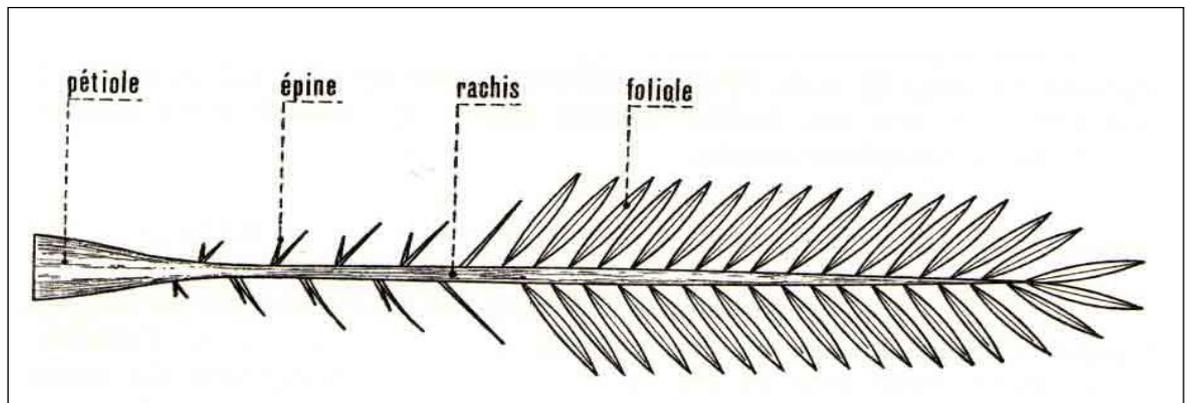


Figure 2: Une palme (Peyron, 2000).

5.1.2 Le Stipe

Peut atteindre et dépasser 30 m de hauteur et 45 à 55cm de diamètre, de forme cylindrique ou tronconique, lignifié, de couleur brune, son élongation est assurée par la croissance du bourgeon terminal (apex) (**Munier, 1973**) (Fig.3). La croissance en épaisseur est assurée par un cambium extra fasciculaire qui disparaît très tôt ce qui permet au dattier d'avoir la même épaisseur durant toute sa vie (**Benabdallah, 1990**).



Figure 3: Stipe de palmier dattier (google image).

Il est recouvert à la base par des pétioles (kornaf) qui restent collées au stipe après le dessèchement et la mort des palmes. Elles permettent aussi de grimper au palmier (**Peyron, 2000**).

A l'aisselle de chaque palme, se retrouve un bourgeon axillaire qui en se développant peut donner naissance à une inflorescence (dans la partie coronaire), à un rejet (dans la partie basale) et un gourmand (dans la région médiane) (**Munier, 1973**).

5.1.3 Les racines

Le système racinaire est de type fasciculé, très développé. Le plateau racinal est volumineux accumule toutes les réserves. Il présente quatre zones d'enracinement (Fig.4) :

Zone 1 : racines respiratoires (superficielles) ; Zone 2 : racines nutritives (moyennes) ;

Zone 3 : racines d'absorption (inférieures) ; Zone 4 : les racines du faisceau pivotant sont très développées (**Peyron, 2000**).

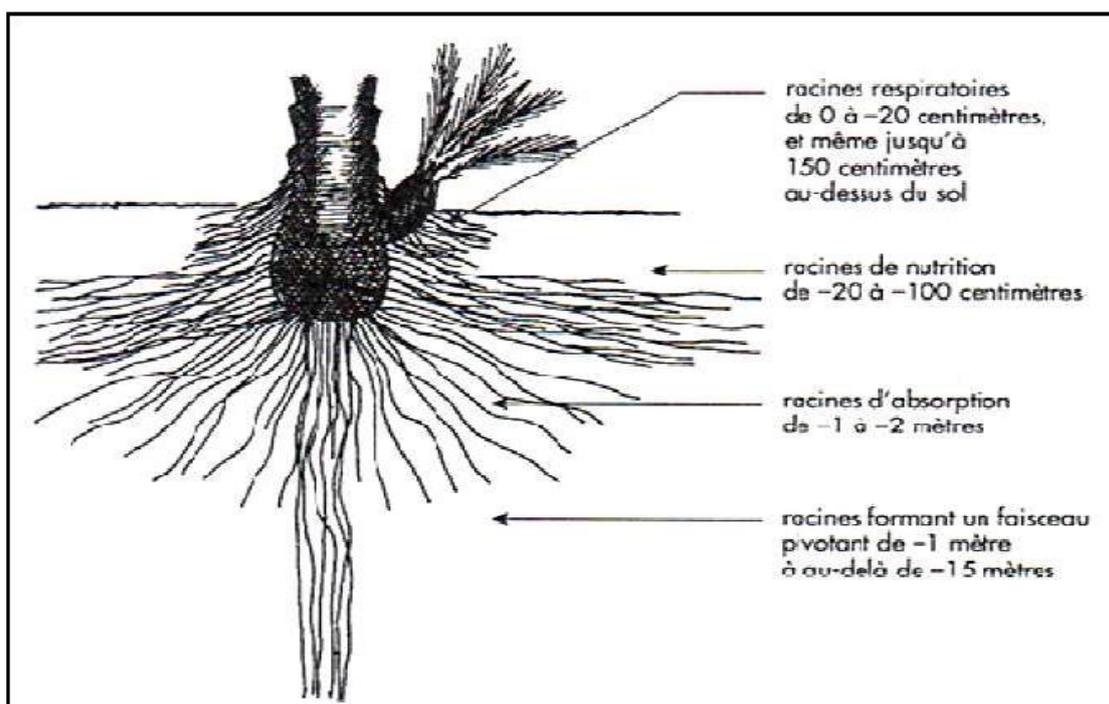


Figure 4: Quatre types de racines (Peyron, 1995).

5.1.4 La couronne (frondaison)

L'ensemble des palmes forme la couronne, comptant 50-200 palmes chez un adulte, vivant de trois à sept ans, ainsi on distingue : la couronne basale avec des palmes âgées ; la couronne centrale avec les palmes adultes ; les palmes du cœur avec des palmes non ouvertes et n'ayant pas encore atteint leur taille définitive (**Peyron, 2000**).

5.1.5 Les inflorescences

Les inflorescences naissent par le développement de bourgeons axillaires, situés dans la partie coronaire du stipe. Dès l'âge de 3- 4 ans, l'arbre issu d'un rejet commence à fleurir, (entre 5 et 8 ans après la germination). Les inflorescences contiennent plusieurs fleurs enfermées dans une bractée et forment la spathe (**Benabdallah, 1990**). Les spathe ont une forme allongée pour les femelles, plus courte et renflée pour les mâles avec une légère dépression en haut, c'est une caractéristique utilisée pour différencier entre les sexes (Fig.5).

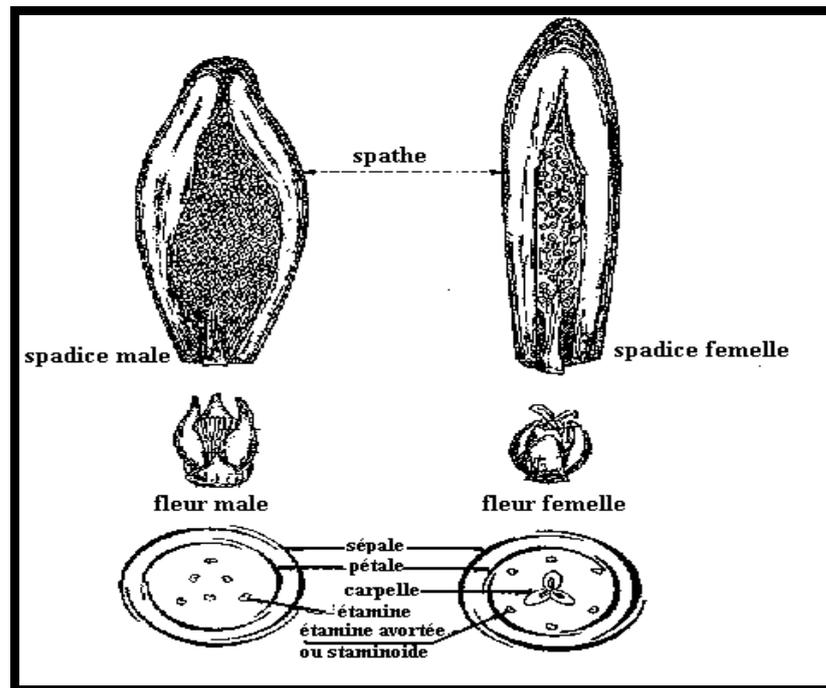


Figure 5: Inflorescences et fleurs du dattier (Munier, 1973).

5.1.6 Les organes floraux

5.1.6.1 Les fleurs

Les fleurs sont déclinaées, unisexuées, à pédoncules très courts, portées par des pédicelles rassemblés en épis composés (**Djerbi, 1996**).

5.1.6.1.1 Fleurs femelles

Elles sont de forme globulaire, de couleur entre blanc ivoire et vert clair avec un diamètre entre 3-4mm (Fig.6) elles comportent :

Un calice : court en forme de cupule ou « cupuliforme » qui contient 3 sépales soudés (**Peyron, 2000**) ;

La corole : constituée de 3 pétales ovales ou arrondis et de 3 étamines avortées ;

Le gynécée : est formé de 3 carpelles indépendants. (Fig. 6)

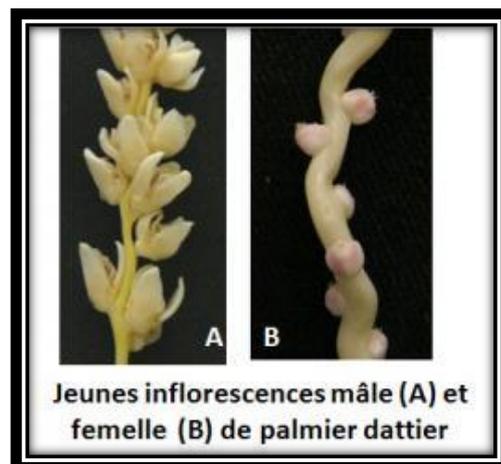


Figure 6: Jeune inflorescence mâle et femelle

5.1.6.1.2 Fleurs mâles

Elles ont une forme légèrement allongée, de couleur blanche ivoire, constituées de calice court (Fig.7) avec trois sépales soudés, trois pétales en pointe et six étamines.

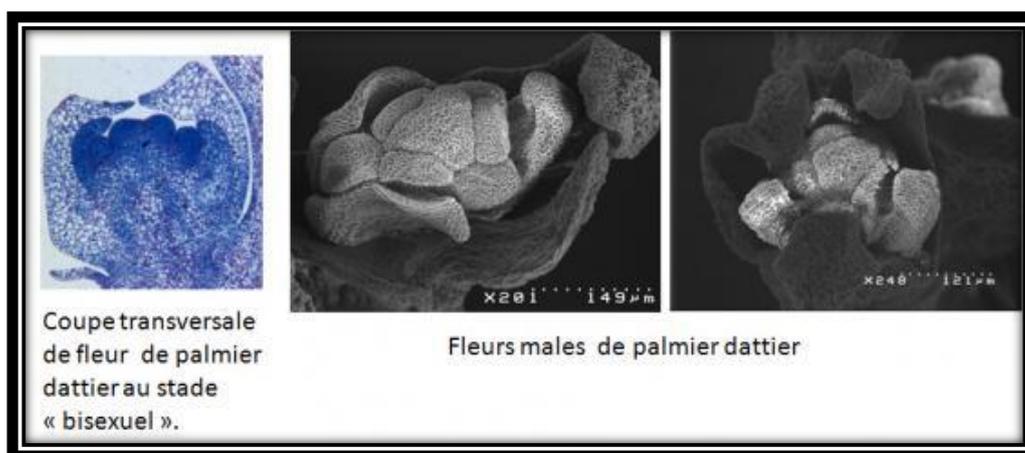


Figure 7: Fleur mâle du palmier dattier

5.1.7 Le fruit

Le carpelle se développe en donnant le fruit qui est une baie contenant une seule graine (Fig. 8). Il est constitué d'un mésocarpe : enveloppe charnue c'est la partie comestible de datte, protégée par un fin péricarpe et un endocarpe membraneux , elle est très riche en sucre (fructose et glucose) et constitue une source d'énergie rapide pour le corps humain comme elle est riche en minéraux essentiels Ca, K, P, Zn, Si, Mg (**Al quraini, 2011**) et en composés phénoliques source d'une grande activité anti-oxydante (**Biglari et al, 2007**). La couleur du fruit, varie selon l'espèce et le stade de maturité. Elle peut être jaune plus ou moins clair, jaune ambré translucide, brun plus ou moins

prononcé, rouge ou encore noire. La consistance est variable selon les cultivars, elle peut être molle, demi molle ou sèche (**Munier, 1973**).

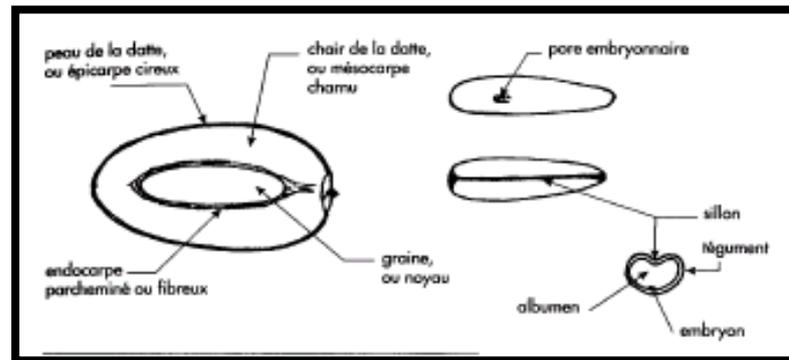


Figure 8: Fruit et son noyau (Peyron, 2000).

6 Répartition géographique

6.1 Dans le monde

Le palmier dattier couvre les cinq continents dont : Le Moyen Orient, l'Afrique méditerranéenne, L'Europe, et L'Amérique du nord (**Toutain, 1967 ; Munier, 1973**). Les limites extrêmes s'étendent sensiblement entre 10° de latitude Nord (Somalie) et le 39° de latitude Nord (Elche en Espagne ou Turkménistan), les zones les plus favorables sont comprises entre le 24 et le 34° de latitude Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie, Egypte, Irak). Aux Etats unis, la culture s'étend du 33 aux 35 parallèles, il est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (Fig. 9).



Figure 9: Répartition géographique du palmier dattier. (El Hadrami, 2007).

6.2 En Algérie

Le palmier dattier en Algérie est retrouvé dans plusieurs oasis, sa culture s'étend depuis la frontière marocaine à l'ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'est, et depuis l'Atlas saharien au nord jusqu'à Reggane (sud-ouest), Tamanrasset (centre) et Djanet (sud-est). Les véritables palmeraies commencent sur le versant sud de l'Atlas saharien par les palmeraies à Deglet Nour de Biskra, de Tolga au Sud-Est, d'Oued Righ au sud des Ziban, continuent par celle de M'zab au centre et Beni ounif (Saoura) au sud-ouest de l'Atlas saharien. L'oasis de Djanet (Tassili) constitue la limite méridionale de la palmeraie algérienne (**Babahani et Bouguedoura, 2009**).

7 L'importance économique

7.1 Au niveau mondial

Tous les pays phoenicicoles connaissent une évolution importante en matière de surfaces phoenicicoles. La production mondiale en dattes est estimée, en moyenne, à 9,4 millions de tonnes pour la période 2019/2020.

La majorité de cette production est située au Moyen Orient et en Afrique du Nord, selon les statistiques de la FAO (2022), l'Algérie se classe en 4^{ème} position en termes de production de dattes avec 1151909 de tonnes en 2020, après l'Egypte, l'Arabie Saoudite, l'Iran avec une production enregistrées respectivement 1598045, 1377246, et 1267091 tonnes, après viennent l'Irak, Pakistan, Soudan, Oman, les Emirats arabes Unis et la Tunisie (FAO, 2022).

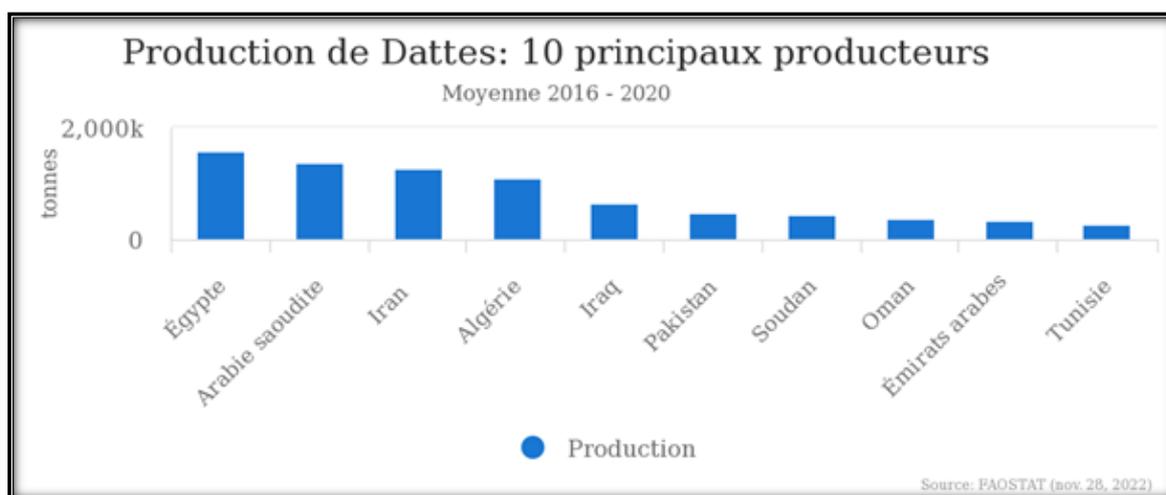


Figure 10: La production de dattes des 10 principaux producteurs dans le monde

7.2 En Algérie

La phoeniciculture occupe une grande place dans les régions sahariennes algériennes, avec une surface moyenne de 167279 ha en 2016 augmentant à 170 500 ha en 2020. La production de dattes connaît une croissance selon les données du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural

(MADR), elle est passée de 1029596 T en 2016 à 1151909 T en 2020 ; avec plus de 18 millions de palmiers dont 15,5 sont productifs (MADR, 2018 ; FAO stat, 2022). Au plan commercial, l'Algérie exporte en moyenne 4.7% de sa production. Au cours des cinq dernières années, les exportations algériennes de dattes ont atteint en moyenne 66,4 millions de dollars, culminant en 2021 à 79 millions de dollars. Selon les mêmes données, la production de dattes a atteint son apogée en 2019 avec 11,36 millions de quintaux, emmenée par « Deglet Nour » avec 6,14 millions de quintaux, suivie des dattes sèches avec 3,02 millions de quintaux, puis le reste des dattes fraîches avec 2,20 millions quintaux. Le nombre moyen de pays importateurs de dattes algériennes entre 2017 et 2021 était équivalent à 66 pays, avec un pic enregistré en 2021 avec 72 pays dans le monde. (PASA, 2021 ; FAO stat, 2022).

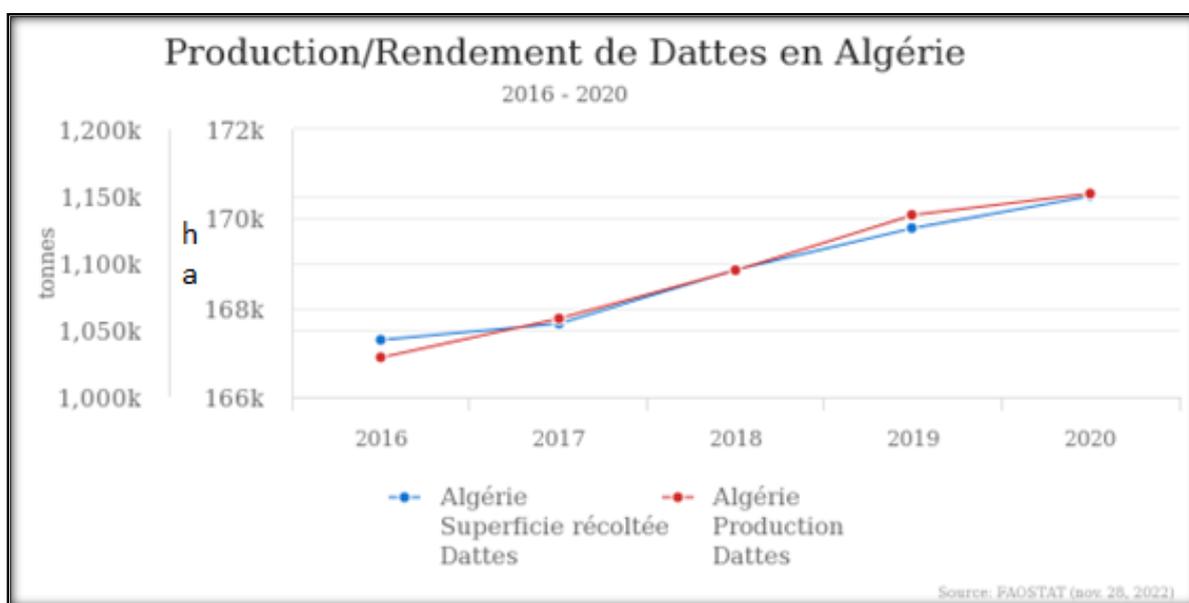


Figure 11: La production des dattes en Algérie. Source : (FAOSTAT, 2022)

7.3 Biskra

Les riches palmeraies des Ziban (Toulga, Bordj ben azouz, Fourala et Ourelal, Doucen, Ouled Djellal) sont l'un des pôles de la production dattière en Algérie jouant un rôle régional capital. Elle est la première région phoenicicole avec 26% de la superficie totale soit 43617 ha, regroupant 4,39 millions pieds (DSA de Biskra, 2018) soit 23,1% du nombre total de palmiers dattiers (2,6 millions de pieds fournissent la Deglet Nour) et 41,2% de la production nationale de dattes. La production s'élève à 4,6 millions de quintaux en 2019 et 4,8 millions de quintaux en 2020 dont 3,5 millions de quintaux de Deglet Nour (PASA, 2021).

Chapitre II :

**Les marqueurs moléculaires et les ressources
phytogénétiques du palmier dattier**

1 Introduction

Au Sahara algérien, le palmier dattier est le pilier des écosystèmes des oasis où il limite les dégâts causés par l'ensablement. La production annuelle est estimée à 1, 151,909 tonnes de dattes sur une superficie approximative de 170 000 hectares (**FAO, 2022**). Selon le dictionnaire Larousse, un cultivar est un type végétal résultant d'une sélection, d'une mutation ou d'une hybridation (naturelle ou provoquée) et cultivé pour ses qualités agricoles.

Pour cette raison, il est impératif d'élaborer une approche stratégique visant à évaluer et caractériser la variabilité génétique et à préserver le germoplasme du palmier dattier algérien.

La plupart des études réalisées sur les ressources génétiques du palmier dattier étaient fondées sur la morphologie des fruits, la qualité biochimique et nutritionnelle (**Açourene et al., 2001, Ben Abdellah., 2020**). Par ailleurs, l'utilisation de traits morphologiques pour décrire les arbres constitue le principal outil descriptif utilisé pour caractériser une collection.

De nombreux auteurs ont indiqué l'utilisation de divers marqueurs moléculaires pour évaluer le polymorphisme génétique et différencier les génotypes chez le palmier dattier. Dans cette partie nous allons entamer la description des différents marqueurs moléculaires ainsi leur utilisation.

2 Biodiversité

La biodiversité est devenue le cadre de réflexion et de discussion dans lequel on est amené à revoir l'ensemble des questions posées par les relations que l'homme entretient avec les autres espèces et les milieux naturels. Les ressources génétiques en général et les ressources phytogénétiques en particulier sont fondamentales pour la survie de notre planète, elles sont définies, par la convention sur la diversité biologique, comme étant : le matériel génétique ayant une valeur effective ou potentielle, le matériel d'origine végétale, animale, microbienne ou autre, contenant des unités fonctionnelles de l'hérédité » (**Hadyatou et al., 2007**).

Le patrimoine génétique végétal constitue le premier maillon de la sécurité alimentaire. Le libre accès aux ressources phytogénétiques a joué un rôle important dans la multiplication, l'échange, et la préservation de ce réservoir pour éviter son érosion. Avec l'avènement des biotechnologies et aux progrès réalisés en biologie moléculaire, les ressources génétiques deviennent le nouvel " or vert " où le monde industriel prend conscience de la valeur des gènes, éléments de base de la biodiversité et les véritables supports d'informations génétiques (**Chetaille, 2002**).

3 Les marqueurs moléculaires

3.1 Définition

Le marqueur génétique, ou locus marqueur, est une séquence d'ADN polymorphe localisée dans le génome, facilement détectable au laboratoire qui nous renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. La diversité des organismes est le résultat des variations des séquences d'ADN et des effets de l'environnement, d'après Vienne et al., (2007) un bon marqueur doit avoir quelques caractéristiques :

- Polymorphe (variable)
- Codominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes.
- Non épistatique : on peut lire son génotype à partir de son phénotype.
- Neutre : n'a pas un autre effet phénotypique
- Insensible au milieu : on peut inférer le génotype à partir du phénotypique quel que soit le milieu.

L'empreinte génétique est utilisée chez les plantes pour l'identification, la protection de la biodiversité et la conservation du germoplasme. L'avantage est que l'ADN contenu dans la cellule est indépendant des conditions climatiques, du tissu ou du stade de croissance (Ainsworth et al., 1996 *in* Khanam et al , 2012).

3.2 But d'utilisation

Les polymorphismes d'ADN sont devenus des méthodes efficaces et les marqueurs préférés pour les programmes de sélection pour détecter la variation génétique et caractériser les cultivars de palmier dattier, sont utiles pour la recherche de base comme exemple l'analyse phylogénétique et la recherche de gènes utiles, et pour la recherche appliquée comme la sélection assistée par marqueurs, les tests de paternité ainsi que la traçabilité alimentaire (**Khanem., 2012 ; Sabir et al., 2013**).

L'amélioration des plantes est basée sur l'utilisation de la variabilité génétique naturelle ainsi que les méthodes d'exploitation rapides de cette diversité dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent à la fois un diagnostic de la variabilité et la mise en place de stratégies rapides de création et de sélection variétale. Ils ont été utilisés dans le domaine de la connaissance des génomes végétaux et leur application à l'amélioration des plantes (**Konate, 2007**).

L'importance de la richesse de la diversité phoenicicole s'articule dans le maintien de l'équilibre écologique des écosystèmes et la conservation. La mise à profit d'outils moléculaires a

montré son apport dans le domaine de la connaissance des ressources génétiques phoenicicoles. Il s'agit par exemple de mettre en évidence de hauts niveaux de polymorphisme dans différentes régions du génome du palmier dattier, d'explorer les relations génétiques entre les cultivars et d'établir les empreintes génétiques, qui constitue une clé pour l'identification, du patrimoine phoenicicole donc une meilleure connaissance de la variabilité permet de l'élaboration d'une stratégie de lutte contre les maladies (Trifi et al, 2010).

3.3 Types des marqueurs

Les différents systèmes de marqueurs diffèrent dans le mécanisme de détection du polymorphisme, la couverture du génome et la facilité d'application (Adawi et al., 2005).

3.3.1 RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

Des variations dans la séquence de l'ADN vont permettre ou non à des enzymes de restrictions de couper l'ADN. Une telle enzyme reconnaît une séquence d'ADN et clive celui-ci sur les deux brins.

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction, permet une analyse directe du génotype. A présent, l'utilisation la plus courante des RFLP est en aval d'une amplification génétique (PCR-RFLP) pour détecter la variabilité des séquences nucléotidiques du génome à un site de restriction donné générées par les enzymes de restriction.

Un fragment d'ADN est d'abord amplifié en utilisant la PCR (polymerase chain reaction) et ensuite exposé à une enzyme de restriction spécifique qui coupe uniquement une des formes alléliques. Les amplicons digérés sont généralement résolus par l'électrophorèse (Konate, 2007).

3.3.2 SSR : Simple Sequence repeats

Les microsatellites, aussi appelés « simple sequence repeats » (SSR) et, occasionnellement, sequence tagged microsatellite sites (STMS) ou simple sequence repeat polymorphisms (SSRP) sont de courtes répétitions en tandem (généralement de 2 à 6 pb), répétées plusieurs fois en tandem (par ex. CACACACACACACA), très variables et distribués régulièrement le long du génome (Boudian et al, 2012). Ils sont mis en évidence par PCR en utilisant des amorces s'hybridant de part et d'autre du SSR (Hadjeer et al, 2006). Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse et le polymorphisme vient d'une variation dans la taille des fragments résultant d'une variation dans le nombre des répétitions. Les microsatellites sont l'un des marqueurs génétiques préférés chez les plantes car ils sont co-dominant, variables, abondants (Zehdi et al., 2004^a). Ils sont utilisés pour l'identification et l'analyse de pedigree, la caractérisation de la diversité du germoplasme et l'étude

des cartes génétiques. Plusieurs études sur le palmier dattier ont utilisé les marqueurs SSR, où ont révélé un polymorphisme élevé. Ils ont permis de montrer une diversité élevée dans le germoplasme du Soudan représentant 37 femelles et 23 mâles en utilisant 16 loci microsatellites (**Elshibli et Korpelainen., 2008**). 17 loci SSR ont été utilisés sur 31 cultivars et dans les clones des germoplasmes algériens et californiens ; cette méthode a prouvé que c'est un outil très efficace pour évaluer la diversité génétique chez le palmier dattier (**Akkak et al., 2009**). Récemment, 1000 marqueurs SSR ont été développés (**Hamwiah et al., 2010**). Sur base de 18 SSR, 96,11% de polymorphisme a été révélé entre 128 palmiers du Maroc (**Boudian et al., 2012**).

Quarante-neuf variétés locales venant de trois différentes oasis ont été analysées pour examiner leur diversité génétique (**Zehdi et al., 2004^b**). Un total de 16 SSR spécifiques pour le palmier dattier ont été testés, le degré de variabilité était relativement élevé et les variétés étaient facilement différenciées par 3 locus. Les SSR ont été utilisés pour élucider la relation des sous-populations de 26 variétés tunisiennes, évaluer et caractériser leur niveau de diversité, où une grande diversité génétique a été remarquée spécialement pour les caractères de reproduction (**Hammadi et al., 2011**). Quinze marqueurs microsatellites et un marqueur mini-satellite de chloroplaste ont été appliqués afin d'évaluer la position taxonomique au Cap vert de *P. atlantica* par apport au *P. dactylifera*, *P. canariensis* and *P. sylvestris* (**Henderson et al., 2006**).

28 889 séquences d'ADN ont été analysées pour caractériser le génome du palmier dattier ainsi que pour évaluer et comparer la fréquence et la distribution des microsatellites : les plus communs étaient les SSR trinucleotides (69,7%) et les motifs répétés AG (85.7%) étaient les plus abondants pour les dinucleotides (**Zhao et al., 2013**). Les auteurs confirment qu'ils sont des outils utiles pour étudier la diversité génétique et la sélection génétique basée sur les marqueurs moléculaires.

Quinze différents cultivars du palmier dattier cultivés au Qatar ont été analysés pour leur diversité génétique en utilisant des marqueurs ISSR (voir ci-après) et SSR, un total de 204 allèles ont été détectés (**Ahmed et Al-Qaradawi., 2010**).

3.3.3 ISSR : Inter Simple Sequence Repeats

La technique ISSR implique l'amplification des fragments d'ADN, présents à une distance amplifiable entre deux séquences SSR identiques orientées en sens opposé. La technique utilise généralement des amorces de 16 à 25 bases qui s'hybrident au niveau des séquences de microsatellites. Ce sont des marqueurs dominants (**Khanam et al., 2012**). Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse et le polymorphisme dans la taille des fragments amplifiés (200 à 2500 pb) est observé. Les fragments amplifiés sont donc les régions entre les microsatellites. Cette technique utilise une seule amorce PCR ce qui la rend moins coûteuse. Elle

est rapide, reproductible et facile à optimiser. Cette technique a été largement appliquée dans l'étude de la variabilité génétique des plantes et la caractérisation de certains organismes fongiques (**Konate, 2007**).

Parmi les études réalisées, 200 amorces ISSR ont été utilisées sur des pieds mâles et femelles afin d'identifier un marqueur spécifique lié au sexe, le résultat a mis en évidence deux marqueurs IS.A02 produit chez la femelle avec 390 pb, IS.A71 produit unique chez le mâle avec 380 pb (**Al-Ameri et al., 2016**).

Soixante dix sept marqueurs polymorphes étaient suffisants pour évaluer la diversité génétique et estimer la distance entre les 12 cultivars en utilisant sept amorces (**Zehdi et al., 2004^a**). De même, l'ISSR a servi pour évaluer la diversité génétique de 34 cultivars tunisiens (28 femelles et 6 mâles), sept amorces différentes ont généré 67 marqueurs moléculaires, ce qui fournit des preuves supplémentaires de la diversité génétique à grande échelle parmi les écotypes de palmiers dattiers tunisiens et soutient fortement l'origine de la domestication mésopotamienne (**Zehdi et al., 2005**).

3.3.4 AFLP: Amplified fragment length polymorphism

Le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) est une technique qui détecte les fragments de restriction d'ADN par l'amplification PCR. Ce sont des marqueurs bi alléliques dominants (**Vos et al., 1995**). Les variations sur de nombreux loci peuvent se combiner simultanément pour détecter les mutations ponctuelles de régions génomiques inconnues. L'inconvénient c'est qu'elle montre un mode dominant d'hérédité, ce qui réduit leur pouvoir lors des analyses génétiques de la population sur la diversité intra-raciale et la consanguinité, coûteuse.

Par ailleurs, certains auteurs ont conclu que l'AFLP constitue une technique efficace et fiable pour les études de l'évolution et l'analyse phylogénétique, l'analyse de paternité et le génotypage des plantes (**Konate, 2007**). Elle a été utilisée chez le palmier dattier pour la construction de cartes génétiques en Jordanie (**El-Kharbotly et al., 1998**), L'AFLP a été utilisée pour montrer que le cultivar Majhoul n'est pas uniforme génétiquement et dérive d'un mélange de génotypes qui a évolué par sélection naturelle (**Elhoumaizi et al 2006**). La relation et la diversité génétique de 18 variétés d'Irak, un total 122 locus polymorphes ont été détectés avec une moyenne de 17.4 locus polymorphes par amorce de combinaison (**Jubrael et al 2005**). L'AFLP s'est montré très efficace dans la détection de haut niveau de polymorphisme (45,8%) de six variétés récoltées en Egypte. Le seul inconvénient de cette technique est la dominance car elle détecte rarement l'hétérozygotie et est caractérisée par la présence/l'absence du polymorphisme (**Adaway et al., 2005**).

Une étude utilisant 6 amorces AFLP et 13 amorces ISSR a investigué la relation entre dix palmiers cultivés en Arabie Saoudite, où le taux de polymorphisme était de 85% pour ISSR contre

76% pour AFLP (**Sabir et al., 2013**). Dans le but d'évaluer la diversité moléculaire de plus de 250 écotypes tunisiens, deux méthodes moléculaires : AFLP et RAMPO (Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms=ISSR+RAPD) ont été utilisées, ce qui a révélé une large diversité génétique où l'AFLP semble être plus informative que RAMPO (**Rhouma et al., 2013**).

3.3.5 SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Il s'agit de mutations ponctuelles (un nucléotide remplacé par un autre nucléotide). Les SNP sont utilisés comme alternative aux microsatellites dans les études de diversité génétique. Ce sont des variations des nucléotides simples qui ne changent pas la longueur globale de la séquence d'ADN. Ils se produisent partout dans le génome, sont très abondants, dans le génome humain on trouve un SNP chaque 1000 pb. La plupart d'entre eux sont localisés dans les régions non codantes et n'ont aucun impact direct sur le phénotype de l'individu. Ils sont devenus un outil de choix pour plusieurs applications grâce aux milliers de marqueurs qui peuvent être évalués simultanément (**Kharb et al., 2020**). Il existe de nombreuses méthodes développées pour détecter les SNP : PCR en temps réel, extension d'amorce, séquençage (**Kwok et Chen., 2003**).

3.3.6 RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA

Le polymorphisme d'ADN amplifié au hasard ou RAPD est produit par la technique de PCR en amplifiant l'ADN génomique avec des amorces courtes (10 nucléotides). Le principe repose sur le fait que si la séquence des génomes est différente, les amorces vont s'hybrider à des endroits différents du génome ce qui après amplification et électrophorèse générera des fragments de tailles différentes (**Khanam et al., 2012**). Plusieurs travaux sur le palmier dattier ont été réalisés en Egypte : une étude phylogénétique entre trois plants mâles et deux femelles a montré que 39 bandes étaient polymorphes sur un total de 56 (**Heiba et al., 2015**) ; la comparaison de six génomes mâles et femelles et l'identification du génotype inconnu par un test de parenté en associant les techniques de RAPD et d'ISSR (**Moghaieb et al., 2010**). La similitude entre quatre variétés femelles et quatre cultivars mâles inconnus était de 87,5 à 98,9% (**Soliman et al., 2003**). Seize amorces ont donné 115 bandes reproductibles pour différencier entre 3 génotypes de l'Arabie Saoudite, où le taux de similarité été 81 et 87% (**El Rayes., 2009**). 30 amorces ont été utilisées pour caractériser 5 cultivars de la Jordanie (**Rawashdeh., 2006**). Le pourcentage du polymorphisme de RAPD été plus élevé (39,77%) que l'ISSR (23,07%) pour 8 dattiers cultivés en Inde (**Srivastav et al., 2013**).

Une autre étude a été réalisée en Syrie sur la détermination des relations génétiques entre 23 cultivars (18 femelles et 5 mâles) qui confirme que le polymorphisme détecté par RAPD (58,5%) était supérieur à celui observé pour ISSR (50,6%) (**Haider et al., 2012**).

Une combinaison RAPD-PCR et SSR-PCR a été menée pour l'intégration d'une approche morphologique et moléculaire afin d'identifier, caractériser et évaluer la diversité génétique de neuf cultivars femelles de l'Égypte à travers la forme, les dimensions et la couleur du fruit, où les SSR ont révélé un haut niveau de polymorphisme (11.42%) par rapport au RAPD (6.60%) (**Eissa et al., 2009**).

Une autre recherche a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité du RAPD dans le but de différencier entre *P. canariensis* de *P. dactylifera* et identifier les hybrides des deux espèces (**Gonzalez-Perez et al., 2004**).

Une bande spécifique des plants femelles a été trouvée en RAPD pour l'identification du sexe chez les descendants de différents croisements. Cette technique s'avère nécessaire pour le gain de temps, l'économie de moyens et la réduction des espaces expérimentaux (**Zaher et al., 2006**). Cette technique pourrait être utilisée efficacement pour étudier la diversité génétique du palmier dattier. La RAPD n'est cependant pas une méthode reproductible étant donné qu'elle dépend des conditions de la PCR et notamment de la Taq polymérase utilisée. Ça reste cependant une bonne technique pour les études au sein d'un même laboratoire dans les mêmes conditions.

Chapitre III :
Composition chimique et activités biologiques

1 Introduction

A travers les expériences au fil des années, l'être humain a appris à combattre diverses maladies au moyen des remèdes naturels.

Il est aujourd'hui largement reconnu que le monde végétal constitue la source majeure de médicaments. La valorisation de ces plantes, et particulièrement du palmier dattier, a attiré l'attention des chercheurs, ces dernières années. Il s'agit d'identifier et d'isoler de nouvelles substances naturelles bioactives à effet thérapeutique dont l'application peut s'étendre à des domaines comme la pharmacologie, la microbiologie médicale et clinique, la phytopathologie et la conservation des aliments (**Kahouli, 2010 ; Mokhtarpour, 2014**).

En effet, la communauté scientifique a mené de nombreux travaux scientifiques pour étudier les plantes médicinales en recherchant les molécules actives dotées d'activité biologique. En effet, les pennesont un potentiel antifongique, antioxydant, anti-inflammatoire et antidiabétique (**Abuelgassim, 2020**) grâce à la teneur en polyphénols connue pour leurs multiples effets bénéfiques, ils ont prouvé qu'ils sont des produits médicinaux prometteurs préventifs du stress oxydatif, des maladies et qu'ils concourent au maintien de la santé humaine.

L'évaluation des propriétés anti-oxydantes, et antimicrobiennes demeure une étape très intéressante et utile pour la bonne utilisation des parties de cette plante qui représente une nouvelle source des composés bioactifs.

2 Les polyphénols

2.1 Définition

Le terme *polyphénol* a été introduit en 1980, en remplacement du terme ancien ; *tanin végétal*. Ce sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation, ils ont été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes (**Mohammedi, 2013**).

Ce sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005) et dans toutes les parties des plantes avec une répartition variable entre les différents tissus. Ils constituent un groupe complexe de molécules avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés à un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993) in (**Bessas et al., 2008**).

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

Ils sont présents dans diverses substances naturelles : sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, et sous forme de catéchines comme l'epigallocatechin-3-gallate dans le thé vert, de quercétine dans les pommes, les oignons (**Laouini, 2014**).

2.2 Rôles des polyphénols

Les antioxydants intéressent à la fois les scientifiques de l'alimentation et les professionnels de la santé, vu leur rôle dans l'alimentation et leur impact sur la santé humaine.

La richesse en composés phytochimiques et l'activité antioxydante des fruits et légumes ont été rapportées dans plusieurs études qui ont montré que cette dernière est peut-être due aux polyphénols. Ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales en plus de leur importance dans le mécanisme de défense des plantes, ils affectent aussi la qualité, la couleur, et le goût des fruits. Protègent l'aliment de détérioration oxydative (**El-Rayes, 2009 ; Kriaa et al., 2012**).

Ils participent aux réactions de défense face au stress biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotique (lumière, rayonnements UV, faible température, carences) (**Boubekri, 2014**).

2.3 Classification des composés phénoliques

Il existe différentes classes de polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus réponsus sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Bessas et al., 2008**).

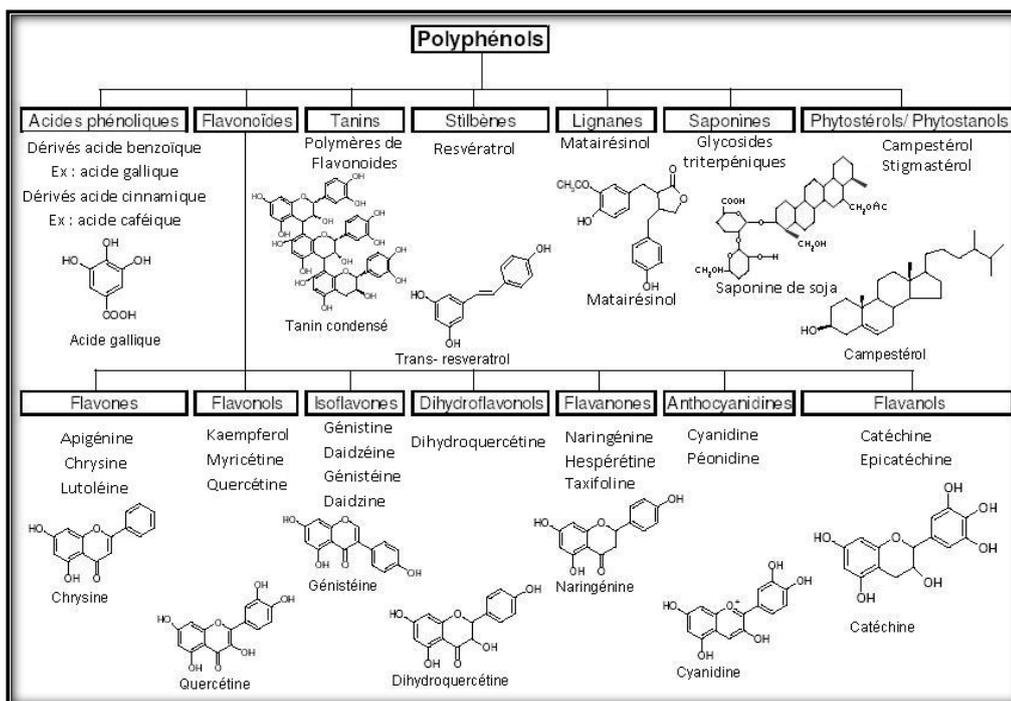


Figure 12: Les différentes classes des composés phénoliques

2.3.1 Les acides phénoliques

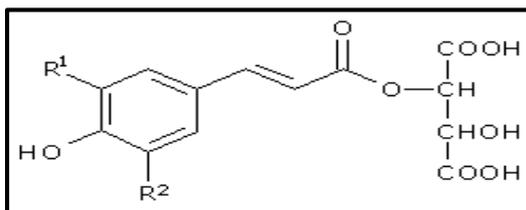
Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2005). Ils sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone. Les acides phénoliques sont principalement représentés dans la variété de dattes Deglet Nour par la présence de l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine (Singleton et Timbreuse 1978).

2.3.1.1 Les acides benzoïques

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, caryngiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques (Ribereau, 1968).

2.3.1.2 Les acides cinnamiques

Ils possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique (fig.13) (Ribereau, 1968 ; Goetz et al., 1999)



Esters hydroxycinnamiques	R₁	R₂
Acide t-caféique	OH	H
Acide p-coumarique	H	H
Acide t-fertarique	OCH ₃	H
Acide t-sinapique	OCH ₃	OCH ₃

Figure 13: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamiques.

2.3.1.3 Les coumarines

On peut considérer que les différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Ce sont des composés phénoliques cyclisés : des hétérocycles oxygénés dont leur structure de base est le benzo-2-pyrone (**Boubekri, 2014**).

Les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent, respectivement, aux acides : p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnétine (**Bessas et al., 2008**), ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes, utilisées pour leurs propriétés vasculo-protectrices (mélilot, *Melilotus officinalis* L.) Pallas ; marronnier d'Inde, *Aesculus hippocastanum* L.), neurosédatives (aspérule odorante, *Galium odoratum* (L.) Scop.), diurétiques (piloselle, *Hieracium pilosella* L.), stomachiques et carminatives (angélique, *Angelica archangelica* L.). Ils contribuent à fluidifier le sang et soignent les affections cutanées (**Mohammedi, 2013**). Les coumarines, les flavonoïdes et les tanins sont les plus répandus au niveau des penes des végétaux in (**Makroui, 2010 ; Laouini, 2014**).

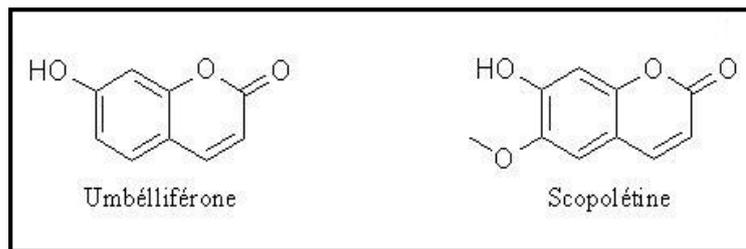


Figure 14: Structure chimique de quelques coumarines (Dean, 1963).

2.3.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin *flavus*, jaune), rassemblent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, présentent dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, pennes, fleurs, pollens, fruits, graines, bois (Guignard (1996) ; Larson, 1988 in El-Rayes 2009). Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont des pigments naturels, dissoutes dans la vacuole, responsables des colorations les chlorophylles (couleur verte), jaune, orange et rouge (Laouini, 2014).

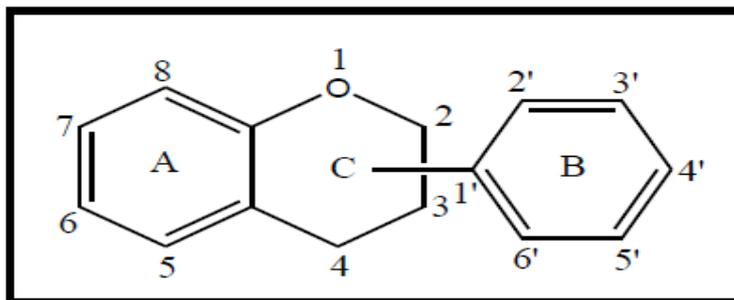


Figure 15: Structure de la base des flavonoïdes (Bessas et al, 2008)

2.3.2.1 Propriétés et rôle des flavonoïdes

Leur principale fonction semble être la coloration (Gabor, 1988), mais ce sont aussi, des agents antioxydants capables de piéger, d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (C3-OH), de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance, cette propriété leur a valu le nom de «vitamine P». Ils sont capables d'inhiber le processus de la carcinogenèse mis en œuvre par des mutations engendrées par l'altération de l'ADN.

En plus, ils inhibent l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales. Ce sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldol réductase, de la protéine kinase C et des enzymes de l'inflammation (Mohammedi, 2013).

2.3.2.2 La structure

Ils peuvent se diviser, selon leurs structures, en six classes chimiques : flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, chalcones et anthocyanidines (Medic et al, 2004). Ils ont une origine biosynthétique commune, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbone constituée de deux unités aromatiques, de cycle en C₆ (A et B), reliées par une chaîne en C₃.

2.3.2.2.1 Les flavonols

Ils sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3, (Boubekri, 2014). Ils sont largement répandus et incolores, ceux qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère. Parmi les flavonols les plus répandus, on trouve : le kaempferol (OH en 4', 5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5, 7) sont incolores ; le myricétol et l'isorhamnétol (Bessas et al, 2008).

2.3.2.2.2 Flavanols

Ils sont caractérisés par l'absence du groupe carboxyle en C4 et hydroxylé en C3, ils sont très abondant dans les fruits et légumes comme les abricots, les cerises, les raisins, mais la source la plus riche est au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé qui contient principalement de la (-)-épicatéchine, de la (-)-épigallocatechin-3-O-gallate et de la (-)- épigallocatechine (Boubekri, 2014).

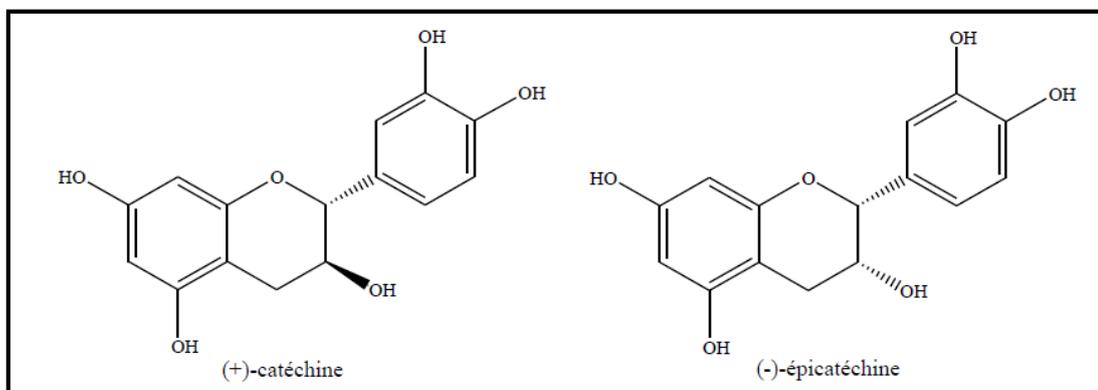


Figure 16: Structures chimiques des flavanols

2.3.2.2.3 Les flavanones

Ils ne comportent pas des groupements OH en position 3, et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Ils sont responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citrons, orange ; les plus connus sont : la naringénine, l'héspéridine. (Alais et Linden, 1997) in (Bessas et al., 2008).

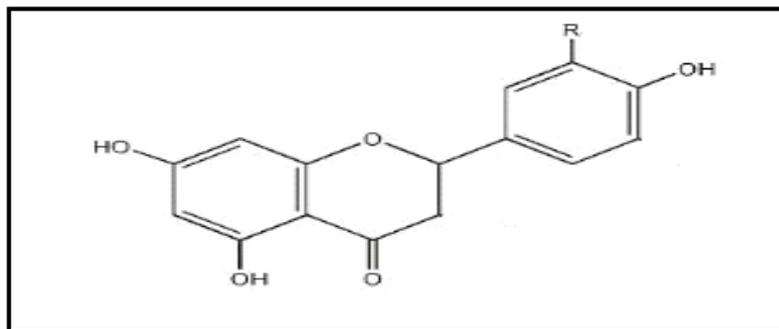


Figure 17: Structures chimiques des flavanones (*Bessas et al, 2008*)

2.3.2.2.4 Flavones

Ils sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (**fig. 18**). Elles sont représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes (**Boubekri, 2014**).

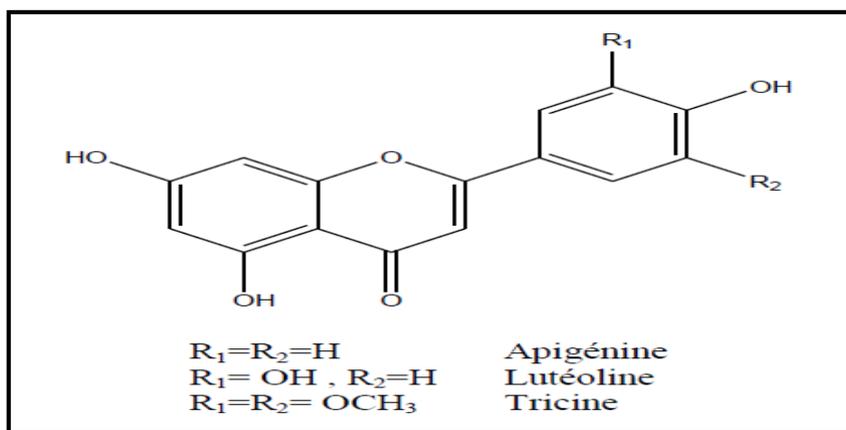


Figure 18: Structures chimiques des Flavones (*Bessas et al, 2008*)

2.3.2.2.5 Isoflavones

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoides. Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2 (**fig.19**). Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal (**Boubekri, 2014**).

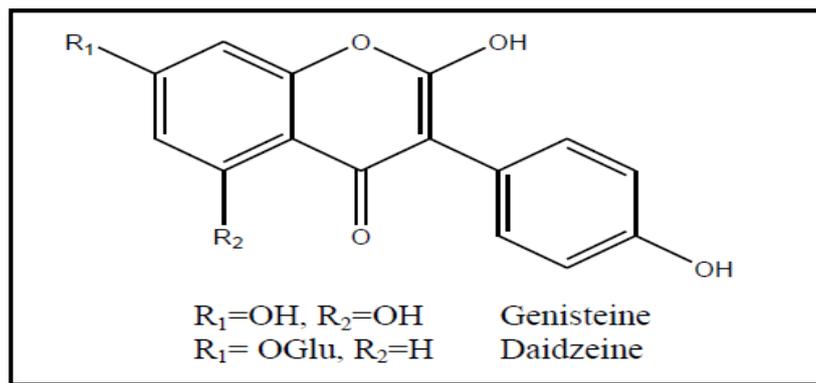


Figure 19: Structures chimiques des Isoflavones (Bessas et al, 2008)

2.3.2.2.6 Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*= fleur et *Kuanos*= bleu violet), sont des pigments hydrosolubles (**Boubekri, 2014**). Colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange, appelé cation flavylium, ce qui rend leur présence détectable à l'œil nu, on les trouve également dans les racines, tiges, pennes et graines. Ils jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes. En automne, les couleurs caractéristiques des pennes des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bessas et al, 2008**).

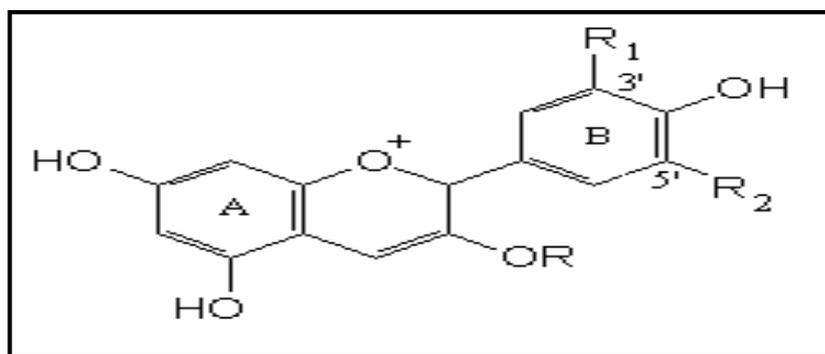


Figure 20 : Structure de quelques anthocyanidine (Ribereau, 1968).

2.3.3 Les tanins

Ce sont des substances d'origine organique à haut poids moléculaire, fortement hydroxylées trouvées dans toutes les parties des végétaux (écorces, racines, raisin, pennes, datte, café, cacao etc...), leur structure est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992 ; Bessas et al., 2008**).

On distingue chez les végétaux supérieurs deux groupes les tanins, les hydrolysables et les condensés. On note leur accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique, en jouant un rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites, ils ont aussi la propriété de rendre la peau imputrescible (**Boubekri, 2014**). Ils ont démontré leurs actions

inhibitrices de l'auto-oxydation de l'acide ascorbique et de la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes, ils sont capables de stopper les hémorragies, de lutter contre les infections, ils ont des activités antimutagènes. Le gallate d'épigallocatechine semble responsable de leurs propriétés anticancéreuses (**Mohammedi, 2013**).

2.3.4 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par double liaison, Le resvératrol et le ptérostilbène sont des composés synthétisés par la plante un à la suite d'un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action de stilbène oxydase et les peroxydases, sont peu répandues chez les végétaux ; l'apport alimentaire le plus important de ceux-ci c'est chez le raisin (**Daas, 2009**).

2.3.5 Les lignanes

Ce sont des composés dont les deux noyaux phénoliques sont reliés par quatre atomes de carbone, souvent se trouvent dans le bois des Gymnospermes et dans les tissus soumis à lignification chez les

Angiospermes. Les graines de lin sont la source la plus importante de lignanes viennent ensuite : les lentilles, les haricots blancs, les graines de céréales et certains légumes (**Mazur et al, 1998 ; Stark et al, 2002 in Daas, 2009**).

2.3.6 Les saponines

On désigne sous ce nom une vaste famille de glycosides tri terpéniques ou stéroïdiens qui se trouvent dans de nombreuses plantes. Ils sont composés de deux parties :

- Une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres, eux-mêmes de nature variée,
- Une partie aglycone et lipophile (dite sapogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde.

On trouve les saponines dans le soja, l'ail, les haricots blancs, les épinards, les tomates, les pommes de terre, les graines d'avoine, la luzerne (**Daas, 2009**).

2.4 Méthodes d'analyse

2.4.1 HPLC

L'HPLC pour High Pressure (ou High Performance) Liquid Chromatography est une méthode de chromatographie en phase liquide utilisant des billes de taille réduite pour réduire les phénomènes de diffusion mais qui implique d'utiliser des pressions élevées pour faire passer le liquide à travers la colonne.

Les méthodes analytiques sont utilisées pour fournir des renseignements sur les caractéristiques des aliments, y compris leur composition, leur structure, leurs propriétés physicochimiques et leurs attributs sensoriels.

Actuellement, plusieurs méthodes et techniques ont été adoptées pour la séparation, l'identification, la quantification et l'isolement des polyphénols, sans difficultés insurmontables, des molécules autrefois inaccessibles (**Le Cleach, 2015**). Leur purification, leur caractérisation ainsi que la détermination de leur structure, est devenue, de plus en plus, aisée grâce à l'exploitation des procédures et des techniques de chimie analytiques, en particulier, la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV (HPLC-UV) ou couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS), la détection électrochimique (ECD), la spectrométrie de masse par ionisation, la chromatographie gazeuse couplée à une MS, ont permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince (**Mokhtarpour et al., 2014**), sont devenues les méthodes instrumentales les plus populaires pour l'analyse des aliments et la détermination des composés de divers groupes chimiques (**Cacciola et al, 2020**).

L'union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) définit la chromatographie comme suit : La chromatographie est une méthode physique de séparation dans laquelle les composés à séparer sont répartis entre deux phases, dont l'une est stationnaire (phase stationnaire), tandis que l'autre (la phase mobile) se déplace dans une direction définie.

Le profil phénolique des noyaux de dattes des Émirats arabes unis et d'Algérie a été caractérisé en utilisant respectivement l'UPLC-DAD-ESI-MSⁱ et LC-DAD-MS (ESI et ESI+) (**Habib et al., 2013 ; Messaoudi et al., 2005**).

Dans un récent rapport, 53 composés phénoliques ont été caractérisés dans la chaire, la peau, les pennes, le pollen du cultivar Madjhoul cultivé en Palestine. 33 ont été décrits pour la première fois comme les glycosides de kaempferol et le malonyl à l'aide de HPLC-DAD-ESI/MS en mode d'ionisation négative (**Abu-Reidah., 2017**).

La bioaccessibilité des polyphénols des noyaux de datte a été évaluée pour l'usage humain. C'est le premier rapport sur la présence de composés N1, N4-dicaffeoyl spermidine, N1, N8-dicaffeoyl spermidine et pyrogallol dans les noyaux de dattes et sur le fait que les procyanidines

ⁱ ultra-high-performance liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry (UPLC-DAD-MS) Electrospray ionization (ESI)

polymériques atteignent le côlon sans changement pour le métabolisme microbien intestinal (**Hilary et al., 2020**).

Une exploitation du profil métabolomique pour la découverte de bio-marqueur du cancer pour le diagnostic des malignant pleural effusions en utilisant chromatographie liquide tandem masse spectrométrie (LC-MS/MS) (**Lam et al., 2014**).

Le système Q-TOF LC/MS et UHPLC ont été utilisé pour identifier les composés phénoliques de sept variétés d'orge cultivées en Australie (**Rao et al., 2018**).

2.4.2 Principe

L'échantillon à analyser est injecté et introduit puis poussé par un liquide appelé phase mobile, à l'aide d'une pompe sous haute pression, suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique, en sortie et grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont caractérisés par des pics appelés chromatogramme et inégalement retenus ce phénomène appelé rétention où leurs vitesses de déplacement sont différentes. Chaque substance de la solution à analyser, a une affinité relative pour la phase stationnaire et pour la phase mobile, si l'affinité est la plus grande pour la phase stationnaire, le composé sera retenu par la colonne dans le cas contraire, le composé restera dans la phase mobile. Cette différence d'affinité pour chaque composé se traduira par une sortie plus ou moins rapide de la colonne.

2.4.3 Notions fondamentales

2.4.3.1 La phase stationnaire

Est un support solide (billes) plus ou moins poreux recouvert d'un gel qui a les propriétés de retenir ou de freiner les molécules de solutés.

2.4.3.1.1 La phase normale

Est constituée de gel de silice, très polaire, donc on utilise un éluant apolaire. Les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

2.4.3.1.2 La phase inverse

Dans la chromatographie en phase inverse, on utilise généralement des billes de silice greffée avec des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18), ce qui les rend apolaires et on choisit un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, les composés polaires sortiront en premier de la colonne et les composés apolaires seront retenus.

2.4.3.2 La phase mobile (éluant)

C'est le liquide qui transporte les solutés à travers la colonne, les plus utilisés sont des mélanges d'eau et d'un solvant organique miscible (acétonitrile, méthanol) ou des combinaisons de solvants organiques (alcools, hexane, dichlorométhane...).

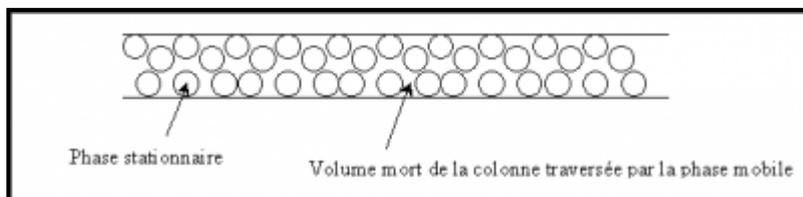


Figure 21: Schéma de la phase stationnaire

2.4.3.3 Notion de temps

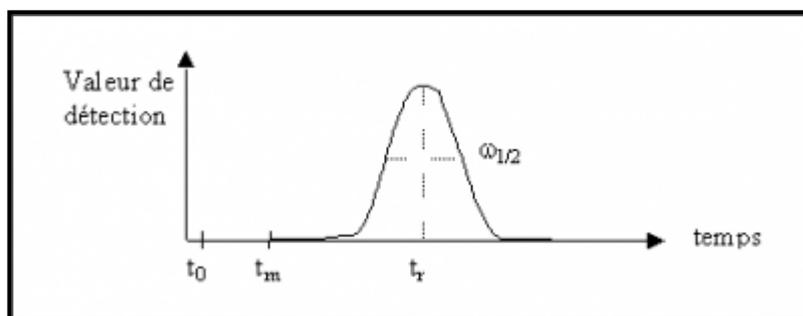


Figure 22: Schéma de la phase stationnaire et notion de temps de rétention

t_0 est le temps du début de l'injection

- Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est en fonction de la quantité du constituant.

2.4.3.4 Notion d'efficacité

L'efficacité de la séparation est mesurée par la largeur d'un pic, plus le pic est fin et haut plus la chromatographie est efficace est plus facile à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas. Elle est en fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

2.4.4 Appareillage

2.4.4.1 Réservoir de la phase mobile

Ce sont des bouteilles en verre contenant le solvant dans lequel plonge un tube avec une extrémité filtrante en téflon le dégazage est nécessaire par agitation puis conservation du solvant sous atmosphère d'hélium, Plusieurs flacons sont préparés pour réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables).

2.4.4.2 Pompe

Elle délivre en continu la phase mobile, elle est définie par la pression qu'elle permet d'atteindre dans la colonne, son débit, et la stabilité du flux où :

- * débit : 0,01 à 10 mL/min
- * stabilité < 1% (< 0,2% pour des chromatographies d'exclusion diffusion)
- * pression maximale > 350 bars.

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant utilisé, elle travaille en 2 modes :

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

2.4.4.3 Injecteur

Le type d'injecteur le plus utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe (10, 20, 50 μ L). Cette boucle permet d'introduire l'échantillon dans la colonne, elle possède 2 positions, la première permet le remplissage de la boucle d'injection d'un volume fixe (load) à l'aide d'une seringue, la seconde permet la mise en circulation de l'échantillon dans le système chromatographique. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration des produits à analyser, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile.

2.4.4.4 La Colonne

Est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. En mode analytique, le remplissage des colonnes en inox généralement (en silice, silice greffée ou particules polymériques) avec un diamètre de 4,6mm, la longueur de 5-25cm et une granulométrie de 3, 5, ou 10 μ m peut contenir des "granulés" poreux ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire) elle permet une meilleure séparation des composants.

2.4.4.5 Détecteurs

Il existe plusieurs types de détecteurs : réfractomètre différentiel, UV à barrette de diodes, électrochimique et fluorimétrique mais le plus utilisé est le spectrophotomètre d'absorption UV-visible (190-600 nm), il est relié à la sortie de colonne, le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

2.4.4.6 Intégrateur

L'intégration consiste à mesurer la surface sous un pic elle dépend de la largeur attendue des pics et le seuil d'intégration (sensibilité). Le pic est alors découpé en tranches Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic (**Anonyme, 2010**).

2.5 Chromatographie 2D

Elle est largement appliquée dans l'analyse des aliments et des produits naturels, en raison de la grande variabilité des molécules bioactives avec des poids moléculaires, polarités et structures similaires.

Dans de nombreux cas, la chromatographie liquide unidimensionnelle (¹D-LC) est incapable de séparer des mélanges complexes, l'emploi de combinaisons de colonnes pourrait être une alternative valable avec différents mécanismes de séparation. La chromatographie liquide bidimensionnelle représente un outil précieux et puissant pour l'analyse des échantillons très complexes par l'emploi de combinaisons de colonnes « orthogonales », le plus souvent, utilisé pour la quantification d'un petit nombre de composés sélectionnés. (**Cacciola et al, 2020**). C'est une technique basée sur la réalisation de deux séparations chromatographiques, elle consiste à transférer tous les composés de l'échantillon entre (¹D) et (²D). Tout d'abord, une séparation est effectuée, dans la première dimension (¹D), les fractions obtenues après l'élution seront collectées à différents moments et traitées, dans une séparation supplémentaire dans la deuxième dimension (²D) où la colonne présente un mécanisme de rétention différent de celui de la colonne ¹D (**Peter et al, 2015 ; Vergara-Barberán et al, 2020**). En raison de la différence de sélectivité des colonnes utilisées, il est possible que les pics se chevauchant dans le chromatogramme obtenu dans la première dimension soient séparés dans celui obtenu dans la seconde (²D) en tenant compte des propriétés physiques des composés dans les échantillons étudiés (**Peter et al, 2015**).

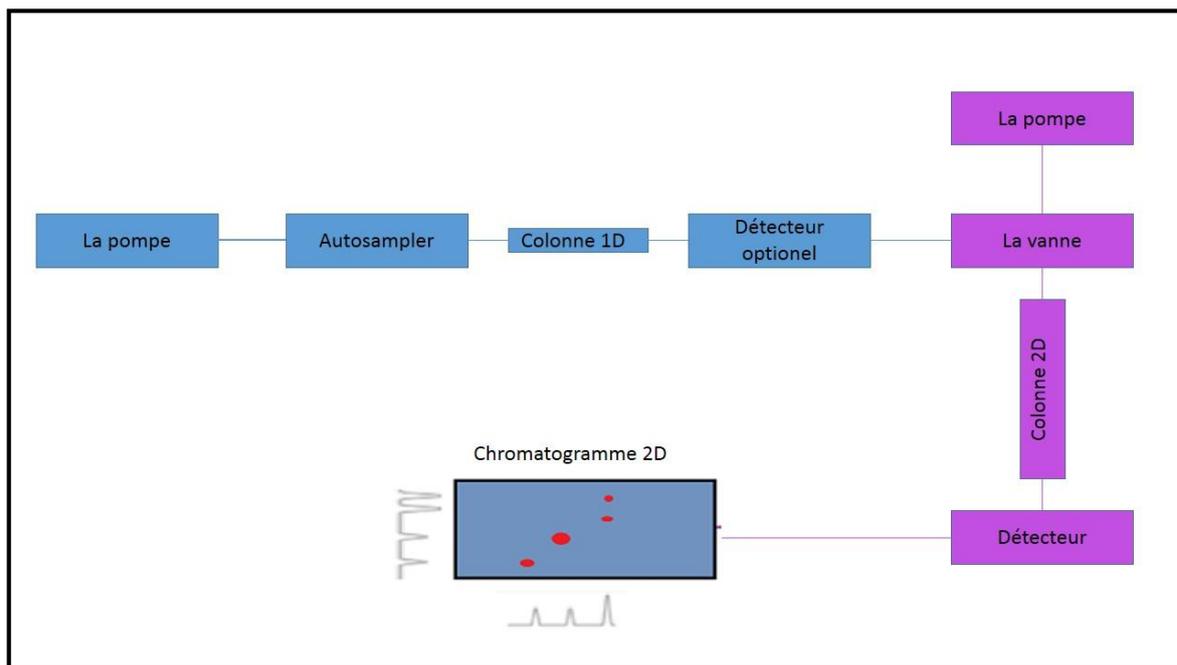


Figure 23: Schéma général d'un système de chromatogramme ²D (Gutierrez, 2021)

Lors de l'utilisation de la ²D-LC, deux paramètres doivent être pris en considération : la capacité de pic et le gradient d'élution. La capacité de pic est définie comme le plus grand nombre de pics obtenus dans un intervalle de temps équivalent à la différence entre les temps de rétention du dernier et du premier pic du chromatogramme. Cette capacité est augmentée par l'utilisation d'une élution graduée (où la proportion de solvants de la phase mobile varie au cours de la séparation), par opposition à l'utilisation d'une élution isocratique (où la composition de la phase mobile reste constante pendant la séparation). Bien qu'il soit à noter que, lors d'une élution en gradient, l'équipement et la colonne nécessitent, à la fin de chaque séparation, une étape de rééquilibrage au cours de laquelle ils retrouvent les conditions initiales (Peter et al, 2015).

Les données ²D-LC sont représentées dans un chromatogramme. La figure 24 illustre un chromatogramme obtenu à la séparation d'un mélange d'étalons de polyphénols (Gutierrez, 2021)

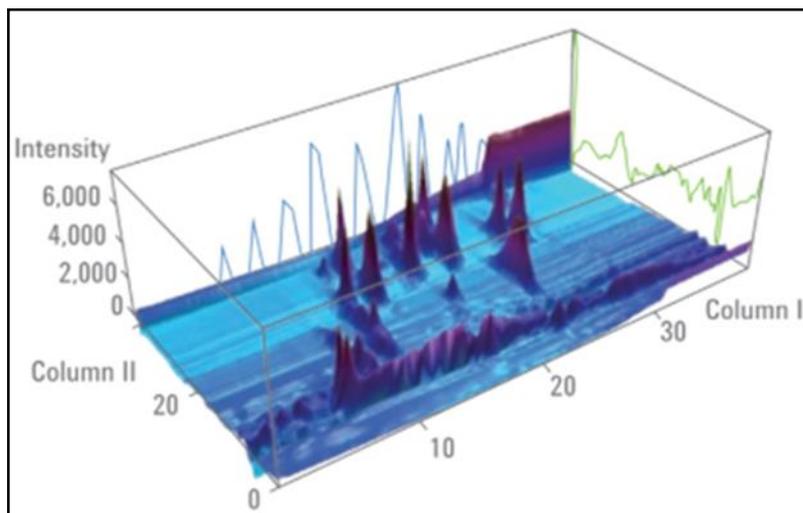


Figure 24: Chromatogramme obtenu dans la séparation des étalons polyphénols (Gutierrez, 2021)

Diverses applications de la 2D-LC ont été décrites, notamment l'analyse de produits naturels (comme les huiles essentielles) (Dugo et al, 2006), l'analyse biopharmaceutique (par exemple d'anticorps monoclonaux) (Koen et al, 2015), l'analyse chimique de différents composés présents dans les denrées alimentaires et les boissons (Mondello et al., 2005) ; (Kivilompolo et al., 2008), en soulignant la détermination des polyphénols dans divers échantillons tels que le vin et le jus.

(²D-LC) couplée avec DAD, a également été appliquée avec succès pour l'analyse des profils de polyphénols dans les échantillons d'aliments comme les pennes et la chair d'olivier ainsi que trois variétés du miel de différentes origines génétiques venant de l'Espagne (Vergara-Barberán et al., 2020 ; Gutierrez., 2021), et des fruits mûrs et pas mûrs du guabiroba de Brazil (Arcari et al., 2020).

Elle a été mise au point pour la valorisation de tiges de vigne en raison des difficultés liées à l'énorme variabilité chimique, où les colonnes C18 ont produit les meilleurs résultats, permettant la caractérisation du profil (poly)phénolique. Ainsi, 81 composants distincts ont été détectés dans les échantillons (Montero et al., 2018).

2.6 Analyse discriminante linéaire (LDA)

La Linear Discriminant Analysis (LDA) est une méthode d'analyse de classification supervisée qui repose sur le développement des modèles capables de prédire l'appartenance d'un objet à une catégorie à partir de ses caractéristiques. La matrice de données avec laquelle vous travaillez contient au moins une variable catégorique, qui indique la catégorie à laquelle appartient chaque objet et qui constitue la réponse ou la variable à prédire, et une ou plusieurs variables d'échelle décrivant d'autres caractéristiques des objets et utilisées comme variables prédictives (García, 2011).

Pour le développement du modèle, il est nécessaire de disposer d'un échantillon d'objets dont la catégorie est connue et pour lesquels les valeurs prédictives sont également connues. L'assignation des objets aux catégories doit être exhaustive (tous les objets appartiennent à une catégorie) et mutuellement exclusive (aucun objet n'appartient à plus d'une catégorie). Ces objets forment l'ensemble d'entraînement, avec lequel le modèle de classification est construit. Une fois construit, le modèle est utilisé pour prédire la catégorie de nouveaux objets à partir de la mesure des prédicteurs. La prédiction d'un ensemble d'évaluation permet de valider le modèle, qui sera ensuite appliqué pour prévoir la catégorie des échantillons d'essai (**García, 2011**).

Dans l'ADL, on utilise un algorithme qui prédit des fonctions ou des vecteurs discriminants, c'est-à-dire des combinaisons linéaires de variables manifestes qui maximisent la variance entre catégories tout en minimisant les variances intra-catégories. Pour construire le modèle, vous devez assigner les objets de l'ensemble d'entraînement à une catégorie donnée. Pour ce faire, une variable catégorique est ajoutée à la matrice de données et contient autant de catégories que nécessaire. Le LDA estime les coefficients a_1, a_2, \dots, a_m de la fonction discriminante linéaire, f , qui est capable de prédire l'appartenance des objets à l'une ou l'autre catégorie :

$$f = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_mx_m$$

Les fonctions discriminantes sont construites une à une, en recherchant les directions de l'espace qui font maximaliser l'expression :

$$\lambda' = \frac{SC_D}{SC_I}$$

où SC_D est la somme des carrés des distances euclidiennes entre les objets appartenant à différentes catégories dans la direction indiquant la fonction discriminante, et SC_I est la somme des carrés des distances euclidiennes entre les objets appartenant à la même catégorie, également dans la direction de la fonction discriminante. De q catégories on obtient $q-1$ fonctions discriminantes (bien que si le nombre de variables prédictives, N , est inférieur à q , on obtient $N-1$ fonctions discriminantes). Les fonctions discriminantes sont obtenues dans l'ordre décroissant de leur valeur λ' , et en maintenant l'orthogonalité entre elles.

La fonction λ' n'est pas limitée, de sorte qu'elle varie considérablement avec le nombre d'objets et la séparation entre eux. Par conséquent, au lieu de maximiser λ , (lambda de Wilks), définie comme :

$$\lambda_w = \frac{1}{1 + \lambda'} = \frac{SC_I}{SC_I + SC_D}$$

Cette fonction prend des valeurs entre 0 et 1. Catégories avec une séparation nette donnent des valeurs λ_w proches de 0, tandis que les catégories largement superposées donnent des valeurs λ_w proches de l'unité

L'une des étapes fondamentales dans la construction de modèles LDA est la sélection des variables prédictives à inclure. Le modèle doit inclure une seule variable prédictive pour représenter chacune des sources de variance présentes dans les données qui, étant pertinentes, sont également corrélées avec la réponse. Si l'on ne tient pas compte de toutes les sources de variance significatives qui influencent la réponse, on obtient des modèles "sous-ajustés", en réalisant des prédictions affectées d'erreur systématique. Dans le cas contraire, le modèle a plus de paramètres que ceux strictement nécessaires pour représenter toutes les sources de variance pertinentes corrélées à la réponse, et le modèle est "ajusté", les prédictions étant affectées d'une erreur excessive. Dans ce projet, la méthode de sélection des variables par "étapes successives" a été utilisée. Dans cette procédure, les variables sont introduites séquentiellement. Après l'introduction de chaque nouvelle variable, la suppression de l'une des variables ci-dessus est envisagée. La suppression peut avoir lieu s'il existe une corrélation entre la nouvelle variable et l'une des précédentes. Pour ce faire, les valeurs de probabilité d'entrée F et de sortie F de 0,005 et 0,1 respectivement ont été utilisées (**García, 2011**).

2.7 Stress oxydatif

Le stress oxydatif ou pression oxydative, est un type d'agression des constituants de la cellule. Il apparaît quand des espèces réactives oxygénées¹ (ou radicaux libres) et/ou des espèces réactives oxygénées et azotées oxydant pénètrent la cellule ou s'y forment ; ces molécules sont instables et très cytotoxiques car elles « oxydent » d'autres molécules en leur soustrayant un électron ce qui les rend instables. Ces espèces peuvent être ou non des radicaux. Les trois plus connues sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; ce peroxyde d'hydrogène naturellement produit par le métabolisme cellulaire, en présence de fer (sous forme ionique, fer ferreux Fe^{2+}) produit des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton) intracellulaires très toxiques, mais dans une cellule saine il est neutralisé presque en temps réel par du glutathion (qui le transforme en eau).

ROS désigne en anglais : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène). RNS est l'acronyme de *reactive nitrogen species* (espèces réactives de l'azote). On parle plus fréquemment de RONS, *reactive oxygen and nitrogen species* (espèces réactives de l'oxygène et de l'azote).

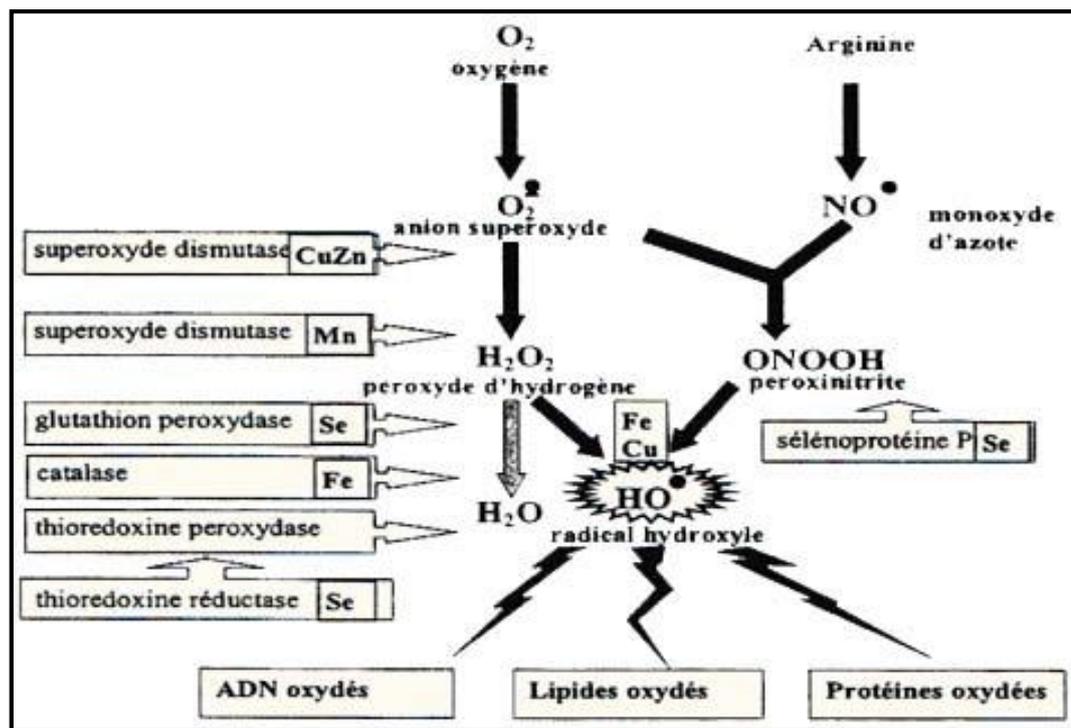


Figure 25: Processus de détoxyfication des dérivés actifs de l'oxygène

La cellule possède des mécanismes de défenses pour éliminer ces RONS. De nombreuses enzymes sont impliquées (catalases, peroxyde dismutase, glutathion peroxydase...). L'alimentation peut apporter des molécules épuratrices comme la vitamine A, vitamine C, vitamine E, les caroténoïdes, les polyphénols qui donnent des électrons aux radicaux très réactifs pour former d'autres radicaux beaucoup moins réactifs et qui sont recyclés. Ce sont ces molécules exogènes qui sont appelées des antioxydants (Saleh et Otaibi., 2013).

2.8 Antioxydants

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques ont été développées pour l'extraction, quantification et l'identification de ces composés à partir de plusieurs plantes médicinales et les produits agroalimentaires.

L'oxygène est un élément essentiel du fonctionnement normal de tout système aérobie. Par contre, il est responsable du stress oxydatif, la détérioration de la qualité des aliments ainsi que le désordre de la santé humaine qui est relié à l'oxydation des molécules biologiques. L'ajout des antioxydants est l'un des mesures pour contrôler et diminuer l'oxydation de lipides qui sont recherchées par les industries (El kalamouni, 2010).

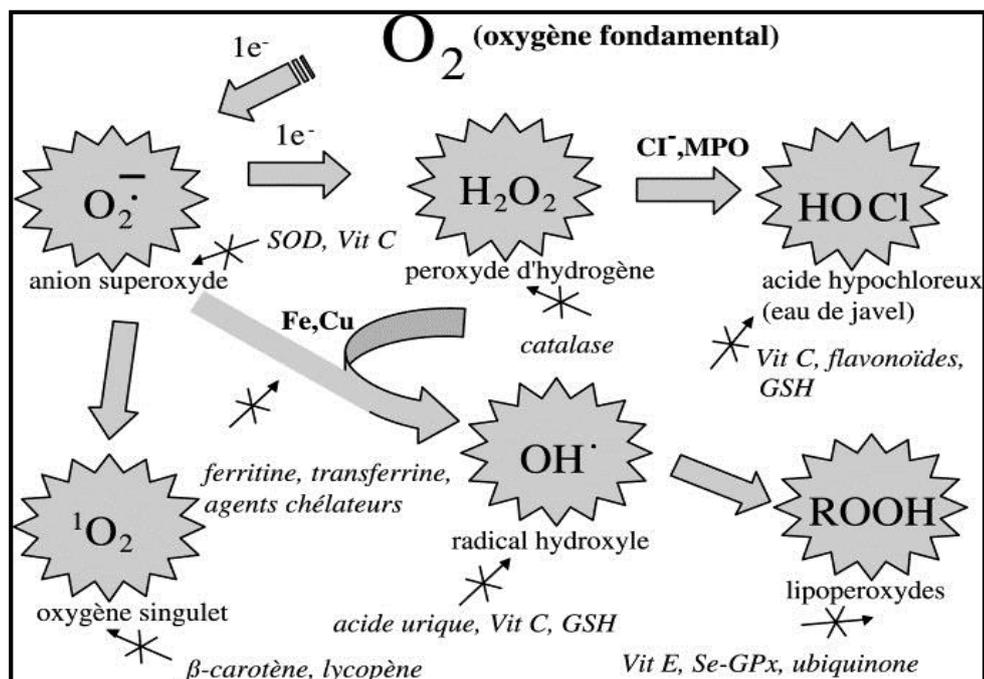


Figure 26: les composés actifs dérivés de l'oxygène

2.8.1 Définition

Le terme « antioxydant » désigne une substance qui en faibles concentrations, ralentit ou empêche significativement l'oxydation des substrats oxydable » (Halliwell, 1995).

Ce sont des substances capables de neutraliser et de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (Vansant, 2004). Ils sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques, classés dans trois catégories de système de défense :

- les antioxydants préventifs qui suppriment la formation de radicaux libres,
- les antioxydants piègeurs de radicaux, qui empêchent le déclenchement des réactions en chaîne et arrêtent la propagation,
- les antioxydants sont impliqués dans des processus de réparation (**Mohammedi, 2013**).

Ils peuvent être classés en deux groups selon leur solubilité :

- Antioxydants hydrophiles (water-soluble), comme la majorité des composés phénoliques et l'acide ascorbique.
- Antioxydants lipophiles (fat-soluble) comme les caroténoïdes et les vitamines (Alhussein, 2009).

2.8.2 Mesure de la capacité d'un antioxydant

Les méthodes basées sur la mesure la capacité d'un antioxydant à piéger les radicaux libres par le don d'hydrogène pour former des composés stables.

La méthode au 2,2- diphenyl -1-picrylhydrazyl (DPPH) est décrite par plusieurs auteurs, le test consiste à mettre le radical DPPH, en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH.

2.8.2.1 Principe

Le composé chimique DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. L'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue due à une recombinaison des radicaux DPPH, par spectrophotométrie UV visible à 515-518 nm. En présence des piègeurs de radicaux libres, il est de couleur violette se réduit en 2,2 diphenyl -1-picryl hydrazine de couleur jaune lorsque l'électron s'apparie. Cette décoloration permet d'obtenir des informations sur la capacité à piéger ces radicaux libres lors du contact avec des extraits phénoliques (**Popovici et al, 2009**).

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant des extraits on calcule l'IC₅₀ (Concentration Inhibitrice 50%) qui est la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH, ils sont calculés graphiquement par la formule de la régression des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (**Sanchez, 1998**).

2.8.3 Les travaux sur les polyphénols

Les pennes des variétés de Deglet Nour, Ghars et Hamray sont riches en composés phénoliques et peuvent être considérées comme une source naturelle de médicaments anti-inflammatoires par l'inhibition d'oxyde nitrite, antibactériens et antifongiques ainsi qu'un puissant médicament anti-mutagène et antidiabétique par l'inhibition des enzymes α -amylase et α -glucosidase (**Laouini al, 2013^a et 2014^b**).

Les résultats des analyses effectuées sur des extraits de pennes de trois variétés de dattes tunisiennes, à savoir : Deglet Nour, Medjhouel et Barhee, ont montré qu'ils sont un antioxydant naturel précieux et peuvent être appliqué à la fois dans les domaines de la médecine, l'industrie alimentaire et de la biotechnologie (**Kriaa et al, 2012**).

Différents extraits de pollen provenant de la Tunisie ont révélé la présence de huit composés phénoliques, qui ont été identifiés et quantifiés par HPLC, à savoir l'acide gallique, la catéchine, l'acide caféique, l'épicatéchine, l'acide vanillique, la coumarine, la quercitine et la rutine. Aussi, il est suggéré que le pollen du palmier dattier pourrait être considéré comme une source prometteuse de

nouveaux agents antioxydants (IC50= 46.56 mg/ml) (**Daoud et al., 2015**).

Plusieurs travaux anciens sur le pollen rapportent la présence des stérols, triterpènes, saponines, protéines, carbohydrates et/ou glycosides, β -amyrin, β -sitosterol aussi la glucoprotéine qui a présenté biologiquement une activité gonadotrophique (**Mahran et al., 1976**).

Selon une étude sur la détermination de la composition chimique et de la valeur nutritionnelle du grain de pollen, les résultats ont montré que c'est une bonne source nutritionnelle économique utilisée comme complément alimentaire pour les humains, constitué d'humidité (28,80%), de cendres (4,57%), de fibres brutes (1,37%), de graisses brutes (20,74%), de protéines brutes (31,11%) et de glucides (13,41%). Il contient également de vitamines A, E et C et de minéraux tels que B, Zn, Se, Fe, Mo, Cu, Mn, Co et Ni (**Hassan., 2011**).

L'extrait aqueux du pollen du palmier dattier agit comme un agoniste de la dopamine et soigne l'infertilité masculine. Stimulateur du comportement sexuel, utilisé comme aphrodisiaque qui entraîne une augmentation supplémentaire de la libération de dopamine. (**Abdi et al., 2014**).

La suspension de pollen est largement utilisée comme remède populaire pour améliorer la qualité et la quantité du sperme et résoudre les problèmes d'infertilité (**Bahmanpour et al., 2006**). Les extraits de pollen augmentaient l'hormone estradiol et la motilité des spermatozoïdes chez les rats normaux, protège contre le dysfonctionnement des testicules. Ils sont utilisés dans la thérapie pour le problème des femmes ménopausées comme source d'œstrogènes (**Hassan et al., 2012**).

L'analyse par HPLC a révélé que le pollen d'une variété irakienne, contient de nombreux types de flavonoïdes (13,590 μ g d'acide lincolérique, 122,251 μ g d'Isorhamnetin, 71,146 μ g d'acide chlorogénique, 99,188 μ g d'acide férulique, 64,574 μ g de naringine, 109,117 μ g d'apigénine, 48,391 μ g d'apigénine-7-O-beta glycopyranoside, 28,883 μ g de letuline et 18,291 μ g/g de letuline-7-O-beta glycosides) (**Al-Samarrai et al., 2017**).

L'analyse quantitative et qualitative (LC-ESIMS) a conduit à l'identification de 18 composés phénoliques dominés par l'acide quinique (84,52%) chez l'extrait de pollen qui a également montré un potentiel antioxydant et des activités antibactériennes importantes (**Karra et al., 2020**).

Le PPD a été utilisé comme agent de protection électromagnétique efficace pour réduire les effets néfastes des EMFs sur les paramètres du sperme et les hormones sexuelles chez les souris mâles (**Baharara et al., 2015**).

Chapitre IV : Activité antibiotique

1 Introduction

Les bactéries cohabitent avec l'espèce humaine depuis toujours. Certains germes sont bénéfiques comme les bactéries du microbiote mais malheureusement, les bactéries sont aussi responsables de maladies infectieuses mortelles. La découverte au XX^{ième} siècle des antibiotiques a permis de réduire la mortalité liée aux maladies bactériennes dans le monde.

Néanmoins, l'usage intensif des antibiotiques a généré des populations de bactéries résistantes et multi-résistantes. La nature est une source de molécules bioactives inépuisable et mettre en évidence des extraits végétaux actifs est d'une importance majeure (**Shakibaa et al., 2011**).

Le pouvoir antimicrobien des plantes médicinales est connu depuis l'antiquité, au début du 20^{ème} siècle, vue leurs propriétés thérapeutiques qui sont devenues un réservoir essentiel de nouveaux composés bioactifs abordables, efficace et sans effets secondaires nécessaires à la mise au point des médicaments face au problème de résistance bactérienne.

Un antibiotique représente actuellement l'un des groupes de médicaments les plus utilisés en médecine, c'est une substance chimique, élaborée par un microorganisme ou produit par synthèse, à coefficient chimio-thérapeutique élevé dont l'activité se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes (**Archambaud, 2009**).

L'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide.

2 Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

2.1 Techniques en milieu liquide (méthode de dilution)

2.1.1 Méthode des disques de Sarbach

Elle consiste à déposer, à différentes concentrations, l'extrait sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre l'ensemble est placé dans des tubes à essai. Chaque tube contient un volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation.

2.1.2 Méthode de Marzuella

Elle permet l'étude du pouvoir bactéricide en bouillon après solubilisation de l'extrait dans l'éthanol 95%, la solution est ensuite répartie à différentes doses dans le milieu liquide préalablement

ensemencé, après la durée d'incubation, on effectue des subcultures qui permettent d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) (**Rayour, 2002**).

2.1.3 Dilution en bouillon

Est une technique dans laquelle une suspension bactérienne est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide, peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macro-dilution) ou avec petits volumes à l'aide de plaques de micro-titration (micro-dilution).

2.1.4 Dilution en gélose

Elle implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à différentes concentrations, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte (**El kalamouni, 2010**).

2.2 Techniques en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)

2.2.1 Méthode de Vincent

Selon Jacob et Pellecier, (1979), appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme, elle consiste d'imprégner des disques de papier filtre de 10 mm de diamètre dans l'extrait et les déposés à une surface gélosée préalablement ensemencé par une suspension bactérienne. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm.

2.2.2 Méthode de Morel et Rochaix

Elle permet d'évaluer le pouvoir antimicrobien des extraits par la solubilisation dans l'alcool à différentes concentrations et les incorporer dans un milieu gélosé ensemencé, puis coulé en boîtes de Pétri. L'alcool faciliterait la diffusion de l'essence dans le milieu Morel et Rochaix, 1926)².

2.2.3 Méthode en micro-atmosphère

Les boîtes de pétri sont ensemencées par les germes tests et déposer quelques gouttes d'extrait sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, l'inhibition de leur croissance (**Beylie e al., 1979 ; Rayour, 2002**).

² Morel, A., u.A. Rochaix, C. r. Soc. Biol. Paris **85**, 861 (1921)

2.3 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).

La CMI est la concentration provoquant l'absence de croissance des bactéries visibles pendant 24h, cette technique consiste à déposer l'agent antimicrobien en concentration variable préparée avec DMSO, par la méthode d'une dilution de moitié, elle est très fiable et reproductible. Après l'incubation à 37 °C pendant 24 heures, la croissance bactérienne est examinée, dans chaque tube, qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée est définie comme la plus petite concentration qui inhibe toute croissance visible d'une bactérie après 18 heures d'incubation à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

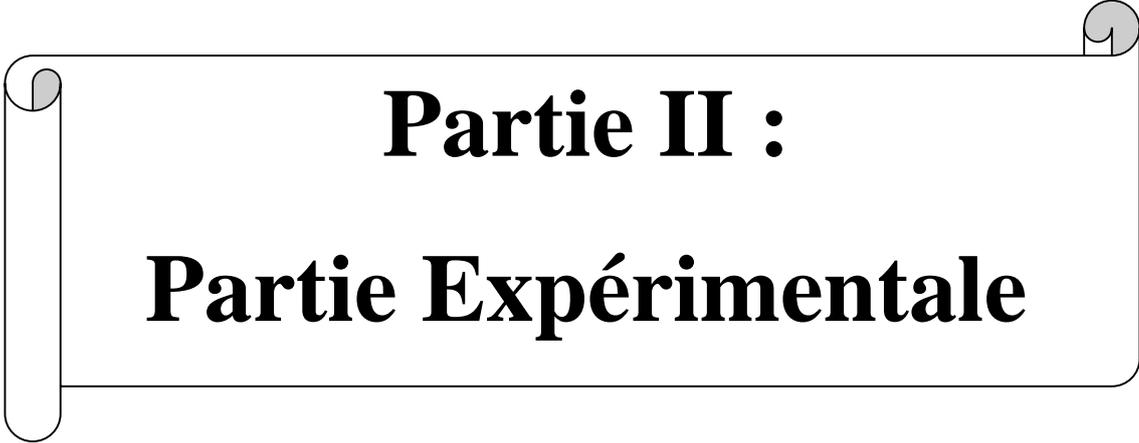
Pour déterminer la CMB, Après la lecture de la CMI, des repiquages sont effectués en strie, sur une gélose neuve. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 h après, on compare les stries au témoin de bactéricide. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0,01% de survivants (**Bolou et al, 2011**).

2.4 Mode d'action contre les bactéries

Face à la découverte des antibiotiques et leur utilisation dans les soins de santé humaine, l'homme était confronté à des problèmes de résistance bactérienne, la surutilisation des antibiotiques, ont souvent été considérée comme contribuant à l'émergence de cette résistance. Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle est capable de se multiplier lorsqu'elle est mise en contact avec des antibiotiques. La principale forme de résistance est le type acquis, où ceux qui étaient autrefois sensibles à un antibiotique donné, mais qui développent une résistance au fil du temps en acquérant des facteurs de résistance de l'environnement (**Etebu et al., 2016**).

Leur action se déroule en trois phases :

- L'extrait attaque la paroi bactérienne en provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- La production de l'énergie cellulaire ainsi que les composants de structure sont bloqués suite à l'acidification de l'intérieur de la cellule.
- Perturbation de la synthèse des protéines au niveau des ribosomes ainsi que la paroi bactérienne.
- La destruction de son matériel génétique ou l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (**Rhayour, 2002 ; El kalamouni, 2010**).



Partie II :
Partie Expérimentale

Etude I. Caractérisation génotypique de dokkars de cultivars de *Phoenix dactylifera* L.

1 Préambule

Ce travail fait suite à notre travail de Magister intitulé « Valorisation de quelques dokkars par l'étude de la diversité génétique moyennant les marqueurs morphologiques de l'IPGRI » soutenu en 2015 (Benouamane, 2015).

Il s'agissait notamment de comparer au niveau phénotypique, les dokkars ressemblant aux 4 cultivars de la région de Biskra : Ghars, Hamray, Safray et Horra. Au niveau de l'évaluation qualitative des caractéristiques des plantes, nous avons constaté une différence entre les pieds mâles choisis, dont l'aspect de la couronne est moyen pour les dokkars de Hamray et le Ghars, aéré pour celui de Safray, et dense pour les pieds de Horra. Cette variabilité semble être variable en fonction de type de port des pieds. La capacité de produire des rejets se diffère d'un Dokkar à un autre, la plus forte production a été observée pour les Dokkars Hamray et Horra, moyenne chez le dokkar Ghars et la plus faible pour le dokkar Safray. Au niveau des caractères qualitatifs de la palme, les palmes des dokkars étudiés présentent une ressemblance au niveau de quelques paramètres, à savoir : l'angle dorsal et ventral au milieu penné, la rotation de la palme et la flexibilité des pennes au milieu. Aussi, on remarque que trois dokkars présentent une couleur identique des pennes, vert olive, sauf les pennes du dokkar Safray qui sont de couleur vert jaunâtre. D'autre part, des différences sont observées pour les autres traits, à savoir celle de la couleur du pétiole qui est jaune pour le dokkar Hamray, marron pour les dokkars de Ghars et Horra, et noire pour celui de Safray. Aussi, ces dokkars présentent des différences pour la rigidité des épines. Elle est moyenne pour le dokkar Ghars et souple pour les autres Dokkars étudiés. En ce qui concerne les caractères qualitatifs de l'inflorescence et du pollen, nous remarquons que les quatre dokkars sélectionnés présentent beaucoup plus des différences au niveau de la forme de la spathe, elle est gonflée chez le dokkar Hamray, lancéolée pour celui de Safray et fusiforme chez les pieds de Ghars et de Horra. Le pollen des quatre dokkars est conservé à l'air libre généralement sous forme de spathe ou épillets. Le pollen a une couleur blanchâtre chez les dokkars excepté celui du dokkar Ghars caractérisé par une couleur jaunâtre. L'odeur du pollen est forte pour les dokkars Hamray et Horra alors que celle des deux autres est faible. En ce qui concernait l'évaluation des caractères quantitatifs de reproduction, Il y avait une haute différence significative entre les dokkars concernant la plupart des paramètres de reproduction. Le test de germination (Brew beker) a notamment montré que le cultivar Hamray s'est montré le plus performant (93,33%) devant le cultivar Ghars (66,67%), le cultivar Safray (50%) et le cultivar Horra (0,67%). Ce dernier point est particulièrement important dans la perspective de l'amélioration génétique des cultivars. Ainsi, ce travail avait permis de mettre en évidence une grande diversité phénotypique entre les différents

dokkars et nous avons voulu compléter ces données par des données au niveau génotypique pour investiguer si cette diversité au niveau phénotypique se vérifiait aussi au niveau génotypique.

2 Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante des clades des Trachéophytes, des Angiospermes, des Monocotylédones et des commelinidés de l'ordre des Arecales et de la famille des Areaceae. Cette plante présente un intérêt écologique, économique et social majeur pour de nombreux pays des zones arides, parmi les plus pauvres du monde. Dans le Sahara algérien, le palmier dattier est le pilier des écosystèmes oasiens où il limite les dégâts causés par l'ensablement, joue un rôle protecteur contre le rayonnement solaire intense pour les cultures sous-jacentes (arbres fruitiers, cultures maraîchères et céréales). Il joue un rôle socio-économique majeur pour les populations de ces régions pour lesquelles il fournit d'une part un fruit, la datté dont les qualités nutritionnelles sont indéniables et qui constitue une source de revenus appréciables avec 9 % des exportations agricoles, d'autre part une multitude de sous-produits (culinaire, artisanat et menuiserie) (**Bouguedoura et al., 2010**). La production annuelle de dattes en Algérie est d'environ 1 million de tonnes couvrant environ 163 985 ha d'oasis (FAO, 2018). Le verger phénicicole algérien se caractérise par son extraordinaire diversité génétique atteignant 1000 cultivars (Belguedj, 1996 in **Babahani., 2011^b**). C'est un réservoir naturel de caractéristiques importantes mais nous attendons une grave érosion génétique due aux flux migratoires, à la croissance démographique, à la surexploitation des ressources en eau, où (**Brac de la perrière.,1988, Allam et al., 2006, Bouziane et al., 2010**) ont rapporté que les palmeraies du sud algérien sont caractérisé par la monoculture, représentée par le cultivar « Deglet Nour » qui prend le front au détriment d'autres cultivars, dits 'commun' qui sont marginalisés ou ignorés. En outre, les mâles des semis expriment une grande différence dans leur croissance et leur vigueur, Taha et Shaheen (1984), Iqbal et al (2009) ont informé qu'ils variaient dans leurs caractéristiques de spathe, le nombre de fleurs par brin et la qualité du pollen. C'est pour cela que les agriculteurs rencontrent des difficultés dans l'identification des meilleurs pollinisateurs aux stades précoces, ils sélectionnent ceux qui ont une période de floraison correspondante aux femelles en se basant sur des critères morphologiques. De plus, ils mélangent différentes sources de pollen, ce qui affecte la qualité des fruits et la période de maturation, comme l'ont rapporté Abdelkrim et al. (2007). Pour cette raison, il est impératif d'élaborer une approche stratégique visant à évaluer et caractériser la variabilité génétique et à préserver le germoplasme algérien du palmier dattier.

La plupart des études réalisées sur les ressources génétiques du palmier dattier étaient basées sur la morphologie, la qualité biochimique et nutritionnelle des fruits rapportée par Açourene et al., (2001), Tirichine (2001), Noui (2007), Harrak (2005), Al-Kharusi (2009), Taouda (2014), Ben Abdellah

(2020). D'un autre côté, l'utilisation de l'un ou l'autre des isozymes (en Algérie (Bennaceur et al., 1990) et des traits morphologiques pour décrire les arbres, a été signalée dans différents pays, comme l'Arabie Saoudite (Nasr et al., 1984), le Maroc (Elhoumaizi et al., 2006) et la Mauritanie (Ahmed et al., 2010). En Algérie, peu d'enquêtes ont été réalisées, (Babahani et al., 2006, 2011) ont évalué le potentiel de production de palmiers dattiers mâles cultivés et ont également étudié le patrimoine du palmier dattier dans le nord du Mali en se basant sur les caractères végétatifs et les caractéristiques morphologiques des inflorescences, des fruits et des graines. Cependant, ces caractères sont fortement influencés par les conditions environnementales et changent avec le stade de développement des plantes, sont généralement peu fiables, ambigus, laborieuses et de nombreuses années sont nécessaires pour exprimer les caractères de productivité (Zhao et al., 2013). Par conséquent, le développement de techniques d'empreintes génétiques est d'une grande valeur pour les programmes de sélection et a également été utilisé avec succès pour faciliter la caractérisation variétale et la préservation du germoplasme de palmier dattier ainsi que pour estimer le niveau de variabilité (Adawy et al., 2005). Ils sont un outil puissant qui confirme l'identité des cultivars au stade de semis (Heiba et al., 2015), permettant la sélection avec les caractères souhaitables sans perdre de temps (Zehdi et al., 2004). De nombreux auteurs ont indiqué l'utilisation de divers marqueurs moléculaires pour évaluer le polymorphisme génétique et différencier les génotypes chez le palmier dattier, y compris les RFLP dans Emirats Arabes Unis (EAU) (Corniquel et al., 1994), les RAPD en Égypte (Eissa et al., 2009; El-Rayes, 2009), AFLP in Iraq (Jubrail et al., 2005). Diverses études ont exploré l'efficacité des marqueurs moléculaires ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) pour détecter les relations et les polymorphismes dans les loci microsatellites et inter microsatellites sans connaissance préalable de la séquence d'ADN parmi les accessions. Sont très polymorphes en longueur, fiables, adaptés pour discriminer entre les génotypes. Ils ont fait l'objet de nombreuses recherches, identifiant des marqueurs supposés spécifiques au sexe chez les palmiers dattiers mâles et femelles (Al-Ameri et al., 2016), estimant les distances génétiques et examinant les relations génétiques (Zehdi et al., 2004), la cartographie génétique et la sélection assistée par marqueurs (Zhao et al., 2013). Peu de travaux ont été entrepris sur la caractérisation moléculaire génétique du germoplasme du palmier dattier algérien (Guettouchi., 2017 ; Khouane et al., 2020). Cet article décrit la diversité génétique des palmiers dattiers mâles les plus connus des cultivars algériens.

L'objectif du présent travail est de caractériser et de comparer la diversité génétique de cinq cultivars de palmiers dattiers mâles locaux collectés dans la région de Biskra (Algérie) afin d'identifier des critères discriminants qui aident le phoeniculteur à sélectionner tôt le meilleur pollinisateur. La comparaison s'était concentrée lors d'une précédente étude sur les aspects morphologiques utilisant les caractères végétatifs et reproductifs des plantes, et la viabilité du pollen, évaluant les caractères

agronomiques importants pouvant être utilisés comme descripteurs, faisant suite à cette étude, nous nous sommes concentrés sur les génotypes, en évaluant les relations et le niveau de diversité génétique entre les cultivars à l'aide de marqueurs ISSR et RAPD.

3 Matériel et méthodes

3.1 Région d'échantillonnage.

Les plantations de palmiers dattiers échantillonnées dans ce travail étaient situées dans la région d'Ourel Biskra (Sud-Est du Sahara algérien) (coordonnées : 34°51'N 5°44'E).

3.2 Matériel végétal

Trois pieds pour chacun des cinq cultivars mâles de palmiers dattiers, un total de 15 individus, ont été sélectionnés : Hamray (HM), Safray (SF), Ghars (GH) et Horra (HR) et Deglet Nour (DN), l'enquête a été menée au printemps 2017. Les pieds étaient âgés de 15 à 20 ans provenant de semis et exempts de maladies, cultivés dans les mêmes conditions écologiques.

3.3 Caractérisation moléculaire.

L'ADN génomique a été extrait des pennes des plantes mâles de différents cultivars : Horra, Ghars, Hamray, Safray et Deglet nour. 100 mg de pennes ont été pesés et congelés à l'aide d'azote liquide, puis réduits en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon (Al-Ameri et al., 2016). L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide d'un kit commercial (PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgique). La concentration et la pureté de l'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie en mesurant la DO à 260 et 280 nm (Simbolo, 2013) (Nanodrop 2000, Thermo Fisher, Merelbeke, Belgique).

3.3.1 Inter Simple Sequence repeats (ISSR)

L'ADN isolé a été amplifié à l'aide des méthodes de PCR ISSR décrites précédemment (Al-Ameri et al., 2016) avec des modifications. Les amorces utilisées étaient biba1 : (GA)₉C et biba2 (CA)₈RG, la température d'hybridation pour biba1 a été optimisée à 52°C et la température d'hybridation optimale pour biba2 était de 49°C. Les amorces ont été achetées lyophilisées (Eurogentec, Seraing, Belgique) et remises en suspension dans de l'eau stérile exempte de nucléases à une concentration de 4 µM. Les réactifs utilisés étaient : EZ-PCR master mix 5x (mini PCR, Cambridge, MA, USA).

Le mélange PCR était : 4 µl de mélange maître EZ-PCR, 1 µl d'amorce (Biba1 ou biba2), 13 µl d'eau libre de nucléase et 2 µl d'ADN (50 ng). Les cycles étaient : 1x(95°C pendant 5 minutes), 35x (95°C pendant 30 sec, 52°C (biba 1) ou 49°C (biba2) pendant 1 minute, 72°C pendant 1 minute), 1x (72°C pendant 7 minutes).

3.3.2 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

Nous avons adapté la méthode décrite antérieurement (Younis et al., 2008). Nous avons choisi les amorces A10 (5'-GTGATCGCAG-3') et A12 (5'-TCGGCGATAG-3') car elles étaient les plus discriminantes dans leur étude. Les amorces (Eurogentec, Seraing, Belgique) lyophilisées sont ajustées à une concentration de 4 µM. Le mélange de PCR pour une réaction était : 4 µl de solution mère EZ-PCR 5X, 1 µl d'amorce (A10 ou A12), 13 µl d'eau libre de nucléase et 2 µl d'ADN (50 ng). Les conditions de PCR étaient : 1 x 94°C pendant 5 minutes, 40 x (94°C 1 min, 35°C 1 min, 72°C 2 min), 1x 72°C pendant 8 minutes.

Les produits des PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%. L'échelle de poids moléculaire utilisée était prête à charger une échelle de 100 pb (miniPCR, Cambridge, MA, États-Unis).

Le tampon EDTA Tris Borate 1X a été utilisé à partir d'une solution mère de TBE 20X (miniPCR, Cambridge, MA, USA). 2 µl de GelGreen® (miniPCR, Cambridge, MA, USA) ont été ajoutés au gel et les bandes d'ADN ont été visualisées à l'aide du système d'électrophorèse blue gel TM (miniPCR, Cambridge, MA, USA).

L'ISSR et la RAPD ont été réalisées en triple exemplaires sur chaque extraction d'ADN. Seules les bandes reproductibles ont été prises en compte pour la comparaison du profil.

4 Analyse Statistiques

Pour les profils génétiques, un tableau a été construit avec une colonne par bande observée (pb). Pour chaque ADN analysé si la bande est présente, un 1 a été indiqué dans la cellule correspondante et un 0 si la bande est absente.

Les profils génétiques ont été comparés à l'aide d'un regroupement hiérarchique par liaison complète (Glasbey, 1987). Le dendrogramme a été généré à l'aide du logiciel libre Wessa.net (<http://www.wessa.net/>).

L'indice de Jaccard (JI) (Jaccard, 1901) a été calculé pour toutes les bandes observées pour toutes les amorces.

Pour la comparaison de 2 profils génétiques, l'indice de Jaccard a été calculé pour tout l'ADN testé à l'aide d'un logiciel en ligne gratuit (<http://www.comparingpartitions.info>), selon l'équation suivante, l'indice de Jaccard = nombre de bandes communes/(nombre de bandes communes + bande présentes dans le profil 1 et non dans le profil 2+ nombre de bandes présentes dans le profil 2 et non

dans le profil 1). Par conséquent, il est compris entre 0 (pas de bandes communes) et 1 (toutes les bandes en commun).

L'AMOVA a été réalisée en utilisant le logiciel genAlEx (Peakall and Smouse, 2012). Il s'agit d'un logiciel fonctionnant sous Excel.

5 Résultats et Discussion

5.1 Analyse moléculaire L'ISSR

5.1.1 ISSR avec l'amorce biba1 :

Le nombre de bandes différentes était de 12. La taille des bandes variait de 190 à 800 pb. Parmi ces 12 marqueurs, 7 (58,3 %) étaient polymorphes (**fig.27 et tableau .1**).

Tableau 1: Profils ISSR pour les différents individus testés avec le marqueur Biba1

Individus	Bandes (pb)											
	190	220	290	380	450	500	560	600	620	650	700	800
HM1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
HM2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
HM3	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
SF1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
SF2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
SF3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
GH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
GH2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
GH3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
HR1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
HR2	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
HR3	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
DGN1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DGN2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
DGN3	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	V1	V2	C1	C2	V3	C3	V3	C4	V4	V5	V6	V7

1=présence ; 0=absence. Vn=bande n variable, Cn=bande n constante ; HM : Hamray ; SF : Safray ; GH : Ghars, HR : Horra ; DGN: Deglet Nour

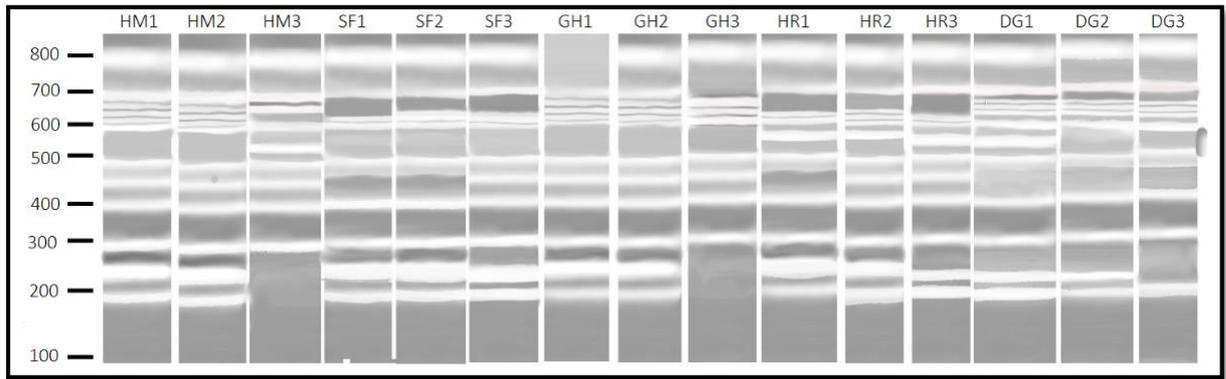


Figure 27-A : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%). Les nombres présentent les tailles (en pb) de l'échelle de poids moléculaire.

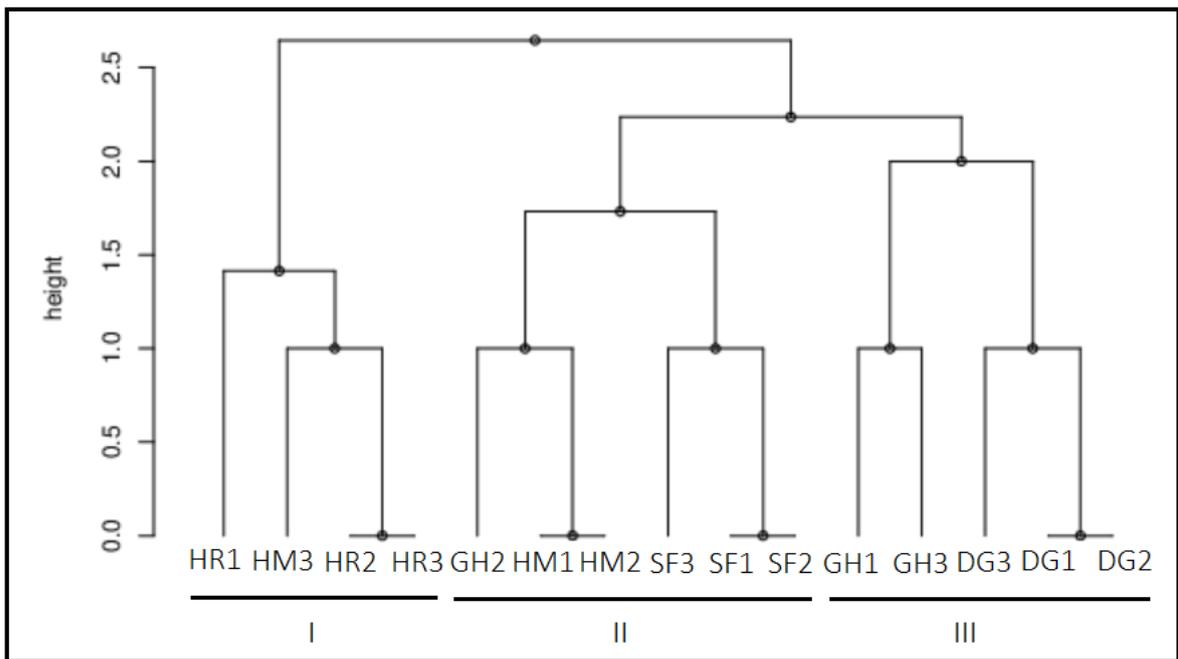


Figure 27-B : Dendrogramme de l'analyse hiérarchique par complete linkage clustering.

HM1																		
HM2	1.000																	
HM3	0.435	0.435																
SF1	0.534	0.534	0.308															
SF2	0.534	0.534	0.308	1.000														
SF3	0.649	0.649	0.352	0.738	0.738													
GH1	0.692	0.692	0.435	0.435	0.435	0.492												
GH2	0.804	0.804	0.429	0.600	0.600	0.771	0.578											
GH3	0.804	0.804	0.379	0.429	0.429	0.518	0.804	0.643										
HR1	0.435	0.435	0.545	0.360	0.360	0.352	0.435	0.429	0.379									
HR2	0.410	0.410	0.711	0.300	0.300	0.321	0.410	0.375	0.375	0.711								
HR3	0.410	0.410	0.711	0.300	0.300	0.321	0.410	0.375	0.375	0.711	1.000							
DG1	0.692	0.692	0.435	0.534	0.534	0.492	0.692	0.578	0.578	0.534	0.458	0.458						
DG2	0.692	0.692	0.435	0.534	0.534	0.492	0.692	0.578	0.578	0.534	0.458	0.458	1.000					
DG3	0.578	0.578	0.429	0.429	0.429	0.417	0.578	0.484	0.484	0.600	0.481	0.481	0.804	0.804				
	HM1	HM2	HM3	SF1	SF2	SF3	GH1	GH2	GH3	HR1	HR2	HR3	DG1	DG2	DG3			

Figure 27 -C : Index Jaccard pour le profil de l'ISSR pris 2 par 2.

Figure 27 : Génotypage à l'aide du marqueur ISSR biba1. A. B. C.

En orange l'indice inférieur à 0,4, En jaune les indices entre 0,4 et 0,6, en vert les indices entre 0,6 et 0,8, en bleu les indices supérieurs à 0,8 et inférieurs à 1, En violet les correspondances parfaites avec un indice de 1. HM1: ADN de la plante 1 du Cultivar Hamray, HM2: ADN de la plante 2 du cultivar Hamray, HM3: ADN de la plante 3 du cultivar Hamray, SF1: ADN de la plante 1 du cultivar Safray, SF2 : ADN de la plante 2 du cultivar Safray, SF3: ADN de la plante 3 du cultivar safray; GH1: ADN de la plante 1 du Cultivar Ghars, GH2: ADN de la plante 2 du cultivar Ghars, GH3: ADN de la plante 3 du cultivar Ghars, HR1: ADN de la plante 1 du cultivar Horra, HR2: ADN de la plante 2 du cultivar Horra; HR3: ADN de la plante 3 du cultivar Horra. DG1 : ADN de la plante 1 du cultivar Deglet Nour ; DG2: ADN de la plante 2 du cultivar Deglet Nour, DG3: ADN de la plante 3 du cultivar Deglet Nour.

Le dendrogramme indique que les plants du cultivar Horra et le profil provenant de HM3 forment un premier groupe. Fait intéressant, c'était également le cas pour le dendrogramme des caractéristiques morphologiques (Benoumane, 2015). Un deuxième groupe comprend les profils des plantes du cultivar Safray et les profils HM1, HM2 et GH2. Les plantes des cultivars Safray et GH2 se séparent également sur le dendrogramme en fonction des caractéristiques morphologiques. Un troisième groupe comprend les plantes du cultivar Deglet nour et les profils GH1 et GH3. L'indice Jaccard est un indicateur du pourcentage de bandes communes entre les profils. L'indice Jaccard variait de 0,3

(SF1/SF2 versus HR1/HR2) à 1 (HM1 versus HM2, SF1 versus SF2, HR2 versus HR3 et DG1 versus DG2). Les plants du cultivar Deglet nour présentaient les profils les plus homogènes avec un IJ allant de 0,804 à 1. Les plants du cultivar Safray présentaient également des profils similaires avec une IJ allant de 0,738 à 1. Parmi les plantes du cultivar Horra, l'indice de Jaccard variait de 0,711 à 1. Dans le groupe des cultivars Hamray, HM1 et HM2 présentaient des profils similaires (JI=1) mais le profil HM3 est plus différent (IJ=0,435). HM3 est plus proche des profils HR2 et HR3 (IJ=0,711). Pour les plantes du cultivar Ghars, IJ varie de 0,578 à 0,804. Parmi les cultivars, les plus grands IJ (0,804) se situent entre HM1/HM2 et GH2/GH3.

5.1.2 ISSR avec amorce biba2 :

Le nombre de bandes différentes était de 14 allant de 268 à 1034 pb et le nombre de bandes polymorphes était de 12 (85,7%) (**Fig. 28 et tableau .2**).

Tableau2 : Profils d'ISSR des différents cultivars avec le marqueur Biba2

individus	Bandes (pb)													
	250	280	320	350	380	411	450	520	580	610	650	700	750	1034
HM1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
HM2	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
HM3	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0
SF1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
SF2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
SF3	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
GH1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
GH2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
GH3	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1
HR1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
HR2	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
HR3	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
DGN1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DGN2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
DGN3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	V1	C1	V2	V3	V4	C2	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12

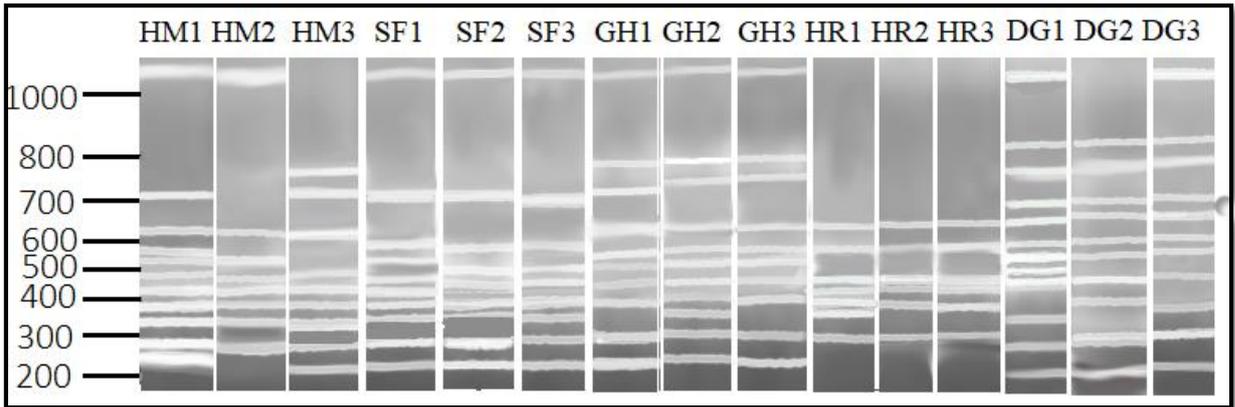


Figure 28-A : Image de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Les chiffres représentent les tailles (en pb) de l'échelle.

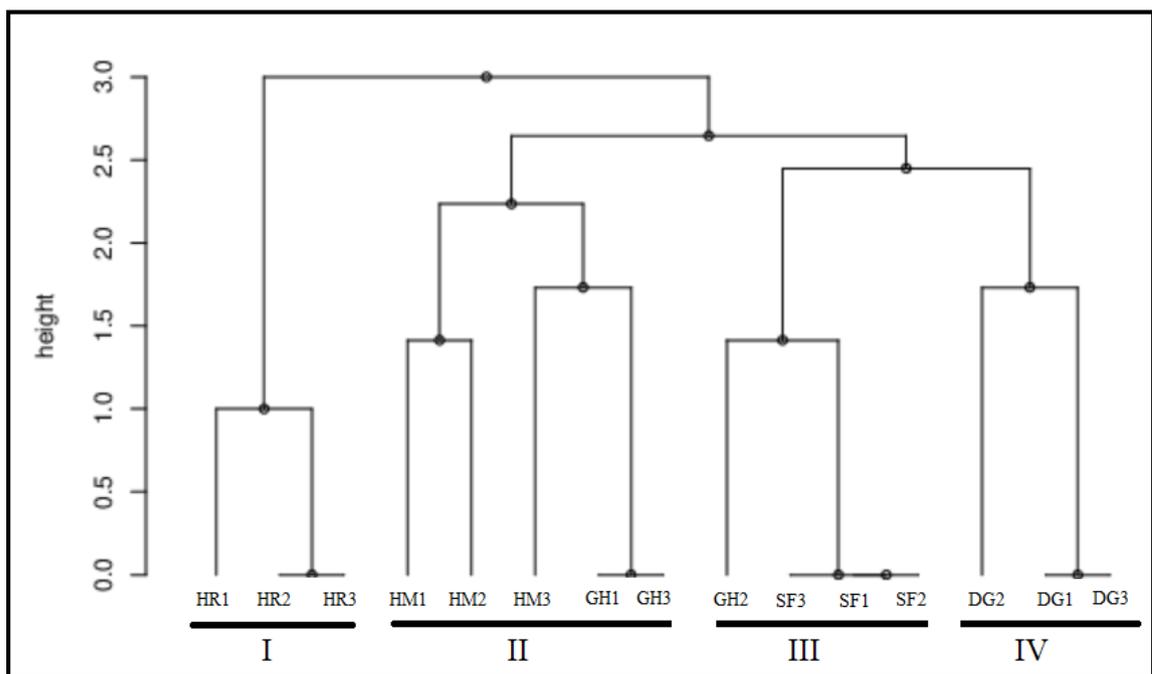


Figure 28-B : Dendrogramme pour une analyse hiérarchique de regroupement par complete linkage clustering.

HM1																
HM2	0.593															
HM3	0.492	0.328														
SF1	0.437	0.324	0.329													
SF2	0.437	0.324	0.329	1.000												
SF3	0.437	0.324	0.329	1.000	1.000											
GH1	0.619	0.403	0.492	0.437	0.437	0.437										
GH2	0.494	0.392	0.430	0.662	0.662	0.662	0.662									
GH3	0.619	0.403	0.492	0.437	0.437	0.437	1.000	0.662								
HR1	0.310	0.308	0.294	0.310	0.310	0.310	0.348	0.380	0.348							
HR2	0.324	0.365	0.328	0.324	0.324	0.324	0.324	0.392	0.324	0.735						
HR3	0.324	0.365	0.328	0.324	0.324	0.324	0.324	0.392	0.324	0.735	1.000					
DG1	0.483	0.424	0.442	0.483	0.483	0.483	0.483	0.629	0.483	0.429	0.458	0.458				
DG2	0.494	0.392	0.548	0.422	0.422	0.422	0.494	0.540	0.494	0.380	0.392	0.392	0.629			
DG3	0.483	0.424	0.442	0.483	0.483	0.483	0.483	0.629	0.483	0.429	0.458	0.458	1.000	0.629		
	HM1	HM2	HM3	SF1	SF2	SF3	GH1	GH2	GH3	HR1	HR2	HR3	DG1	DG2	DG3	

Figure 28 -C : Indice de Jaccard pour le profil de l'ISSR pris 2 par 2.

Figure 28 : Génotypage ISSR à l'aide du marqueur biba2. A. B. C.

En orange l'indice inférieur à 0,4, En jaune les indices entre 0,4 et 0,6, en vert les indices entre 0,6 et 0,8, en bleu les indices supérieurs à 0,8 et inférieurs à 1, En violet les correspondances parfaites avec un indice de 1. HM1: ADN de la plante 1 du cultivar Hamray, HM2: ADN de la plante 2 du cultivar Hamray, HM3: ADN de la plante 3 du cultivar Hamray, SF1: ADN de la plante 1 du cultivar Safray, SF2 : ADN de la plante 2 Du cultivar safray plant 2, SF3: ADN de la plante 3 du cultivar safray; GH1: ADN de la plante 1 du cultivar Ghars, GH2: ADN de la plante 2 du cultivar Ghars, GH3: ADN de la plante 3 du cultivar Ghars, HR1: cultivar Horra plante 1, HR2: cultivar Horra plante 2; HR3: cultivar Horra plante 3. DG1 : Deglet nour plante 1 ; DG2 : Deglet nour plante 2, DG3 : Deglet nour plante 3.

L'analyse des profils du marqueur Biba 2 a indiqué que 4 groupes apparaissent (fig. 28-B). Le groupe I comprend les profils de l'ADN du cultivar HR. Le groupe II comprend les profils de l'ADN du cultivar HM et les profils GH1 et GH3. Le groupe III comprend les profils des ADN des cultivars de SF (SF1, SF2 et SF3) et du profil GH2. Le groupe IV comprend les profils des ADN des cultivars de la DG (DG1, DG2 et DG3).

L'indice de Jaccard (IJ) variait de 0,294 (HM3 versus HR1) à 1 (SF1 versus SF2 ; SF1 contre SF3, SF2 contre SF3, GH1 contre GH3, DG1 contre DG3). Les profils de cultivars SF sont

homogènes (IJ = 1) ; Les profils de cultivars HR sont similaires (IJ allant de 0,775 à 1). Pour les profils ADN du cultivar GH, GH1 est identique à GH3, mais GH2 présentait un IJ de 0,662 avec GH1 et GH3. D'autre part, GH2 est comme les profils ADN SF (JI = 0,662). Pour les profils ADN du cultivar DG, DG1 est identique à DG3 mais DG2 est un peu plus différent (JI=0,629). Fait intéressant, l'ADN du cultivar HM est assez hétérogène avec JI allant de 0,392 à 0,593. Le profil HM1 est plus proche des profils GH1 et GH3 que des profils HM2 ou HM3.

Les microsatellites, connus aussi comme les répétitions de séquences simples (SSR) ou les courtes répétitions en tandem (STR) sont des régions du génome constituées de motifs d'ADN courts (généralement de 2 à 5 nucléotides) répétés plusieurs fois de suite. Par la suite, les ISSR sont des segments d'ADN qui sont flanqués aux deux extrémités de telles séquences microsatellites. En utilisant des amorces conçues arbitrairement qui contiennent des séquences répétitives complémentaires aux régions microsatellites du génome (= amorces ISSR), des segments d'ADN aléatoires dans le génome peuvent être amplifiés par PCR (à condition qu'un segment se situe dans la plage de taille amplifiable) et utilisés comme marqueurs pour les études de variation génétique, d'où le terme « marqueurs ISSR » (ISSR-PCR) (Ng et Tan, 2015). L'amorce Biba 1 se compose de 9 répétitions du dimère GA, donc pour pouvoir s'hybrider à l'ADN, le STR sur l'ADN doit consister en au moins 9 répétitions. Par conséquent, si le STR contient moins de répétitions GA, l'amorce ne s'hybridera pas ou s'hybridera mal. Par conséquent, l'absence d'amplification est due à l'absence du STR correspondant ou à la présence d'un STR plus court que la longueur de l'amorce. Donc, c'est probablement la source de la diversité parmi l'ADN appartenant au même cultivar. Néanmoins, il existe une certaine corrélation entre l'analyse phénotypique et l'analyse génotypique. Par exemple, avec l'amorce biba1, le profil HM3 est proche des profils HR, et c'est également le cas en analyse phénotypique. Néanmoins, c'est moins évident pour les profils d'amorce biba2. De la même manière, le profil GH2 est proche des profils SF à la fois dans l'analyse phénotypique et génotypique.

L'ISSR-PCR est une méthode facile pour comparer l'ADN génomique de différents individus, mais c'est un échantillon de la variabilité génétique, et les méthodes de séquençage de nouvelle génération sont maintenant plus informatives pour comparer les génomes.

5.2 Analyse de RAPD

Pour le génotypage basé sur la RAPD, nous avons choisi deux amorces qui ont déjà montré leur caractère polymorphe sur des cultivars de *Phoenix dactylifera* (Younis et al., 2008).

5.2.1 Analyse moléculaire RAPD L'amorce A10

A permis d'amplifier 13 amplicons variant de 420 à 1350 pb. Parmi ces 13 bandes, dont 11 (84,6%) sont polymorphes (Tableau 3)

Tableau 3: Génotypage des cultivars biskrites de *P. dactylifera* avec l'amorce A10

individus	Fragments en pb												
	420	450	490	500	525	570	620	660	720	850	920	1200	1350
HM1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
HM2	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
HM3	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1
SF1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
SF2	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
SF3	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
GH1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
GH2	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
GH3	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1
HR1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
HR2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
HR3	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
DG1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
DG2	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
DG3	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	C1	V7	V8	V9	V10	C2	C3

1 : présence, 0 : absence

Partie II Etude I. Caractérisation génotypique de dokkars de cultivars de *Phoenix dactylifera* L.

HM1 : ADN de la plante 1 du cultivar Hamray, HM2 : ADN de la plante 2 du cultivar Hamray, HM3 : ADN de la plante 3 du cultivar Hamray, SF1 : ADN de la plante 1 du cultivar Safray, SF2 : ADN de la plante 2 du cultivar safray, SF3 : ADN de la plante 3 du cultivar safray ; GH1 : ADN de la plante 1 du cultivar Ghars, GH2 : ADN de la plante 2 du cultivar Ghars, GH3 : ADN de la plante 3 du cultivar Ghars, HR1 : cultivar Horra plante 1, HR2 : cultivar Horra plante 2 ; HR3 : cultivar Horra plante 3. DG1 : Deglet nour plante 1 ; DG2 : Deglet nour plante 2, DG3 : Deglet nour plante 3. 1 : présence, 0 : absence. Vn : bande n variable, Cn : bande n constante.

L'indice de Jaccard a été calculé sur base de profils d'amplification du marqueur A10.

HM1																	
HM2	1.000																
HM3	0.593	0.593															
SF1	0.391	0.391	0.410														
SF2	0.391	0.391	0.410	1.000													
SF3	0.391	0.391	0.410	1.000	1.000												
GH1	1.000	1.000	0.593	0.391	0.391	0.391											
GH2	0.552	0.552	0.516	0.552	0.552	0.552	0.552										
GH3	1.000	1.000	0.593	0.391	0.391	0.391	1.000	0.552									
HR1	0.400	0.400	0.542	0.400	0.400	0.400	0.400	0.394	0.400								
HR2	0.400	0.400	0.542	0.400	0.400	0.400	0.400	0.394	0.400	1.000							
HR3	0.400	0.400	0.542	0.400	0.400	0.400	0.400	0.394	0.400	1.000	1.000						
DGN1	0.385	0.385	0.311	0.364	0.364	0.364	0.385	0.400	0.385	0.368	0.368	0.368					
DGN2	0.385	0.385	0.311	0.364	0.364	0.364	0.385	0.400	0.385	0.368	0.368	0.368	1.000				
DGN3	0.385	0.385	0.311	0.364	0.364	0.364	0.385	0.400	0.385	0.368	0.368	0.368	1.000	1.000			
	HM1	HM2	HM3	SF1	SF2	SF3	GH1	GH2	GH3	HR1	HR2	HR3	DGN1	DGN2	DGN3		

Figure 29 : Indices de Jaccard entre les ADN des différents cultivars.

En orange, l'indice est inférieur à 0,4 ; en jaune, l'indice est compris entre 0,4 et 0,6 ; en mauve l'indice est de 1.

L'indice de Jaccard varie de 0.311(DGN1, DGN2, DGN3 versus HM3) à 1(DGN1=DGN2=DGN3) ainsi que pour le cultivar Safray et Horra. Sur base des profils d'amplification, un dendogramme a été construit en « complete linkage ».

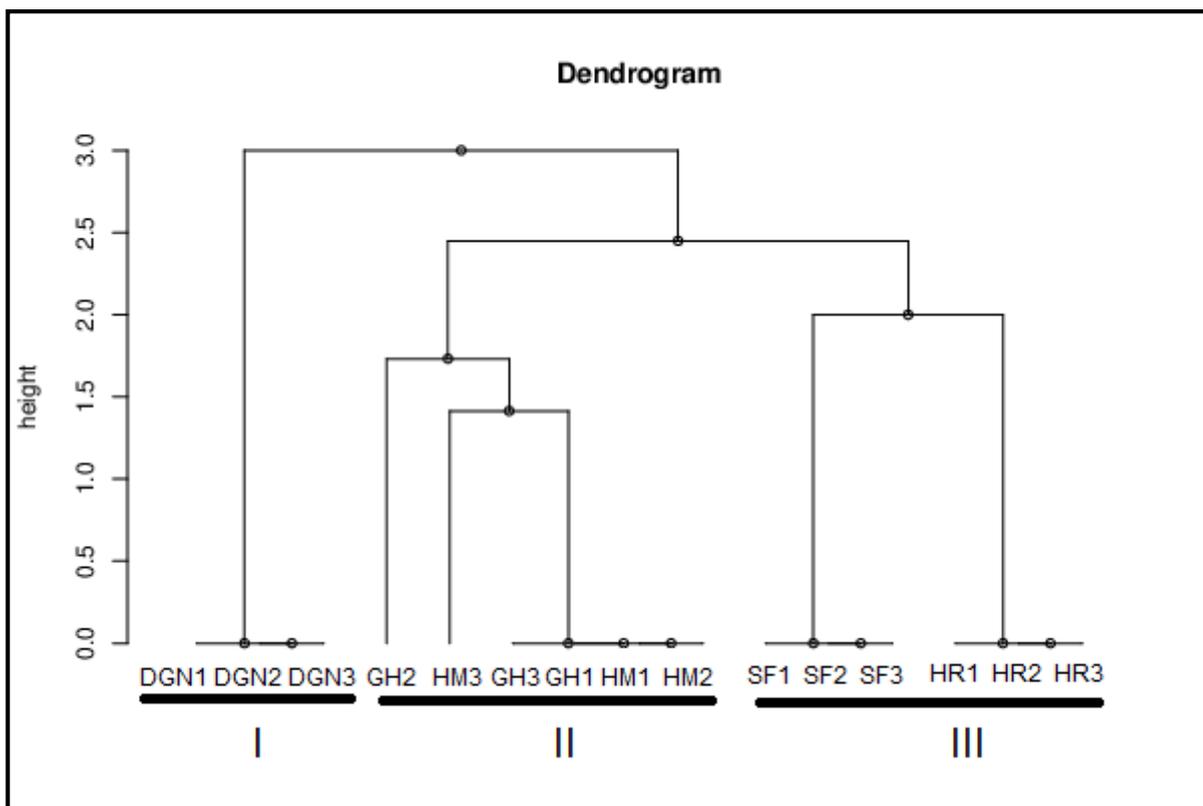


Figure 30 : Dendrogramme en complete linkage pour le marqueur A10.

L'analyse du dendrogramme a révélé 3 groupes. Le groupe I regroupe les 3 ADN du cultivar Deglet Nour qui constitue un groupe homogène, le groupe II regroupe les ADN des cultivars Ghars et Hamray, le groupe III regroupe les ADN des cultivars Safray et Horra.

5.2.2 Analyse moléculaire RAPD pour L'amorce A12

Le même raisonnement a été mené avec le marqueur A12. Avec ce marqueur, 14 bandes ont été générées dont 12 variables (85,7%).

Tableau 4: Profils de RAPD avec le marqueur A12

individus	Fragments en pb													
	350	420	440	525	575	600	650	700	820	850	900	950	1150	1350
HM1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
HM2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
HM3	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
SF1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
SF2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
SF3	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
GH1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
GH2	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
GH3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
HR1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
HR2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
HR3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
DGN1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
DGN2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
DGN3	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
	V1	C1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13

1 : présence, 0 : absence

Les indices de Jaccard ont été calculés sur base des profils de RAPD (fig. 31).

HM1																	
HM2	0.835																
HM3	0.494	0.483															
SF1	0.422	0.483	0.360														
SF2	0.422	0.483	0.360	1.000													
SF3	0.395	0.442	0.329	0.764	0.764												
GH1	0.582	0.700	0.380	0.380	0.380	0.368											
GH2	0.494	0.593	0.360	0.360	0.360	0.329	0.787										
GH3	0.582	0.700	0.380	0.380	0.380	0.368	1.000	0.787									
HR1	0.430	0.442	0.764	0.329	0.329	0.314	0.368	0.329	0.368								
HR2	0.430	0.442	0.764	0.329	0.329	0.314	0.368	0.329	0.368	1.000							
HR3	0.430	0.442	0.764	0.329	0.329	0.314	0.368	0.329	0.368	1.000	1.000						
DGN1	0.380	0.429	0.476	0.348	0.348	0.294	0.429	0.348	0.429	0.571	0.571	0.571					
DGN2	0.392	0.458	0.403	0.403	0.403	0.328	0.507	0.403	0.507	0.459	0.459	0.459	0.735				
DGN3	0.380	0.429	0.476	0.348	0.348	0.294	0.429	0.348	0.429	0.571	0.571	0.571	1.000	0.735			
	HM1	HM2	HM3	SF1	SF2	SF3	GH1	GH2	GH3	HR1	HR2	HR3	DGN1	DGN2	DGN3		

Figure 31 : Indices de Jaccard calculés entre les cultivars pour le marqueur A12.

Les indices de Jaccard varient de 0,294 (DGN3 et SF3) à 1 (HR1=HR2=HR3 ; DGN1=DGN3, GH1=GH3).

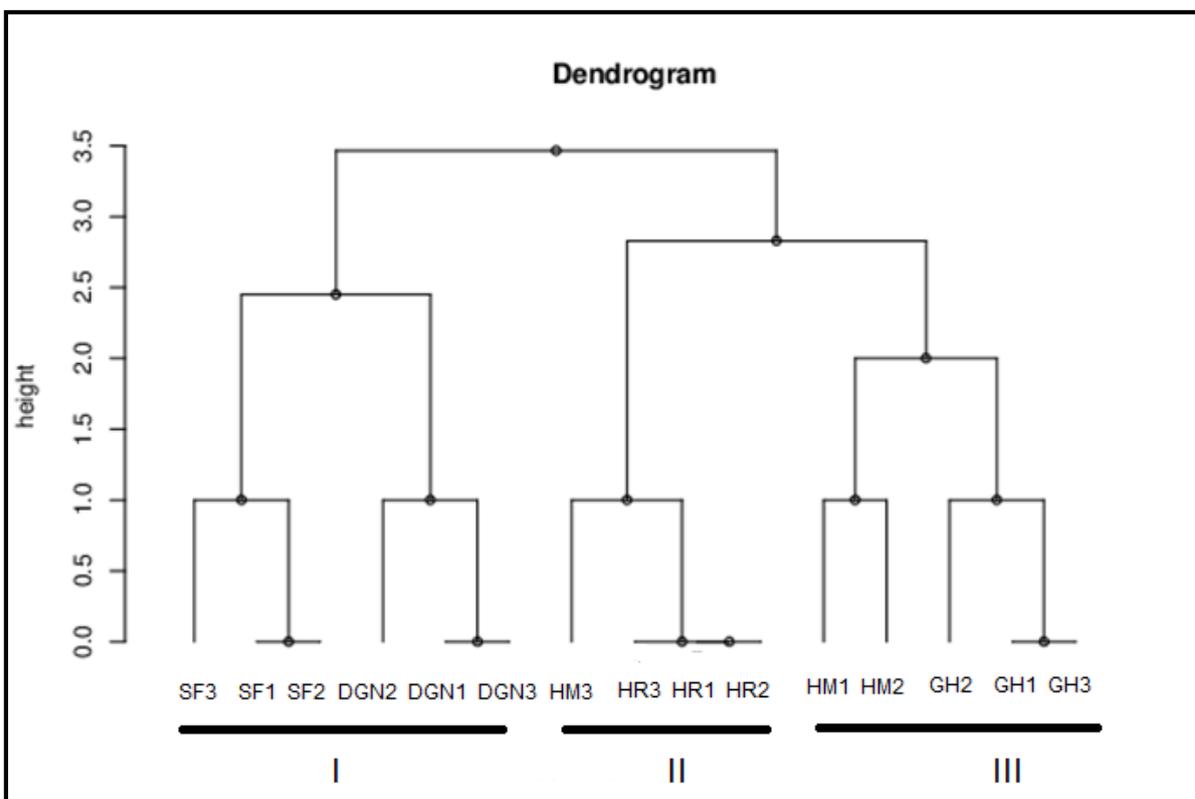


Figure 32 : Dendrogramme en « complete linkage » sur base des profils générés par le marqueur A12.

Le dendrogramme généré sur base des profils provenant de la RAPD A12 révèle 3 groupes (**fig.32**). Le groupe I : regroupe les ADN du cultivar Safray et du cultivar Deglet nour, le groupe II : regroupe les ADN du cultivar Horra et l'ADN de la plante 3 du cultivar Hamray, le groupe III : regroupe les ADN du cultivar Ghars et les ADN 1 et 2 du cultivar Hamray.

Une étude similaire de caractérisation de cultivars de *Phoenix dactylifera* a été menée sur des 13 cultivars venant d'Arabie saoudite (Kalifah et Askari, 2003). La diversité génétique a été étudiée à l'aide de marqueurs RAPD. 37 amorces polymorphes avaient été sélectionnées et ont permis de définir 13 génotypes. L'analyse par grappes avait permis de définir 2 groupes. Le groupe A comprenait cinq cultivars (Shehel, Om-Kobar, Ajwa, Om-Hammam et Bareem) et le groupe B comprenait sept cultivars (Rabeeha, Shishi, Nabtet Saif, Sugai, Sukkary Asfar, Sukkary Hamra et Nabtet Sultan). Le cultivar Barny n'appartenait à aucun des groupes de grappes. Comme prévu, la plupart des cultivars ont une base génétique étroite. La variation détectée parmi les génotypes étroitement apparentés indique l'efficacité des marqueurs RAPD pour l'identification et la construction de cartes de liaison génétique. Notre étude même si elle a été menée sur moins de marqueurs RAPD permet aussi de conclure à l'homogénéité génétique de la plupart des cultivars testés. La facilité de mise en œuvre de la technique RAPD en fait un outil de génotypage utile et efficace même si les résultats ne sont pas facilement reproductibles d'un laboratoire à l'autre dans la mesure où les amplicons générés dépendent des conditions de la PCR. Néanmoins, les tendances générales devraient être les mêmes.

5.3 Combinaison des marqueurs

Si on regroupe tous les marqueurs ensemble et qu'on réalise une analyse combinée, on constate qu'on a une comparaison de 53 bandes dont 40 (75,5%) sont polymorphes.

Le calcul de l'indice de Jaccard (**Fig. 33**) pour l'ensemble des marqueurs indique que celui-ci varie de 0,311 (HR2 et HR3 versus SF1 et SF2) à 1 (HR2=HR3). Ainsi, les 4 marqueurs ne sont pas parvenu à distinguer les individus HR2 et HR3 qui semblent donc fort proches.

HM1															
HM2	0.851														
HM3	0.513	0.462													
SF1	0.422	0.399	0.350												
SF2	0.422	0.399	0.350	1.000											
SF3	0.445	0.415	0.364	0.868	0.868										
GH1	0.705	0.672	0.462	0.408	0.408	0.428									
GH2	0.588	0.564	0.458	0.487	0.487	0.527	0.650								
GH3	0.733	0.697	0.443	0.406	0.406	0.429	0.944	0.672							
HR1	0.418	0.417	0.513	0.343	0.343	0.351	0.391	0.407	0.383						
HR2	0.415	0.414	0.565	0.331	0.331	0.339	0.389	0.398	0.380	0.861					
HR3	0.415	0.414	0.565	0.331	0.331	0.339	0.389	0.398	0.380	0.861	1.000				
DGN1	0.473	0.458	0.395	0.406	0.406	0.400	0.500	0.494	0.480	0.394	0.408	0.408			
DGN2	0.494	0.476	0.393	0.406	0.406	0.400	0.529	0.494	0.507	0.383	0.380	0.380	0.795		
DGN3	0.459	0.445	0.386	0.392	0.392	0.388	0.481	0.477	0.463	0.381	0.392	0.392	0.940	0.751	
	HM1	HM2	HM3	SF1	SF2	SF3	GH1	GH2	GH3	HR1	HR2	HR3	DGN1	DGN2	DGN3

Figure 33 : Matrice des indices de Jaccard pour les différents cultivars sur base des 4 marqueurs génétiques (Biba1, Biba2, A10 et A12).

Si on considère l'analyse du dendrogramme en « complete linkage » pour l'ensemble des marqueurs, (Fig. 34) on peut dégager 4 groupes. Le groupe I comprend les ADN du cultivar Horra et l'ADN 3 du cultivar Hamray. Le groupe II comprend les ADN du cultivar Safray, le groupe III comprend les ADN du cultivar Deglet noir, le groupe IV comprend les ADN du cultivar Ghars ainsi que les ADN 1 et 2 du cultivar Hamray. Si on excepte, HM3 qui semble être différent des autres ADN du cultivar HM, les autres cultivars semblent homogènes avec des ADN qui ségrégent dans le même groupe.

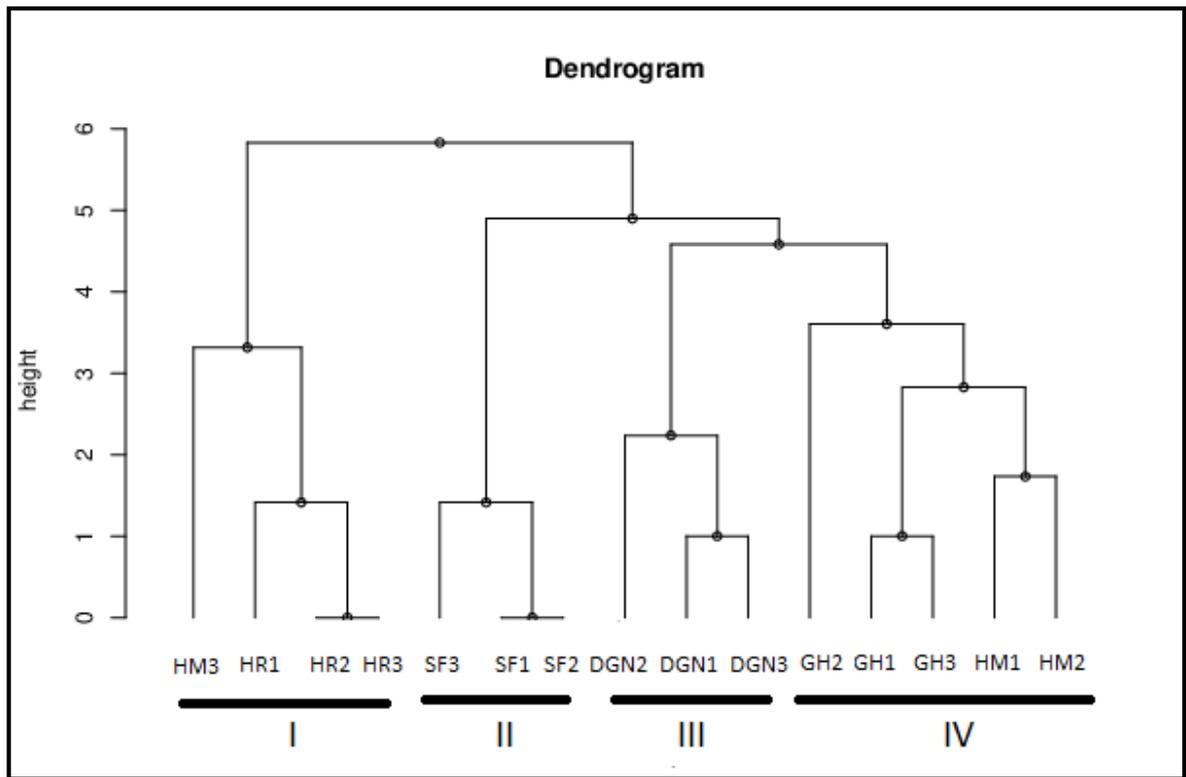


Figure 34: Dendrogramme en « complete linkage » pour l'ensemble des marqueurs génétiques.

5.4 AMOVA

L'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) permet de mesurer la variabilité génétique entre les individus d'une population par rapport à la variabilité entre individus de populations différentes (Excoffier et al., 1992).

5.4.1 Résultats de l'Analyse Moléculaire de la Variance

Matrice de Distance Binaire pour le calcul de PhiPT

15 No. d'individus

5 No. Populations

No. PW Pop

N0 3,000

SSTOT 128,400

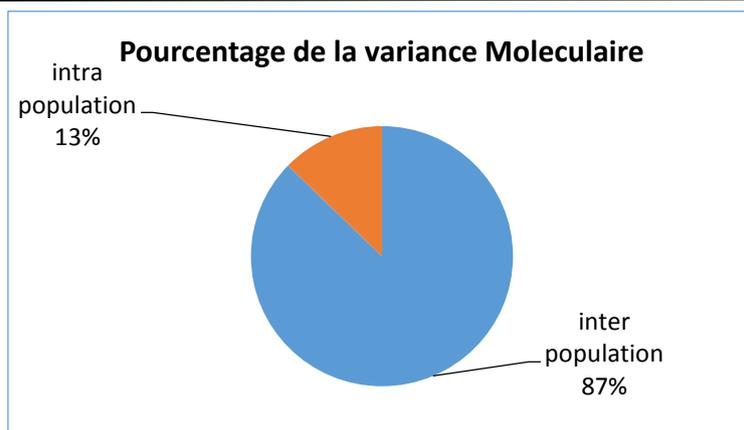


Figure 35 : Résultats de l'Analyse Moléculaire de la Variance

Tableau 5 : Résumé de l'analyse de l'AMOVA

Pop	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5
n	3	3	3	3	3
SSWP	11,333	0,000	2,000	0,000	0,000

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
inter Pops	4	115,067	28,767	9,144	87%
intra Pops	10	13,333	1,333	1,333	13%
Total	14	128,400		10,478	100%

Stat Value P (rand >= data)

PhiPT 0,873 0,001

PhiPT max 0,950

Phi'PT 0,919

Probabilité, P (rand >= data), for PhiPT est base sur permutation standard à travers les résultats.

$$\text{PhiPT} = \text{AP} / (\text{WP} + \text{AP}) = \text{AP} / \text{TOT}$$

Clés: AP = Est. Var. Among Pops (inter pop), WP = Est. Var. Within Pops (intrapop)

Les résultats montrent que la variabilité intra-populations était de 13%, alors que la variabilité entre les populations était de 87%.

6 Conclusion

On peut conclure de cette étude que les cultivars Safray, Delget noir et Horra sont relativement homogènes puisque les individus de ces cultivars ségrégent dans le même groupe. Les résultats pour les individus du cultivar Hamray sont plus contrastés, les individus HM1 et HM2 semblent proches génétiques mais l'individu HM3 est plus proche des individus du cultivar Horra.

La présente enquête a été établie pour examiner la diversité génotypique de certains palmiers dattiers mâles algériens en utilisant l'ISSR et la RAPD, où les résultats obtenus ont montré un large spectre de diversité génétique, confirmant la diversité morphologique précédemment établie par (Benoumane, 2015).

Il était évident, d'après les résultats précédents, que les plants mâles diffèrent grandement par les caractéristiques morphologiques des palmes et des arbres. Ces résultats concordent avec ceux de Nasr et al. (1986) ; et Abo-Rekab (2014), ils ont déclaré qu'il n'y a pas deux palmiers semis semblables et qu'ils avaient des caractéristiques de croissance végétative différentes.

Des données similaires ont déjà été rapportées par Elhoumaizi et al. (2002) ont indiqué une grande diversité phénotypique sur 26 cultivars de palmiers dattiers du Maroc en utilisant 26 paramètres du système végétatif confirmant leur utilité pour l'identification des cultivars avant la période de fructification. De plus, trente caractères végétatifs et reproductifs ont été étudiés pour évaluer le degré global de polymorphisme et détecter les similitudes entre 21 palmiers dattiers de Mauritanie (Ahmed et al., 2011).

L'étude génétique vient confirmer ces données. L'ISSR et la RAPD ont permis de constater (si on excepte HM3) que les individus d'un même cultivar sont plus semblables entre eux qu'avec les individus des autres cultivars. Cependant, même au sein d'un même cultivar il y a une certaine hétérogénéité (si on excepte HR2 et HR3) génétique. L'ISSR implique des marqueurs de type microsattellites qui ne font pas partie de l'ADN codant alors que la RAPD implique indifféremment l'ADN codant ou non codant puisque l'hybridation des amorces se fait au hasard en fonction de l'emplacement des séquences complémentaires. Donc, nos résultats ne permettent pas de savoir si l'hétérogénéité observée concerne des gènes particuliers ou non.

Etude II. Phytochimie et effet antioxydant

1 Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), vivace ligneuse monocotylédone appartenant à la famille des Arecaceae, est l'un des arbres fruitiers les plus anciens et les plus populaires des régions arides et semi-arides de la planète, particulièrement abondant dans les pays du Golfe du Moyen-Orient (Al Harthi et al., 2015). Sa culture est particulièrement importante pour la population vivant dans le Sahara algérien (Mansouri et al., 2005). Ces dernières années, l'Algérie a été le quatrième producteur mondial de palmiers dattiers et le neuvième exportateur mondial (FAO, 2020). Les fruits du palmier dattier sont connus pour leurs multiples effets bénéfiques, en raison de leur teneur élevée en phénols et de leur capacité antioxydante (Daoud et al., 2015). Plusieurs études ont été publiées sur la composition phénolique présente dans les noyaux (Habib et al, 2013 ; Messaoudi et al, 2013 ; Bentradi et al, 2017 ; John & Shahidi, 2019 ; Hilary et al, 2020), et les fruits du palmier dattier (Mansouri et al, 2005 ; Abu-Reidah et al, 2017 ; Khallouki et al, 2018 ; Ma et al, 2019 ; John et al, 2019). Cependant, peu d'informations ont été publiées concernant la composition des polyphénols dans d'autres parties des arbres ou leurs sous-produits (tels que les pennes de palmier dattier et le pollen) (Kriaa et al, 2012 ; Bentradi et al., 2017; Abu-Reidah et al., 2017; Abuelgassim, 2020; Karra et al., 2020). Ces derniers ont également été utilisés dans des produits et formulations pharmaceutiques, car les pennes ont un potentiel antifongique, antioxydant, anti-inflammatoire et antidiabétique (Abuelgassim, 2020). En outre, plus récemment, les extraits de pennes de palmier dattier ont été utilisés comme aliments fonctionnels, étant incorporés à l'alimentation animale, ce qui entraîne de nombreux avantages (Mahrous et al., 2021). Par conséquent, il est intéressant d'étudier la composition de ces sous-produits, afin d'obtenir plus d'informations sur la composition des composés bioactifs présents dans les parties comestibles et non comestibles des palmiers dattiers.

Les études publiées dans la littérature relatives à la teneur totale en polyphénols et l'activité antioxydante des pennes de palmier dattier et du pollen du palmier dattier, correspondent plus précisément, à des variétés cultivées dans des pays tels que la Tunisie (Kriaa et al., 2013), l'Egypte (El-Azim et al., 2015), la Palestine (Abu-Reidah et al., 2017), l'Algérie (Bentradi et al., 2017), et l'Arabie saoudite (John et al., 2019). En ce qui concerne les variétés algériennes, seules deux variétés de pennes (Deglet Nour (DN) et Hamraya (HM)) et un type de pollen (DN) ont été caractérisées auparavant, ce qui génère un manque d'information sur d'autres cultivars importants cultivés en Algérie.

Selon ces rapports, les phénols les plus abondants présents dans les pennes de palmier dattier sont les flavonoïdes (tels que la catéchine et l'épicatéchine) et les acides phénoliques (acides protocatéchique et coumarique, entre autres) (Ziouti et al, 1996; Abu-Reidah et al., 2017; John et

al, 2019), tandis que le pollen est principalement constitué d'une grande quantité d'acides gras (tels que palmitique, linoléique et linolénique) (Bentrad et al., 2017) et de flavonoïdes (Daoud et al., 2015; Abu-Reidah et al., 2017).

Pour déterminer les polyphénols, la technique la plus courante est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), principalement couplée à la détection par spectrométrie de masse (MS) (Habib et al., 2013; Messaoudi et al., 2013 ; Abu-Reidah et al., 2017 ; Hilary et al., 2020), bien que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la MS ait également été utilisée pour caractériser les composés phénoliques. Cependant, au cours des dernières années, la chromatographie liquide bidimensionnelle (LC-2D) est apparue comme une alternative potentielle, car elle est capable de détecter plus de pics par rapport à la LC unidimensionnelle et n'implique pas d'instrumentation très sophistiquée (comme les spectromètres de masse) (Vergara-Barberán et al, 2020).

En mode analytique, également appelé LC × LC, des portions discrètes de l'effluent de première dimension (¹D) sont collectées sur une courte période et transférées une à la fois sur une colonne de la deuxième dimension (²D), où la sélectivité du système doit être différente pour obtenir une bonne orthogonalité (Wilson et al., 2006). Les profils ²D peuvent révéler des modèles de pics similaires pour des groupes fonctionnels d'analytes spécifiques. Il a été démontré que l'utilisation de ²D-LC peut être un outil utile pour établir des profils polyphénoliques des cannes de vigne (Montero et al., 2018), de guabiroba (Grutzmann Arcari et al., 2020), de pennes et de pulpes d'olivier (Vergara-Barberán et al., 2020) et de Brassica juncea (Arena et al., 2020). De plus, les profils polyphénoliques ²D peuvent être utilisés en combinaison avec des statistiques pour classer les échantillons selon différentes catégories, comme l'ont démontré Vergara-Barberan et al (2020). Ces auteurs ont construit un modèle d'analyse discriminante linéaire (LDA) capable de distinguer les pennes d'olivier et les extraits de pulpe selon leur cultivar, en utilisant des profils polyphénoliques obtenus par LC × LC. Les résultats dérivés de ces travaux ont révélé que les empreintes polyphénoliques ²D sont caractéristiques de chaque variété génétique, cette méthodologie étant facilement transférable à d'autres matrices alimentaires ou agronomiques.

L'objectif de la présente étude était d'explorer la composition phénolique des pennes de palmier dattier algérien et du pollen provenant de cinq cultivars différents mâles (Hamray (HM), Safray (SF), Ghars (GH), Horra (HR) et (DN), la plupart d'entre eux pour la première fois. La possibilité de discriminer les différents échantillons en fonction de leur cultivar est également évaluée. À cette fin, trois solvants différents ont été utilisés pour effectuer l'extraction des composés phénoliques des pennes de palmier dattier et du pollen. Ensuite, les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins, ainsi que la capacité antioxydante des échantillons ont été déterminés et comparés. Ensuite,

l'identification et la quantification des principaux phénols présents dans les échantillons ont été réalisées au moyen de la HPLC-MS. De plus, une méthode LC × LC a été développée pour obtenir des empreintes polyphénoliques des différents extraits de penes de palmier dattier, afin de les classer en fonction de leur cultivar à l'aide de LDA.

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel végétal

Les penes fraîches de cinq cultivars différents (HM, SF, GH, HR, DN), provenant de six pieds différents chacun, ont été collectées et analysées séparément. Tous ces 30 arbres étaient situés dans le « Jardin El Firdous » (Biskra, Sud-Est de l'Algérie), tous les échantillons étant prélevés au printemps 2019/2020. Dès réception, 25 penes de chaque arbre ont été mises en commun et traitées comme suit : lavées à l'eau distillée, séchées dans une étuve (UN110 Memmert, Allemagne) à 50°C pendant 24 h et broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine à l'aide d'un broyeur mécanique (IKA werke, GMBH and Co., Allemagne). La poudre obtenue a été stockée à -20°C jusqu'à ce que l'extraction soit effectuée. Par conséquent, un total de 30 échantillons de poudre de penes (6 arbres × 5 cultivars) ont été prélevés pour une analyse plus approfondie. Des échantillons de pollen ont été prélevés sur des spathes mâles fraîches de six arbres différents de cultivar DN, au même endroit indiqué ci-dessus. Quatre spathes ont été collectées pour chaque arbre, les quatre ont été secouées ensemble dans un sac en plastique pour récupérer la poudre de pollen. Le pollen a ensuite été séché et stocké comme spécifié ci-dessus pour les échantillons de penes. Par conséquent, un total de six échantillons de pollen a été obtenu (**Benouamane et al, 2022**).

2.2 Produits chimiques

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH) et l'acétone ont été obtenus de LabKem (Barcelone, Espagne). Le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH, pureté à 95 %) et le chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ont été fournis par Alfa Aesar (Massachusetts, USA). Réactif Folin Ciocalteu phénol, carbonate de sodium (Na_2CO_3), acide formique (FA), acide trifluoroacétique (TFA), acide gallique, quercétine, vanilline et (+)-catéchine, hydroxytyrosol hydraté, acide p-hydroxybenzoïque, acide cinnamique, acide protocatéchique, acide p-coumarique, acide caféique, L'acide chlorogénique, l'apigénine, le kaempferol, le dihydrokaempferol, la rutine et la naringine ont été fournis par Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA). L'acide 3-caffeoylshikimic provenait de ChemFaces Biochemical Co. (Hubei, Chine). L'acide chlorhydrique (HCl, pureté de 37 %) a été obtenu de Panreac (Barcelone). L'eau déionisée a été collectée par un système de purification de l'eau

B30 (Adrona, Riga, Lettonie). Tous les produits chimiques utilisés étaient de qualité chromatographique.

2.3 Extraction des composés phénoliques

Cette étape est influencée par plusieurs facteurs comme la méthode d'extraction, le pH, la température d'extraction, le rapport quantité de matière végétale et volume du solvant. Dans notre étude, Le protocole choisi été la méthode d'extraction (solide-liquide). En effet, cette technique est plus facile, très efficace et peut être largement appliquée.

L'extraction de composés phénoliques à partir des 36 échantillons examinés dans cette étude (30 penes et 6 échantillons de pollen) a été effectuée selon la méthode de macération adoptée par **Dzoyem et al (2014)**, à l'aide de trois solvants différents : acétone, MeOH et EtOH. Brièvement, une portion de 10 g de chaque matière végétale en poudre broyée a été extraite avec 100 ml du solvant correspondant, agitée pendant 30 min avec un agitateur magnétique à température ambiante, puis centrifugée à 4000 x g pendant 10 min (centrifugeuse Nahita 2749, AUXILAB S.L, Espagne). Le résidu a été ré-extrait deux fois successifs dans les mêmes conditions, les trois surnageant obtenus étant combinés. Après avoir filtré avec du papier filtre Whatman No. 1, le filtrat a été séché sous vide à 50°C dans un évaporateur rotatif (Buchi R-100, Flawil, Suisse) pour éliminer le solvant jusqu'à l'obtention d'un extrait brut qui sera ensuite conservé à -20°C jusqu'à analyse.

2.4 Calcul du Rendement

Les extraits bruts secs ont été pesés et le rendement a été calculé comme suit :

$$\text{Rendement \%} = \frac{W1}{W2} \times 100$$

Où

W1 : la masse de l'extrait avec les différents solvants après évaporation,

W2 : la masse initiale de l'échantillon de penes fraîches ou de pollen.

Les résultats obtenus pour les échantillons considérés sont repris au tableau 5.

Pour une analyse ultérieure, 10 mg d'extrait brut sec ont été dissous dans 10 ml de MeOH, sauf pour l'analyse chromatographique, dans laquelle 3 mg de chaque extrait ont été dissous dans 200 µL de MeOH (15µg/mL). Enfin, tous les extraits ont été filtrés par des filtres à seringue en nylon de 0,22 µm.

2.5 Détermination de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH

Le Principe : Le DPPH est un radical libre stable de couleur violette de formule brute $C_{18}H_{12}N_5O_6$ et de masse molaire 394,33 g/mol, utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules suite aux stress internes ou externes. En présence d'un antioxydant, se réduit à la forme hydrazine en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Akroum, 2011).

L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de piégeage de radical DPPH selon la méthode mentionnée par Karra et al. (2020), pour cela, nous avons préparé six différentes concentrations (2-50 et 200-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pour les échantillons de pennes et de pollen, respectivement). Dans une cuve de 2.5mL, un aliquote de 500 μL d'extrait à différentes concentrations ont été ajoutés à 375 μL d'EtOH et à 125 μL de solution de DPPH (0,02 % d'EtOH) comme source de radicaux libres. Après 60 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du DPPH restant (pourcentage d'inhibition, IP) a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis Hach Lange DR6000 (Düsseldorf, Allemagne).

Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition des radicaux libres calculée comme suit :

$$\text{IP \%} = \frac{(A.\text{blank} - (A.\text{sample} - A.\text{control}))}{A.\text{blank}} \times 100$$

Où

A. blank : est l'absorbance de 500 μL de MeOH, 125 μL de solution DPPH-EtOH et 375 μL d'EtOH ;

A. sample : est l'absorbance de 500 μL d'extrait, 125 μL de solution DPPH-EtOH et 375 μL d'EtOH,

A. control : est l'absorbance de 500 μL d'extrait avec 500 μL d'EtOH.

L'activité antioxydante a été exprimée en IC_{50} (mg/ml) (concentration de l'échantillon qui cause une inhibition de 50 % du radical DPPH) (Sanchez, 2002). Cette valeur a été calculée à partir du graphique obtenu en traçant le PI par rapport aux concentrations de l'extrait. Pour tous les échantillons, l'essai a été effectué en trois exemplaires.

2.6 Dosage des polyphénols totaux (PPT)

L'estimation de la teneur en composés phénoliques totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, décrite par Teow et al. (2007) avec une légère modification, qui est un mélange de complexes des acides phosphotungstène ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphomolybdène ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) de couleur jaune qui va être réduit lors de l'oxydation des composés phénoliques en donnant un complexe molybdène-tungstène de couleur bleu (Boubekri, 2014). Un aliquot de chaque

extrait a été mélangé avec 5 mL d'eau distillée. Ensuite, on a ajouté 0,5 mL de réactif Folin-Ciocalteu et on a laissé le mélange réagir à température ambiante pendant 3 minutes. Après ce temps, on a ajouté 0,5 mL de Na_2CO_3 à 7,5 % et le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 60 minutes. L'absorbance a été mesurée à 760 nm.

Une courbe d'étalonnage standard de l'acide gallique ($0,05$ - $0,4$ mg mL^{-1}) a été utilisée, en parallèle, pour déterminer la concentration (PPT). Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique par un Gramme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS). Chaque essai a été répété trois fois.

2.7 Détermination de la teneur des Flavonoïdes totaux (FT)

Les flavonoïdes donnent avec le chlorure d'aluminium des complexes de couleur jaune, dont l'intensité est mesurable à un spectrophotomètre à UV (**Donzo et al, 2015**).

La détermination des (FT) a été déterminée d'après l'essai colorimétrique décrit par Gursoy et al. (2009) avec peu de modifications.

Brièvement, 0,5 mL de chaque extrait a été mélangé avec 0,5 mL de MeOH ; ensuite, 1 mL d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 % dissous dans la MeOH) a été ajouté, et le mélange obtenu a été laissé pendant 10 minutes dans l'obscurité à une température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 415 nm par rapport à un blanc préparé avec 1 mL de MeOH et 1 mL de solution d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

La concentration des FT a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie par la quercétine comme standard ($0,0$ - $0,05$ mg mL^{-1}). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de quercétine par un Gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS). Tous les extraits ont été mesurés en triple.

2.8 Dosage des tanins condensés (TCT)

En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-ols libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présentés dans le milieu (**Ghedadba et al, 2015**).

Le dosage des (TCT) a été estimé en utilisant la méthode adoptée par Heimler et al (2006) avec de modifications. Dans cette méthode, 400 μL de chaque extrait ont été mélangés avec 3 mL de solution de vanilline à 4 % (préparée dans MeOH) et 1,5 mL de HCl à 37 %. Le mélange obtenu a été incubé pendant 15 minutes dans l'obscurité, et l'absorbance a été mesurée à 500 nm. Une courbe d'étalonnage (+)-catéchine ($0,1$ - $0,4$ mg mL^{-1}) a été utilisée pour estimer la quantité totale des tanins

condensés, exprimée en mg d'équivalents (+)-catéchine par un Gramme de matière végétale sèche (mg CE/g MS). Tous les extraits ont été mesurés en trois exemplaires.

2.9 L'analyse chromatographique HPLC-MS

Les composés phénoliques dans les échantillons étudiés ont été identifiés par analyse *HPLC-MS*, effectuée sur un chromatographe Agilent 1260 LC Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) et un système AB SCIEX TripleTOF™ 5600 (AB SCIEX, Foster City CA, USA). Les conditions chromatographiques utilisées pour la séparation des polyphénols ont été adaptées de la littérature (Kalili & Villiers, 2011). Plus précisément, une colonne Acquity UPLC BEH C18 (2,1 mm 50 mm, 1,7 µm) (Waters, Barcelona) et un gradient H₂O (A) et de MeOH (B), avec 0,1 % (v/v) de FA, ont été utilisés.

Un programme de gradient a été appliqué en variant les proportions de A et de B comme suit : 0-2 min, 10 % B ; 2-13 min, une augmentation de B à 100 % ; 13-15 min, 100 % B ; enfin, la colonne a été équilibrée avec la composition initiale pendant 15 min. La température de la colonne a été maintenue à 25 °C, avec un débit de 0,4 mL min⁻¹, et un volume d'injection de 5 µL.

Le système MS fonctionnait en mode ion négatif dans l'intervalle de *m/z* 80-1200 en utilisant la méthode d'acquisition avec survey scan type (TOF-MS) et dependent scan type (produit ion) avec information dependent acquisition (IDA). Les conditions de SM étaient les suivantes : énergie de collision, 50 V ; declustering potential, 90 V ; tension de pulvérisation d'ions, -4200 V ; gaz de source d'ions 1 et 2, 50 psi ; curtain gas, 25 psi ; température de séchage, 400 °C ; temps d'accumulation, 100 ms. L'étalonnage automatisé a été effectué à l'aide d'un système d'étalonnage externe (calibrant delivery system, CDS). Les données HPLC-MS ont été traitées à l'aide du logiciel PeakView™ (AB SCIEX). Les solutions étalons de polyphénol comprises dans (Annexe II) ont été préparées dans le méthanol et analysées par HPLC-MS pour obtenir des courbes d'étalonnage comprises entre 0,005 et 40 mg L⁻¹. The limit of detection (LOD) et limit of quantification (LOQ) de la méthode HPLC-MS étaient 0.0016 et 0.005 mg L⁻¹, respectivement.

2.10 LC×LC Analysis

Pour la première dimension (¹D), un système HPLC de la série 1260 (Agilent Technologies) a été utilisé, équipé d'un échantillonneur automatique, d'une pompe binaire, d'un dégazeur à vide en ligne, d'un compartiment à colonne thermostatique et d'un détecteur UV à barette de diode (DAD). La colonne du ¹D était connectée à l'entrée de 8-port/2- vanne de commutation de position (1290 series, Agilent Technologies) qui a permis l'injection de fractions d'échantillon (deux boucles d'échantillonnage identiques de 40 µL) dans la seconde dimension (²D), composé d'un système

HPLC série Agilent 1290, équipé d'une pompe binaire, d'un dégazeur, d'un compartiment de colonne thermostatique et d'une DAD.

Dans la méthode LC×LC optimisée, les composés polyphénoliques ont été séparés en ¹D en utilisant une colonne Ascentis™ RP-amide (100 mm 2,1 mm i.d., 3 μm, Análisis Vínicos, Tomelloso, Espagne). Les gradients ont été obtenus en mélangeant de H₂O (A) et de l'ACN (B), chacun contenant 0,14 % (v/v) d'FA. Le gradient optimisé du ¹D était le suivant : 0-50 min, 5-40 % B ; 50-65 min, 40-70 % B, 65-66 min, 70-100 % B ; 66-80 min, 100 % B. Enfin, une étape de rééquilibrage a été appliquée durant 10 minutes pour atteindre les conditions initiales.

Le volume d'injection était de 10 μL, la température de la colonne était fixée à 40 °C et le débit était réglé à 0,2 mL min⁻¹. Pour la ²D, une colonne de Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm 3 mm, 1,8 μm, Agilent, USA), et des gradients H₂O (A) et d'ACN (B), contenant à la fois 0,05 % de TFA (v/v) ont été utilisés. L'élution a été réalisée avec un gradient décalé. La température de la colonne était réglée à 50°C, et le débit était réglé à 2,5 ml min⁻¹. La vanne était automatiquement actionnée après chaque cycle de modulation de 12 secondes. La détection UV a été effectuée à 280 ± 4 nm et 80 Hz, pour les deux dimensions.

Les conditions optimales ont été obtenues après avoir tester plusieurs colonnes pour les deux dimensions. Pour la ¹D : la colonne Ascentis™ RP-amide (100 mm × 2.1 mm i.d., 3 μm, Análisis Vínicos), Kinetex PS C18 (50 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), et Kinetex F5 (PFP, 50 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm, Phenomenex). Pour la ²D : Kinetex F5 (PFP, 50 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 μm, Phenomenex) et Zorbax Eclipse Plus C18 column (50 mm × 3 mm i.d., 1.8 μm).

2.11 Acquisition, traitement des données brutes LC et construction de modèles LDA

Les données ont été acquises à l'aide d'un ChemStation Agilent MSD (C.01.07 SR2) et traitées avec le logiciel GC Image LC×LC (version 2.4, GC Image, LLC, Lincoln, NE, USA).

L'identification de chaque composé est établie en comparant les temps de rétention et les spectres UV-Vis des pics dans l'échantillon extrait avec ceux obtenus par l'injection des standards. Pour sélectionner les pics communs dans différents chromatogrammes, le fichier de données LC×LC (chromatogramme) a été corrigé à l'aide du logiciel GC Image. Les rapports de pics/volume ont été utilisés pour créer des modèles LDA (à l'aide de SPSS) capables de classer les pennes de palmiers dattiers en fonction de leurs cultivars. LDA est une technique de classification supervisée, qui est considérée comme un excellent outil pour obtenir des vecteurs à la distance maximale entre un

ensemble de catégories précédemment définies. Plus de $N-1$ les vecteurs discriminants sont créés, N étant la valeur la plus faible parmi le nombre de prédictors et les catégories des palmiers dattiers selon leurs cultivars.

La sélection des prédictors pour la construction des modèles LDA a été effectuée à l'aide de l'algorithme stepwise SPSS, avec Wilks' lambda (λ_w) utilisée comme critère de sélection. Les valeurs de λ_w proches de zéro correspondent à des catégories bien résolues, tandis que les valeurs proches de 1 correspondent à des catégories superposées.

D'après l'algorithme stepwise, un prédictor est inclus dans le modèle si la valeur de λ_w après son inclusion ne dépasse pas une valeur présélectionnée, F_{in} (le seuil d'entrée d'un test de comparaison

des variances, F_{test}). L'inclusion d'un nouveau prédictor modifie l'importance des prédictors déjà présents dans le modèle. Après l'inclusion d'un nouveau prédictor, un seuil de rejet, F_{out} , est utilisé pour décider de supprimer d'autres prédictors du modèle, laissant la variance inchangée en utilisant les valeurs F_{in} et F_{out} présélectionnées. Le processus se termine lorsqu'aucun autre prédictor n'est entré ou retiré du modèle. Les valeurs de probabilité $F_{in} = 0,001$ et $F_{out} = F_{out}$ ont été adoptées.

3 Analyse Statistique

Les différentes techniques statistiques, telles que l'ANOVA one-way et les corrélations de Pearson, ont été réalisées pour évaluer les données obtenues à partir des différents cultivars et les solvants d'extraction. Les deux études ont été réalisées à l'aide du progiciel statistique pour les sciences sociales (SPSS, version 19.0, Chicago, Illinois, États-Unis). Les différences ont été considérées statistiquement significatives pour un niveau de signification $p \leq 0.05$.

4 Résultats et discussion

4.1 Résultats de rendement des extractions des composés phénoliques

Les rendements d'extraction des pennes et du pollen étudiés obtenus par différents solvants, ont fait l'objet de quelques analyses phytochimiques, présentes dans le tableau 5, L'extraction a été répétée six fois et les extraits sont ensuite combinés, les valeurs représentent des moyennes. Les extraits méthanoliques (MeOH) et éthanoliques (EOH) sont récupérés sous forme de poudre, par contre ceux d'acétone (Act) été sous forme de pâte collante.

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, que les extraits du pollen donnent les meilleurs rendements d'extraction soit 21 ± 2 , 18.2 ± 1.3 , 20 ± 2 % obtenus respectivement par

l'acétone, méthanol et l'éthanol où l'acétone enregistre le pourcentage le plus élevé, cela correspond aux résultats obtenus par (Mahmoudi, 2013) qui confirment que l'acétone est le meilleur solvant d'extraction (19,29 % en moyenne).

Concernant les pennes ; l'acétone a donné des rendements qui varient entre 13.1 ± 0.6 à $16.8 \pm 1.2\%$ pour, respectivement, les cultivars DN et HR, alors que pour les cultivars GH, HM et SF prennent des valeurs intermédiaires de 12.7 ± 0.7 , 13.9 ± 0.9 et $15.1 \pm 1.0\%$.

Tableau 6: Rendement d'extraction en phénols solubles, activité antioxydante (IC50), PPT, FT et TC des extraits de pennes et du pollen de différents cultivars de palmier dattier extraits à l'aide de différents solvants :

Type	Cultivar	Extraction solvent	Rnd soluble phenolics* (%)	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	TCTC (mg CE/g DW)
Pennes	HM	Acetone	13.9±0.9	17±1.2 aA	85±5 aA	90±2 aA	520±20 aA
	SF		15.1±1.0	23.7±0.9 aA	94±5 aA	96±4 aA	158±4 aB
	GH		12.7±0.7	21.0±0.8 aA	70±4 aAB	73±2 aB	184±6 aB
	HR		16.8±1.2	40.6±0.8 aB	55±4 aB	62±2 aB	238±12 aC
	DN		13.1±0.6	9.5±0.3 aC	120±6 aC	93±4 aA	480±20 aA
Pollen	DN		21±2	500±30 a	20±4 a	12.7±1.2 a	ND
Pennes	HM	Methanol	16.2±0.8	17.6±1.6 aA	172±18 bA	50.1±1.3 bA	200±11 bA
	SF		12.5±1.8	18.64±0.16 aA	180±40 bA	68±2 bA	114±5 bB
	GH		14.3±1.6	20.92±0.10 aA	79±12 aB	64±2 aA	151±8 bAB
	HR		15.3±1.2	45.6±0.8 aB	59±9 aB	24.0±1.3 aB	44±2 bC
	DN		11.9±0.9	12.2±0.2 aA	170±20 bA	61.9±1.7 bA	244±13 bA
Pollen	DN		18.2±1.3	3600±900 b	7±0.9 b	7.2±1.2 b	ND
Pennes	HM	Ethanol	15.1±1.3	13.7±1.6 aA	69±9 aA	47±3 bA	211±8 bA
	SF		15.6±1.4	18.3±0.4 aA	56±5 aA	75±3 bB	163±11 bA
	GH		14.4±0.6	16.6±0.8 aA	71±9 aA	71±3 aB	180±7 cA
	HR		13.8±0.7	45±3 aB	55±4 aA	45±2 aA	106±9 cB
	DN		18.1±1.0	13.7±0.5 aA	89±5 cA	60±2 bAB	301±15 aC
Pollen	DN		20±2	2200±300 b	13±2 c	5.2±0.9 b	ND

*Rendement calculé comme la moyenne de 6 extraits pour chaque type d'échantillon.

Les valeurs (moyenne ± écart-type, n = 18) suivies de différentes lettres minuscules entre les extraits obtenus avec différents solvants pour la même variété sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Les valeurs (moyenne ± écart-type, n = 18) suivies de différentes lettres majuscules entre les extraits obtenus de différentes variétés utilisant le même solvant sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Abbreviations : TPC = total phenolic content ; TFC = total flavonoid content ; TCTC = total condensed tannins' content ; ND = No détecté.

D'après les résultats obtenus par le méthanol, nous avons constaté que les pennes du cultivar HM donne le meilleur pourcentage de rendement par rapport aux d'autres cultivars ($16.2 \pm 0.8\%$), suivi par HR, GH, SF et DN.

Tandis que les rendements obtenus par l'éthanol, le cultivar DN présente la valeur la plus élevée avec $18.1 \pm 1.0\%$, suivi par SF, HM, GH avec 15.6 ± 1.4 , 15.1 ± 1.3 , 14.4 ± 0.6 , alors qu'il semble que le cultivar HR détient le pourcentage le plus faible avec $13.8 \pm 0.7\%$.

Plusieurs facteurs influencent le rendement d'extraction, la méthode d'extraction utilisée où la macération semble être la meilleure méthode d'extraction des polyphénols totaux, la pureté des solvants utilisés, les conditions de stockage de la matière végétale (**Mohammedi, 2013**). L'étude faite sur la même plante, rapporte des rendements d'extraction similaires à ceux que nous avons trouvés, à savoir 16.50, 19.12, 15.64 % pour l'extrait méthanolique de GH, HM et DN (**Louini, 2014^b**).

4.2 Caractérisation des pennes et du pollen des différents cultivars du palmier dattier en termes de composés polyphénoliques

Les échantillons de pennes et de pollen des pieds mâles Algériens étudiés, ont été caractérisés en termes d'activité antioxydante, de PTT, de FT et de TC. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

4.2.1 Activité antioxydante piégeage du radical libre DPPH

Tous les extraits de pennes ont présenté une activité antioxydante de modérée à élevée, avec des valeurs IC_{50} comprises entre $9,5 \pm 0,3$ et $45,6 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ pour le test DPPH, similaires à celles précédemment rapportées dans la littérature (**Eddine et al., 2013^a**) et supérieures même au standards BHT ($IC_{50} = 11.7 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$). D'après les résultats, nous avons constaté que le cultivar DN est celui qui présente la plus forte activité antioxydante avec les trois solvants utilisés (valeurs comprises entre $9,5 \pm 0,3$ et $13,7 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), l'extrait du cultivar HR étant qui a fourni la plus faible activité antioxydante ($40,6 \pm 0,8$ à $45,6 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Pour le même cultivar, il n'y a pas de différences significatives ($p < 0,05$) lors de l'utilisation des trois différents solvants d'extraction.

Cette différence d'activité antioxydante est peut être expliquée par la nature des constituants que renferment ces extraits organiques ainsi que la polarité des solvants utilisés.

D'autre part, les échantillons de pollen ont montré une faible capacité antioxydante (500 ± 30 à $3600 \pm 900 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ceci peut être expliqué par l'absence des substances actives ou l'extrait brut n'a pas été bien dissous dans le solvant (voir Annexe I).

4.2.2 Polyphénols totaux

En ce qui concerne les PTT, les valeurs des extraits de penne étaient comprises entre 55 ± 4 et 180 ± 40 mg EAG/g MS. Parmi les cultivars, DN, SF et HM sont ceux qui ont attribués les valeurs de PTT les plus élevées, en revanche, les cultivars GH et HR étant ceux qui présentaient les valeurs les plus faibles pour tous les solvants considérés. D'autre part, MeOH est le solvant d'extraction qui a donné la meilleure performance pour tous les cultivars. Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment rapportés pour les penne de palmier dattier (**Kriaa et al., 2012 ; Eddine et al., 2013 ; Qadoos et al., 2017 ; John et al., 2019 ; Abuelgassim, 2020**). Dans le cas des extraits de pollen, des PTT plus faibles ont été obtenus pour tous les solvants ($7 \pm 0,9$ à 20 ± 4 mg EAG/g MS) par rapport à ceux obtenus pour les penne. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés précédemment par (**Daoud et al., 2015**) pour les cultivars kerkennah et tozeur. Des différences significatives ($p > 0,05$) sont observées entre les cultivars au sein du même solvant et entre les solvants d'extraction, excepté pour l'éthanol.

4.2.3 Flavonoïdes totaux

D'autre part, les résultats des FT des penne ont montré des valeurs variant entre $24,0 \pm 1,3$ et 96 ± 4 mg EQ/g MF (voir Tableau 6). Parmi les différents cultivars, SF est celui qui a retenu les valeurs de FT les plus élevées pour les trois solvants, la quantité des flavonoïdes extraite pour ce cultivar en utilisant l'acétone (96 ± 4 mg EQ/g MS) est significativement plus élevée ($p < 0,05$) que celles obtenue avec MeOH et EtOH (68 ± 2 et 75 ± 3 mg EQ/g MS, respectivement).

Pour tous les cultivars, l'acétone est le solvant qui a fourni le FT le plus élevé par rapport à MeOH et EtOH. Les valeurs obtenues sont supérieures à celles rapportées par (**Abuelgassim, 2020**) ($1,3$ à $2,2$ mg EQ/g MS), mais inférieures à celles publiées par Kriaa et al. (**Kriaa et al., 2012**) (150 à 320 mg EQ/g d'extrait méthanolique) ce fait peut être expliqué, probablement, par les conditions environnementales dans lesquelles la plante pousse comme l'ensoleillement. Comme prévu, pour les extraits de pollen, les valeurs étaient assez faibles ($5,2 \pm 0,9$ à $12,7 \pm 1,2$ mg EQ/g MS) par rapport à celles obtenues pour les extraits de penne, étant similaires à celles précédemment rapportées (**Daoud et al., 2015 ; Bentréd et al., 2017**).

4.2.4 Tanins condensés

D'après les résultats de l'analyse colorimétrique par spectroscopie UV-visible, les valeurs de TC sont comprises entre 44 ± 2 et 520 ± 20 mg EC/g MS, qui sont généralement plus élevées que celles publiées par (**Kriaa et al., 2012**) pour les extraits méthanoliques (59 à 119 mg EC/g d'extrait végétal). Parmi les différents cultivars, HM et DN ont possédé les valeurs les plus élevées pour tous les solvants (respectivement 200 ± 11 à 520 ± 20 et 244 ± 13 à 480 ± 20 mg EC/g MS). Parmi les différents solvants,

en général, la meilleure performance a été obtenue avec l'acétone, suivie de l'EtOH et du MeOH, où des différences significatives ont été observées entre les cultivars en utilisant les trois solvants organiques ($p < 0,05$). La présence de tannins condensés dans les extraits de pollen n'a pas été détectée cela est peut être due aux conditions géographiques, le type de cultivar ou quantité de la matière végétale utilisée pour l'extraction, la fertilisation, type de sol, la quantité du soleil reçu.

Ensuite, une analyse de corrélation a été réalisée entre les résultats obtenus pour les différents tests. Lorsque la corrélation de la capacité antioxydante (valeurs IC_{50}) avec les scores obtenus avec les autres tests (PPT, FT et TC) a été évaluée, une bonne corrélation négative a été observée, fournissant des coefficients de corrélation de Pearson (r) de -0,497, -0,648 et -0,47, respectivement. Ces valeurs confirment la contribution des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tanins à l'activité antioxydante des pennes et du pollen du palmier dattier. Enfin, la corrélation entre la teneur des différents types de composés, dans ce travail, a également été évaluée. Dans ce cas, des valeurs (r) de 0,517 (PPT - FT), 0,433 (PPT - TC) et 0,753 (FT - TC) ont été obtenues, montrant une corrélation assez forte entre le contenu de ces composés. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés précédemment (**Kriaa et al., 2012**).

4.3 Analyse de Chromatographie liquide de haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange. Tous les extraits de pennes et de pollen ont été caractérisés par HPLC-MS. Les composés phénoliques identifiés dans ces deux types d'échantillons sont répertoriés dans le tableau 7. Comme on peut le voir dans ce tableau, un total de 21 composés a été identifié dans les pennes, tandis que le nombre de composés dans le pollen de palmier-dattier était de 23. Les composés identifiés étaient principalement des acides phénoliques (comme les acides p-coumarique et caféique), des flavonols et des flavones (comme la lutéoline et la rutine), et des flavan-3-ols (comme la catéchine et l'épicatéchine). Ces résultats sont conformes à ceux publiés précédemment (**Abu-Reidah et al., 2017** ; **John et al., 2019**). En outre, divers composés polyphénoliques ont été quantifiés dans les extraits de pennes et de pollen de palmier dattier obtenus avec les trois solvants (voir Annexe II). Comme observé pour tous les cultivars, en général, le meilleur solvant pour l'extraction des polyphénols était le méthanol, suivi de l'éthanol et de l'acétone, mais sans différence significative. De plus, la teneur en polyphénols des extraits de pennes était plus élevée que celle trouvée pour les extraits de pollen, comme prévu compte tenu des données précédemment rapportées dans la littérature (**Nešović et al., 2021**). En ce qui nous concerne, aucun travail n'a été publié rapportant les contenus polyphénoliques individuels des pennes de palmier dattier. Cependant, les contenus trouvés dans ce travail étaient plus

élevés que ceux rapportés dans les fruits et les noyaux du palmier dattier (Hazli et al., 2019 ; Yuan et al., 2020).

Tableau 7: La liste des composés phénoliques identifiés dans les pennes et le pollen de palmier dattier.

Les composés possibles	m/z	Pennes	Pollen
<i>Simple phenols</i>			
Hydroxytyrosol	153.0	Oui	Non
<i>Phenolic acids and derivatives</i>			
p-Hydroxybenzoic acid	137.0	Oui	Non
Cinnamic acid	147.0	N	Oui
Protocatechuic acid	153.0	Oui	Non
p-Coumaric acid	163.0	Oui	Oui
Caffeic acid	179.0	Oui	Oui
Protocatechuic acid 4-O-glucoside	315.1	Oui	Non
3-caffeoylshikimic acid	335.1	Oui	Oui
Chlorogenic acid	353.1	Non	Oui
<i>Flavonols, flavones et derivés</i>			
Apigenin	269.1	Non	Oui
Kaempferol/luteolin	285.0	Oui	Oui
Dihydrokaempferol	287.1	Non	Oui
Gliricidin/3-O-methylorobol	299.1	Non	Oui
Quercetin	301.2	Non	Oui
Isorhamnetin	315.1	Oui	Non
Apigenin-7-O-beta glycopyranoside	431.1	Non	Oui
Lutolein-7-O-glucoside	447.1	Non	Oui
Isorhamnetin-3-O-hexoside	477.4	Oui	Oui
Chrysoeriol 7-hexose	461.1	Oui	Non
Quercetin-3-O-hexoside	463.1	Oui	Oui
Quercetin-3-O-hexosyl(6-sulfate) (Q-3-Hx(6Sulft))	543.2	Non	Oui
Isorhamnetin-3-O-(6-malonyl) hexoside	563.1	Oui	Non
Apigenin di-C-hexoside/luteolin-7-O-derivatives	593.2	Oui	Oui
Rutin	609.1	Oui	Oui
Isorhamnetin-3-O-rhamnoside-hexoside (I-3-(2Rh)Hx)	623.2	Oui	Oui
Quercetin-3, 7-di-O-hexoside	625.1	Oui	Oui
Quercetin 3-O-glucosyl-rhamnosyl-galactoside/ quercetin 3-O-	771.2	Oui	Non
Quercetin-3-(2Hx)Hx-7-Hx	787.2	Non	Oui
isorhamnetin-3-(6Hx)Hx-7-Hx	801.2	Non	Oui
<i>Flavanones</i>			
Naringin	579.2	Non	Oui
<i>Flavan-3-ols</i>			
4-Ethylcatechol	137.0	Oui	Non
Catechin+epicatechin	289.0	Oui	Oui
<i>Anthocyanidins</i>			
Proanthocyanidin dimer	577.1	Oui	Non

4.3.1 Choix des conditions de séparation LC×LC

L'extrait méthanolique des pennes du cultivar GH a été utilisé pour optimiser les conditions de séparation ¹D et ²D des composés polyphénoliques. À cette fin, trois phases stationnaires ont été testées pour la première dimension ¹D : RP-amide, C18 et PFP (voir la section Analyse LC×LC). Ces phases ont été sélectionnées en considérant que la RP-amide (**Mattonai et al., 2016**) et la PFP (**Verardo et al., 2015**) ont été utilisées précédemment et avec succès dans l'analyse des composés polyphénoliques de différentes matrices alimentaires, en fournissant des performances chromatographiques élevées en raison de la rétention efficace de ces composés via des interactions π - π entre les électrons délocalisés dans les analytes et le groupe phényle dans la phase stationnaire (**Ancillotti et al., 2018**). D'autre part, les phases stationnaires C18 ont été utilisées pour la détermination d'un grand nombre de polyphénols présents dans différentes parties du palmier dattier (fruits, pennes, grappes et pollen) (**Abu-Reidah et al., 2017 ; Khallouki et al., 2018**). Les colonnes analysées (RP-amide, C18 et PFP) avaient le même diamètre (2,1 mm), mais des longueurs (100, 50 et 50 mm) et des tailles de particules (3,0, 2,6 et 2,6 μm) différentes, respectivement.

Pour la première dimension ¹D, le gradient de phase mobile a été optimisé pour les trois colonnes testées en utilisant de l'ACN et de H₂O, tous les deux contenant 0,14% de FA. Le gradient optimal a été sélectionné en prenant en considération le plus grand nombre de pics dans les chromatogrammes. Les meilleurs résultats obtenus pour chacune des trois colonnes testées sont présentés dans la figure 35. Comme on peut le voir, la meilleure performance a été obtenue en utilisant la colonne RP-amide (**Fig. 36-A**), puisqu'un grand nombre de composés polyphénoliques peuvent être détectés, suivie par les colonnes PFP et C18. Ensuite, les colonnes RP-amide et PFP ont été sélectionnées comme candidates pour l'analyse ¹D, tandis que la colonne C18 n'a pas été considérée comme adéquate pour une analyse LC x LC ultérieure, car aucun profil clair n'a été obtenu. Il convient de mentionner que le débit lent utilisé (0,2 mL min⁻¹) a mené à des temps d'analyse longs (80 min) pour toutes les colonnes.

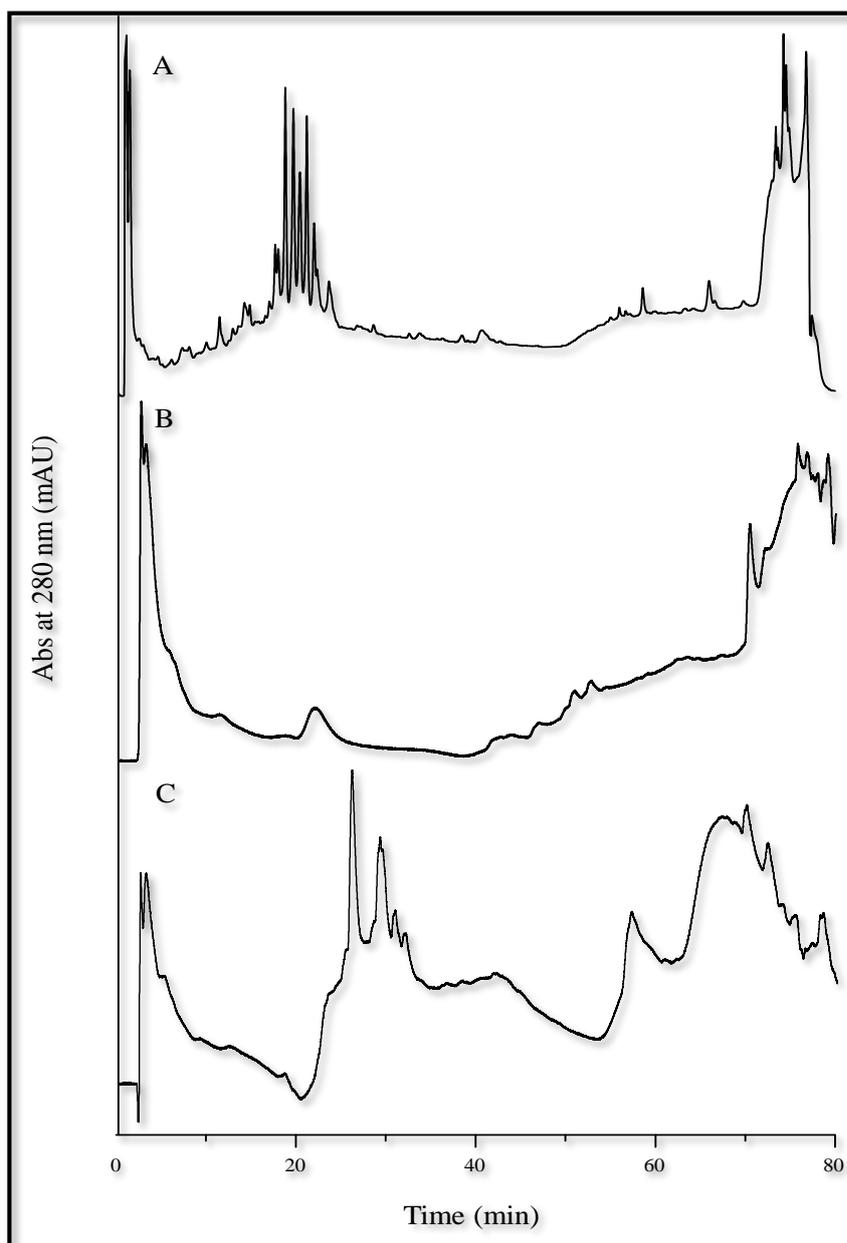


Figure 36: 1D-LC chromatogrammes montrant le profil polyphénolique dans l'extrait méthanolique de penes de cultivar GH obtenus avec les colonnes the Ascentis™ RP-amide (A), Kinetex PS C18 (B) et PFP Kinetex F5 (C). Phase Mobile : eau et ACN contenant 0.14% FA

Ascentis™ RP-amide gradient : a été indiqué dans la section analysis LCxLC.

PFP Kinetex F5 gradient : 0–5 min, 20–50% ACN ; 5–10 min, 50% ACN ; 10–15 min, 50–60% ACN ; 15–25 min, 60% ACN ; 25–26 min, 60–80% ACN ; 26–36 min, 80% ACN ; 36–61 min ; 80–100% ACN ; 61–80 min, 100% ACN.

Kinetex PS C18 gradient : 0–15 min, 30% ACN ; 15–60 min, 30–100% ACN ; 60–80 min, 100% ACN.

Ensuite, pour l'optimisation des conditions 2D , les colonnes RP-amide et PFP (utilisées en 1D) ont été combinées avec deux colonnes différentes dans la dimension 2D (voir Analyse LC \times LC) : Kinetex F5 PFP et Zorbax Eclipse Plus C18, les deux dimensions sub-micro, fortement recommandées pour fournir des gradients rapides avec des efficacités élevées (Cacciola et al., 2020 ; Vergara-Barberán et al., 2020). La première expérience a été réalisée avec la colonne PFP (2,6 μm) en 1D et la colonne C18 (1,8 μm) en 2D (combinaison PFP \times C18 ; aucune expérience n'a été réalisée avec des colonnes PFP dans les deux dimensions). Les débits étaient de 0,2 et 2,5 mL min^{-1} pour les colonnes PFP et C18, respectivement. Le gradient initial décalé en 2D est représenté sur la figure 37-A ainsi que le chromatogramme en 2D résultant (fig. 37-B). Comme on peut le voir sur cette figure, dans la région 1D de 20-40 min, les pics n'ont pas été suffisamment élués dans 12 secondes du cycle 2D , et sont apparus dans la partie centrale et supérieure du cycle. Cependant, en réajustant le pourcentage d'ACN le long de la séparation 2D (Fig. 37-C), les pics ont été correctement élués, apparaissant dans la partie centrale de la région 2D . Cela a également permis la résolution des pics entre 50 et 60 min. Dans ces conditions optimisées, un total de 56 pics a été détecté (Fig. 37-D). Ces pics ont été sélectionnés après avoir soustrait la ligne de base du signal, en utilisant un seuil de volume de pic détecté de 25 unités d'absorbance par min

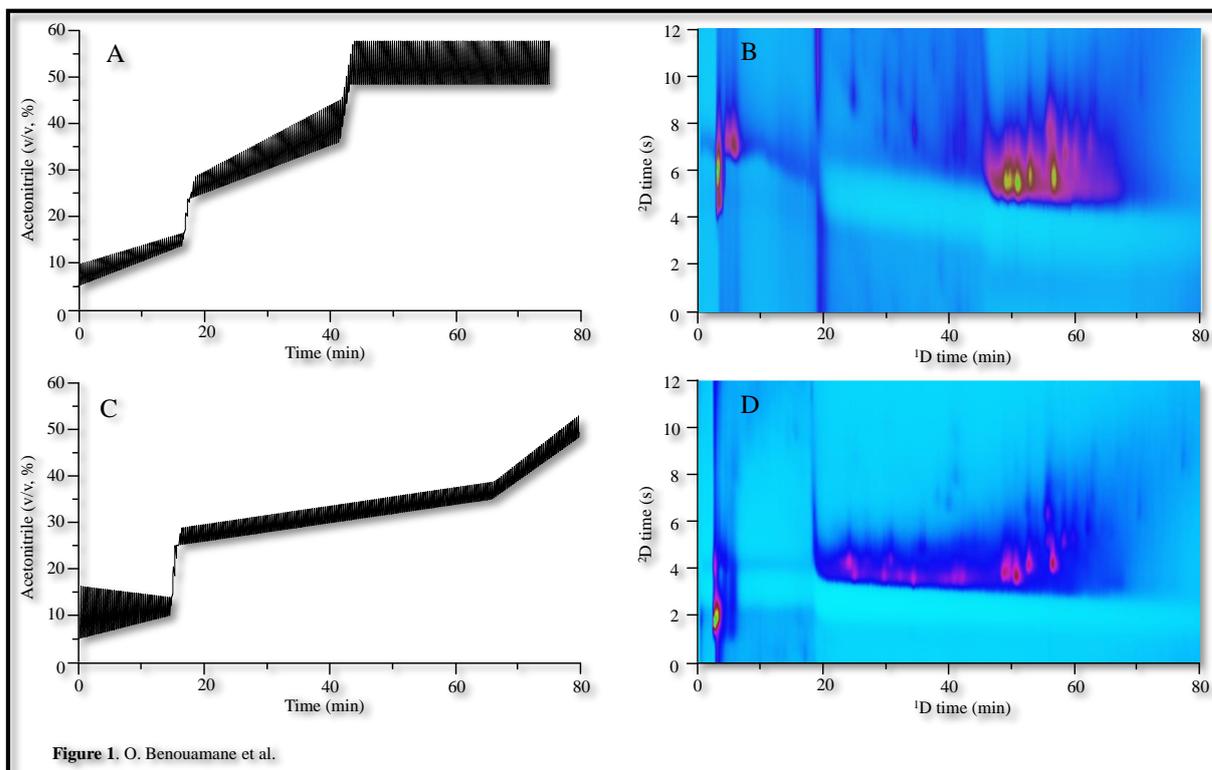


Figure 37: Initial (A) et optimisé (C) ACN-H₂O gradients modifié utilisé en 2D séparation des composés polyphenoliques dans l'extrait méthanolique des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes PFP \times C18, avant (B) et après optimisation complète (D). 1D gradient mentionné en (Fig. 36).

En utilisant RP-amide dans la ¹D dimension, les deux colonnes (C18 et PFP) ont été testées dans la dimension ²D. Les résultats obtenus pour la première combinaison (RP-amide×C18) sont présentés dans la Fig. 38. Avec le gradient initial testé (Fig. 38-A), les pics des composés polyphénoliques entre 10 et 30 min (¹D) n'étaient pas bien résolus, puisqu'ils apparaissaient en haut de l'espace LCxLC, éluant au début d'un nouveau cycle ²D (voir Fig. 38-B). Par conséquent, le gradient décalé ²D a été ajusté comme indiqué dans la Fig. 38-C. Dans ces conditions, les analytes ont été bien résolus et distribués dans toute la région ²D (voir Fig. 38-D). Dans ce cas, un total de 145 pics a été observé.

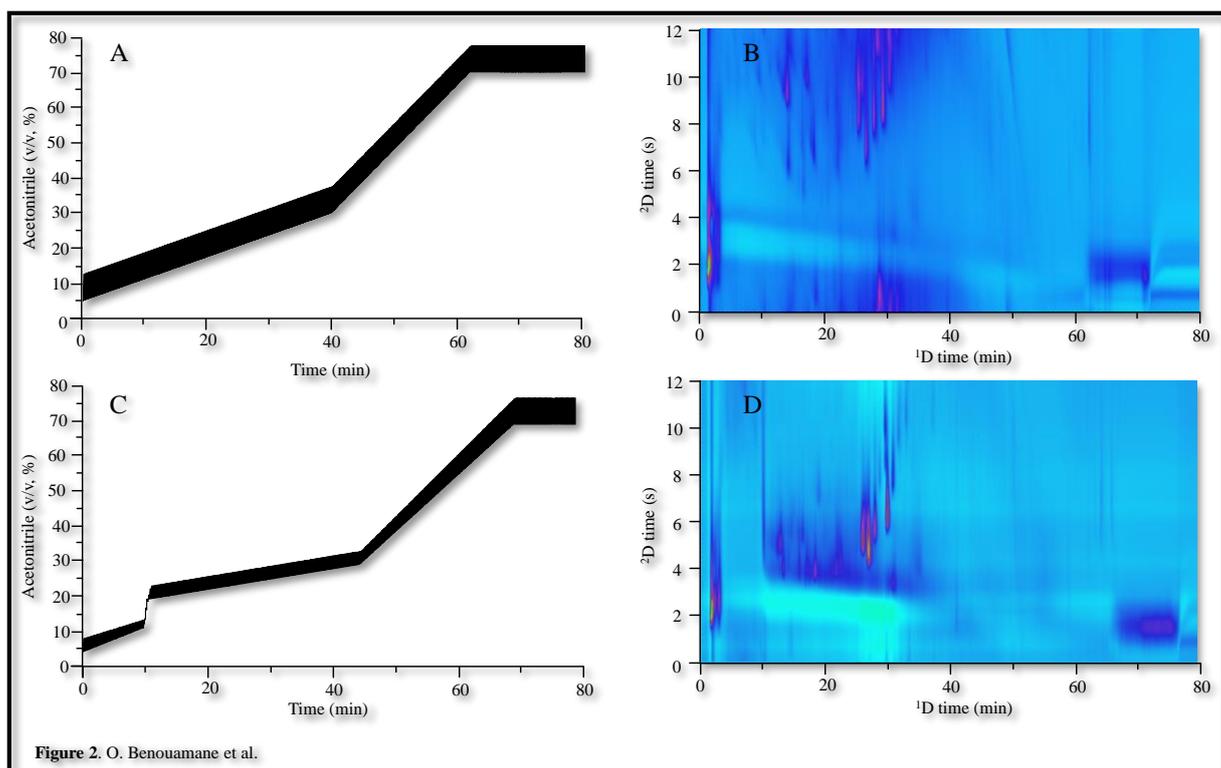


Figure 38: Optimisation de la séparation LCxLC des composés polyphénoliques des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes the RP-amide×C18.

Enfin, les résultats obtenus avec la combinaison RP-amide×PFP sont présentés dans la Fig 39. Le gradient initial (Fig. 39-A) a donné une séparation médiocre, car la plupart des composés polyphénoliques de l'échantillon ont coelué (Fig. 39-B). Après avoir ajusté la teneur en ACN dans l'intervalle de 15 à 80 min (Fig. 39-C), aucune amélioration n'a été obtenue. Cette combinaison a permis de détecter seulement 90 polyphénols (Fig. 39-D).

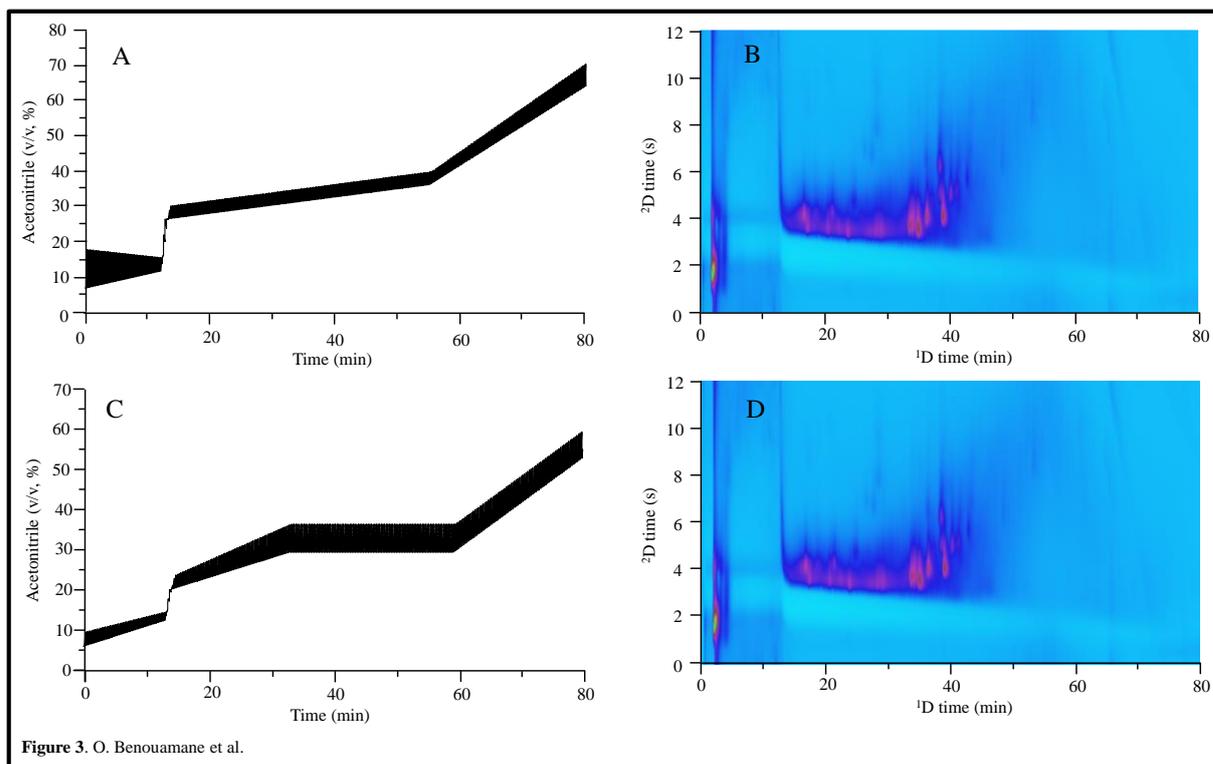


Figure 39: Optimisation de la séparation LCxLC, des composés polyphénoliques des pennes du cultivar GH, en utilisant la combinaison des colonnes the RP-amide×PFP.

Selon les résultats ci-dessus, la combinaison RP-amide×C18 (Figs. 38-C et D), qui a fourni la meilleure séparation *LC x LC* et le plus grand nombre de pics détectés, elles ont été sélectionnées pour une analyse plus détaillée des extraits de pennes et de pollen de palmier dattier obtenus à partir des différents cultivars.

4.3.2 Profils des fractions polyphénoliques des pennes de palmier-dattier de différents cultivars par LC×LC

Différentes études ont montré que les profils chromatographiques *LC x LC* peuvent être utilisés pour discriminer entre les échantillons de différents cultivars, car ils fournissent une grande quantité d'informations sur des matrices complexes (Kula et al., 2016 ; Montero et al., 2018 ; Vergara-

Barberán et al., 2020). Par conséquent, le potentiel de cette technique pour classer les pennes de palmier dattier en fonction de leurs cultivars sera exploré. À cette fin, en utilisant la combinaison optimale de colonnes $LC \times LC$ (RP-amide \times C18), les extraits polyphénoliques de toutes les pennes ont été analysés. Des chromatogrammes $LC \times LC$ représentatifs, un pour chaque cultivar de pennes inclus dans cette étude, sont présentés dans la fig.40. Le nombre de pics détectés pour chaque cultivar, en utilisant les trois différents solvants, est figuré dans le tableau 8.

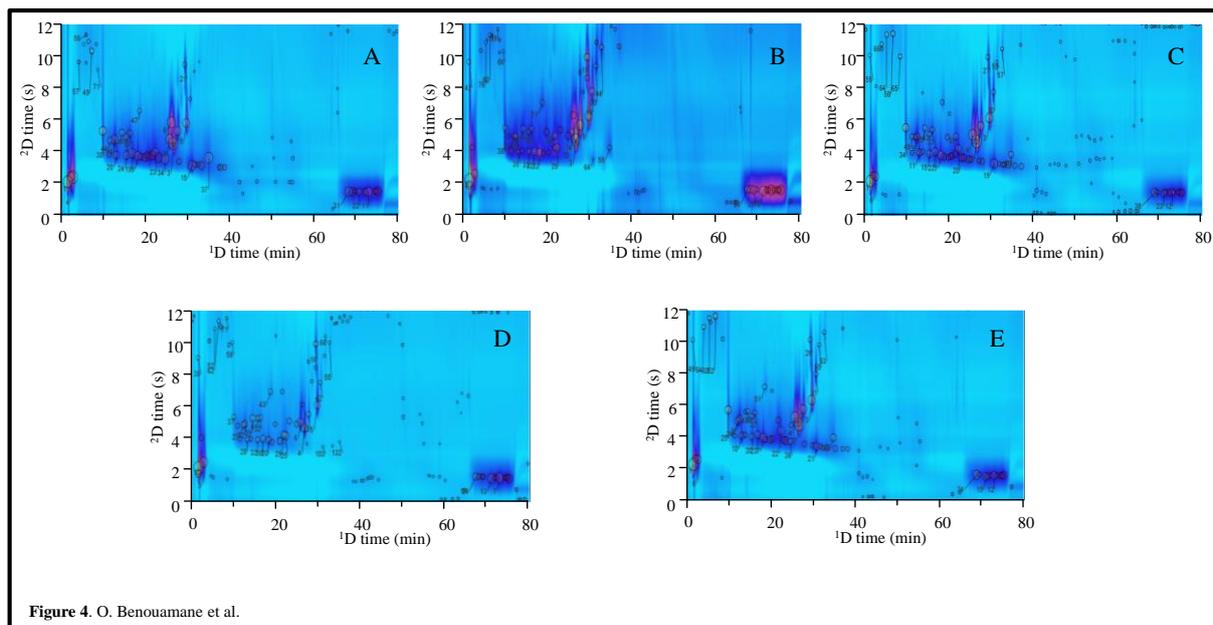


Figure 40: Chromatogrammes représentatifs $LC \times LC$ montrant les profils des composés polyphénoliques de HM (A), SF (B), GH (C), HR (D) et DN (E) des extraits méthanoliques des pennes.

Tableau 8: Le nombre de pics détectés dans les conditions optimisées LC×LC pour tous les échantillons de penes du palmier dattier inclus dans cette étude

Pennes des cultivars	solvant d'extraction	Nbr. pics détecté
HM	Acetone	75
	Methanol	78
	Ethanol	78
SF	Acetone	83
	Methanol	96
	Ethanol	80
GH	Acetone	152
	Methanol	149
	Ethanol	106
HR	Acetone	133
	Methanol	134
	Ethanol	125
DN	Acetone	90
	Methanol	103
	Ethanol	93

4.3.3 Classification des pennes de palmier dattier en fonction de leurs cultivars à l'aide de LDA

Les pics détectés pour tous les échantillons analysés ont été comparés, et ceux qui ont eu le même temps de rétention dans les deux dimensions ont été sélectionnés pour la construction du modèle LDA. Un total de 33 pics communs a été trouvé (voir les pics marqués d'un numéro dans les chromatogrammes de la **fig. 40**). Pour la construction du modèle LDA, les rapports de volume des pics ont été utilisés comme prédictors au lieu des volumes des pics, car ils ont l'avantage de mettre en évidence les petites divergences (écarts) entre les composants, tout en tenant compte dans une certaine mesure des variations associées au processus d'extraction. Ces rapports de volume ont été calculés en divisant le volume de chaque pic obtenu à partir du chromatogramme *LCxLC* par chacun des volumes des autres pics. De cette façon, et en considérant que chaque paire de pics ne doit être considérée qu'une seule fois, le nombre de rapports de volume non redondants disponibles pour être utilisés comme prédictors était de $(33 \times 32) / 2 = 528$.

Ensuite, en utilisant les 528 rapports de volume comme prédictors, un modèle LDA capable de classer les pennes de palmier dattier en fonction de leur cultivar a été construit. Pour cela, une matrice de données contenant 90 objets (5 cultivars x 6 arbres x 3 solvants d'extraction) et les 528 prédictors a été construite. Une colonne de réponses catégorielles a été ajoutée à cette matrice, contenant les cinq catégories correspondant aux cinq cultivars. Ensuite, la matrice a été divisée en deux groupes, correspondant aux ensembles d'entraînement et d'évaluation. L'ensemble d'entraînement a été constitué à partir de 75 objets, correspondant à 15 objets choisis au hasard pour chaque cultivar (15 x 5), tandis que l'ensemble de validation était constitué des 15 objets restants (3 pour chaque catégorie). Une bonne résolution entre les cinq catégories a été obtenue, lorsque le modèle LDA a été construit (Fig. 5, $\lambda_w = 0.116$). L'algorithme SPSS stepwise a sélectionné un total de 15 prédictors (sur 528) comme ensemble optimal avec la plus grande capacité discriminante. Les coefficients standardisés des fonctions discriminantes pour ces 15 prédictors sélectionnés sont présentés dans (l'Annexe III). Enfin, en ce qui concerne la capacité de prédiction du modèle, tous les objets inclus dans l'ensemble d'évaluation (représentés par des croix sur la **fig.41**) ont été correctement classés avec une probabilité supérieure à 95 %.

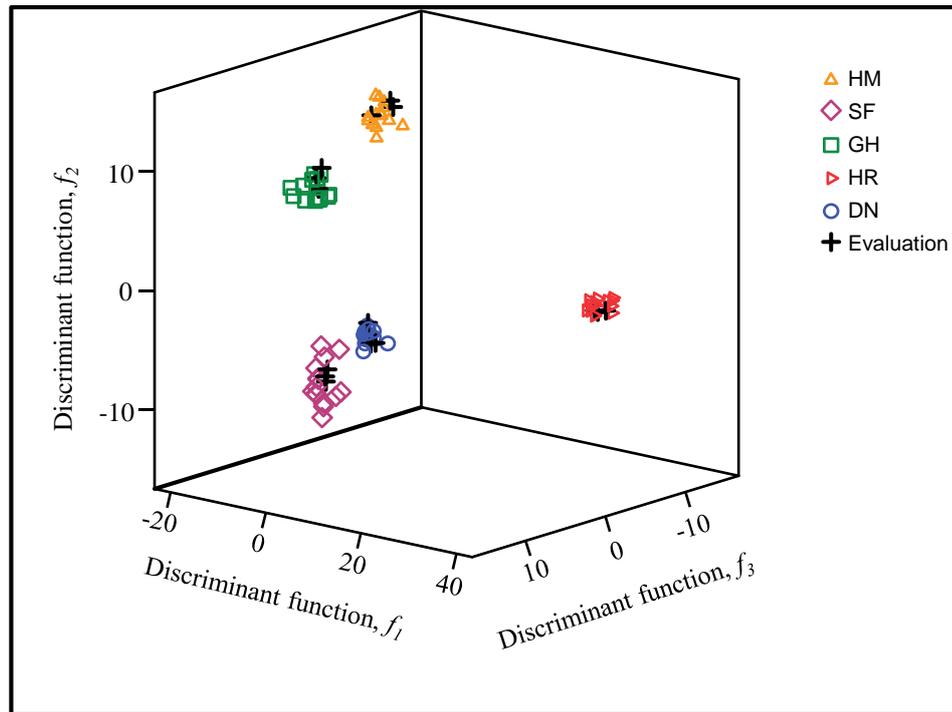


Figure 41: Score plot sur un plan oblique l'espace tridimensionnel défini par les trois premières fonctions discriminantes du modèle LDA, construit pour classer les penes du palmier dattier selon leurs cultivars. Les échantillons évalués sont étiquetés avec un symbole en croix.

5 Conclusion

Cette étude est la première qui rapporte la composition chimique, des propriétés antioxydantes des extraits de pennes et de pollen provenant des pollinisateurs Algériens.

Sur la base des résultats obtenus, on peut conclure que la présente étude a clairement confirmé que tous les extraits de pennes et de pollen étudiés, possédaient un pouvoir antioxydant et des valeurs élevées de PPT, FT et TC, ces valeurs étant plus élevées pour les pennes que pour les échantillons de pollen. En outre, les résultats dérivés de l'étude de corrélation ont révélé de bonnes relations entre les valeurs IC_{50} , PPT, FT et TC pour tous les cultivars étudiés.

Les meilleures valeurs de ces paramètres ont été obtenues en général pour le cultivar DN, sans différences significatives entre les trois solvants testés pour l'extraction des polyphénols.

DN a attribué les valeurs de PPT les plus élevées, le MeOH est le meilleur solvant d'extraction.

Le cultivar SF est celui qui a retenu les valeurs de FT les plus supérieures pour les trois solvants. Alors que pour les TC, HM et DN ont possédé les valeurs les plus significatives pour tous les solvants.

Il ressort que, l'acétone est considéré comme un meilleur solvant pour extraire les flavonoïdes et les tannins condensés, alors que le méthanol est, fortement, recommandé pour les polyphénols.

L'activité antioxydante qui est associée aux composés phénoliques présentent dans les extraits des cultivars y compris, principalement, les acides cinnamiques, les flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) ayant un effet thérapeutique et jouent un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres.

En utilisant la HPLC-MS, un total de 21 et 23 composés polyphénoliques ont été identifiés pour les extraits de pennes et de pollen de palmier dattier, respectivement, principalement attribués aux acides phénoliques, aux flavonols, aux flavones et à leurs dérivés. L'analyse LC×LC a fourni des empreintes polyphénoliques caractéristiques pour chaque cultivar, utiles pour la classification des échantillons. La comparaison des profils polyphénoliques LC×LC a montré 33 pics en communs pour tous les échantillons, qui ont été sélectionnés pour une analyse statistique. Par conséquent, les pennes de palmier dattier de cinq cultivars ont été correctement classés (probabilité 95 %) à l'aide des modèles LDA.

D'après les résultats, on peut déduire que les pennes et le pollen du palmier dattier de tous les cultivars peuvent être considérés comme une bonne source alternative d'antioxydants naturels et que le cultivar DN qui semble être intéressant pour des usages multiples technologiques, la cosmétique, la dermatopharmacie et l'agroalimentaire. Des travaux supplémentaires devraient être effectués sur

l'isolement et l'identification des composants dans les extraits, en particulier dans l'extrait de MeOH. En outre, l'examen de l'activité antioxydante, des activités antidiabétiques et hypertensives, *in vivo*, doivent être étudiée sur des modèles expérimentaux.

Etude III. Activité antibiotique

1 Introduction

L'humanité est menacée par différentes maladies infectieuses causées par des micro-organismes. L'homme n'a jamais cessé de chercher des moyens pour contrôler les infections notamment en utilisant la médecine naturelle (**Shakibaa, et al., 2011; Etebu, 2016**).

Au cours des dernières décennies, la résistance bactérienne est devenue de plus en plus aiguë en raison de l'augmentation du nombre de souches bactériennes résistantes aux médicaments. C'est l'une des principales difficultés du traitement, basée sur les antibiotiques, médicaments synthétiques, modification des voies génétiques et métaboliques, qui sont coûteux et causent également des effets secondaires indésirables. Cette résistance peut être due : à l'inactivation de l'antibiotique, à son expulsion par des mécanismes de pompe, à la modification de la cible à la suite de mutations. Les gènes de résistance peuvent être transférés d'une bactérie à une autre par transfert horizontal (conjugaison, transduction, transposition) (**Shakibaa et al., 2011**).

Le pouvoir antimicrobien des plantes médicinales est connu depuis l'antiquité, l'intérêt croissant pour la santé publique a conduit à étudier leurs propriétés thérapeutiques qui sont devenues une source essentielle de nouveaux composés bioactifs peu coûteux, efficaces et sans effets secondaires majeurs (**Kahkashan et al., 2012, Bentradi et al., 2017**). D'après l'Organisation mondiale de la Santé, les plantes sont une source de substances antimicrobiennes (fongicides, antibiotiques) principalement les composés phénoliques (**El kalamouni, 2010**).

Chaque partie du palmier joue un rôle important dans la prévention contre les maladies bactériennes. Néanmoins, la plupart des études portaient sur le fruit. L'effet antimicrobien sur les germes à Gram positif et à Gram négatif a été établi sur trois variétés algériennes, où les extraits dichloro-méthaniques ont donné un pourcentage d'inhibition plus élevé par rapport aux extraits alcooliques (**Daas, 2009**).

Cependant, peu de travaux sont publiés sur l'effet antibactérien des pennes et du pollen du palmier dattier. L'étude de la capacité antibactérienne et antifongique des extraits de pennes de trois variétés algériennes (Deglet nour, Ghars et Hamray) a montré une inhibition de la croissance pour *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Ptytophthora nicotina*, *Candida albicans* et *Pyrenophora teres* (**Laouni et al, 2014**).

Des importantes études établies par Bokhari et al, Vayalil et al (2012) et Abdul Maged et al (2013), en l'Arabie Saoudite et en Irak, ont montré que les extraits organiques des pennes et des noyaux peuvent être utilisés dans l'inhibition du développement de *F. oxysporum*, *Fusarium* sp., *F.*

solani, et *Alternaria* sp et *A. alternata* aussi exhibent une bonne activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexenerii*, *Staphylococcus aureus*.

Les différents parties de *P. dactylifera* cultivés en Iran a été étudié à savoir le noyau, les pennes, pollen, spathe et les racines, ils ont prouvé leur pouvoir anti-infection notamment sur les bactéries à Gram positive (**Shakibaa et al., 2011**). Des extraits de *P. dactylifera* ont montré une activité antibactérienne significative contre les bactéries Gram positif et Gram négatif où *E. coli* été la plus sensible (**Bentrad et al., 2017 ; Karra et al., 2020**), cela grâce à leur niveau élevé de flavonoïdes et en composés phénoliques comme l'acide gallique, la catéchine, l'acide caféique, l'epicatéchine, l'acide vanillique, la coumarine, la quercitine et la rutine (**Daoud et al., 2015**).

Malgré cet important flux de données sur les propriétés prometteuses que renferme l'Algérie, aucune étude n'a encore été réalisée pour explorer la prospérité antibactérienne des pennes et du pollen des pieds mâles.

Dans ce contexte, cette partie de l'étude a été réalisée dans le but d'évaluer, *in vitro*, et à comparer, pour la première fois, les propriétés antibactériennes des extraits de pennes et du pollen de quelques pollinisateurs Algériens du palmier dattier, en utilisant divers solvants, y compris l'acétone, l'éthanol et le méthanol, contre quatre bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*) et quatre Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*) en utilisant la méthode de dilution et la diffusion de disque. Qui peuvent être appliquées dans la médecine, l'agro-alimentaires et de la biotechnologie sans effets secondaires et efficaces contre de nombreuses bactéries pathogènes.

2 Matériel et méthodes

2.1 Réactifs chimiques

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), le méthanol (MeOH) et l'éthanol (EOH) ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Chimie S.a.r.l, Saint-Quentin-Fallavier, France), l'acétone absolu 99,9% a été fourni par (VWR International S.A.S (Rosny-sous-Bois, France), la gélose Mueller Hinton (MHA) et le bouillon Mueller Hinton (MHB) ont été obtenus auprès de Biokar (Solabia group, Pantin, France). Les disques de Gentamicine 30 µg (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). L'Agar nutritionnel (NA) (Biokar, Pantin, France).

2.2 Matériel végétal

Dans notre étude, des pennes fraîches de palmier dattier ont été prélevées manuellement à partir de cinq pollinisateurs, les mêmes pieds des cultivars qui ont fait l'objectif d'étude de Magister, à savoir : Hamray, Safray, Ghars, Horra et Deglet Nour ainsi que le pollen qui ont été collecté au cours de la période du printemps de l'année 2017- 2018 au sein du verger d'El firdaous situé dans la région d'Ourel - Biskra (34°51'00 N 5°44'00 W). Les échantillons ont été rincés à l'eau, séchés pendant 24 heures à 50°C dans l'étuve (Memmert UN110, Schwabach, Allemagne), puis broyés en fine poudre à l'aide d'un broyeur mécanique IKA A10 (IKA werke, Staufenim Breisgau, Allemagne) et tamisé. En fonction de la disponibilité pendant la période de pollinisation, le pollen a été collecté uniquement pour le cultivar Deglet Nour (DN). Quatre spathes fraîches ont été secouées, manuellement, dans un sac en plastique pour récupérer le pollen des fleurs, puis séchées pendant 24h à 50°C dans l'étuve pour éliminer l'humidité et prévenir les altérations microbiennes. Enfin, tous les échantillons ont été stockés à +4°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 42 : Broyage et tamisage des pennes



Figure 43 : Séchage du pollen

2.3 Micro-organismes testés

Les souches pathogènes utilisées sont parmi ceux qui causent les maladies les plus courantes et qui provoquent ainsi des infections importantes. Les huit souches bactériennes testées dans cette étude ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie du Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides (CRSTRA, Biskra, Algérie). Quatre de ces bactéries sont Gram positif ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152) *Enterococcus faecalis*, tandis que les quatre autres sont des bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 13182), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Salmonella enterica enterica* (ATCC 14028). Les souches pathogènes utilisées causent des maladies gastro-intestinales les plus courantes ainsi des infections importantes.

2.4 Activité antibactérienne des extraits de plantes

2.4.1 Préparation des extraits et disques

Les différents extraits de plantes ont été préparés suivant la méthode de macération comme décrite par (**Dzoyem et al. 2014**), en utilisant l'acétone, le méthanol et l'éthanol comme solvants. Brièvement, 10 g de matériel végétal en poudre ont été mise en contact trois fois séparément avec 100 ml de solvant pendant 30 min ; la solution a ensuite été centrifugée pendant 10 min à 4000 x g. Chaque extrait a ensuite été filtré sur un papier filtre (Whatman n°1). À l'aide d'un évaporateur rotatif (The R-100 BUCHI, Suisse), le filtrat a été séché sous vide en vaporisant le solvant à 50°C. A une concentration initiale de 100 mg/ml, les extraits bruts ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 2,5 %, homogénéisés (**fig. 45 ; A-B**), stérilisés par microfiltration à travers un filtre à membrane de 0,45 µm (Merck Millipore, USA) et conservés dans des tubes en verre stériles à +4°C jusqu'à leur utilisation (**fig. 46**). Des disques de 6 mm de diamètre ont été découpés par un papier (Whatman n° 1) et autoclavés pendant 15 minutes à 121°C. Les disques ont été conservés dans des boîtes de Pétri stériles jusqu'à leur utilisation.

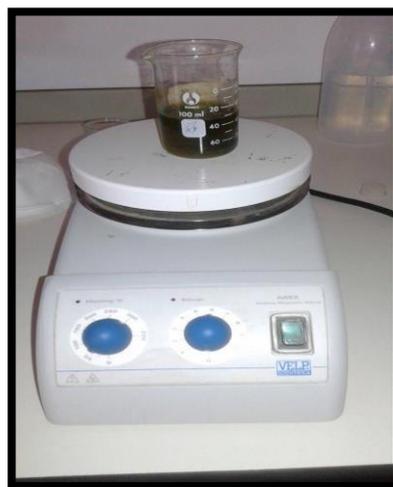
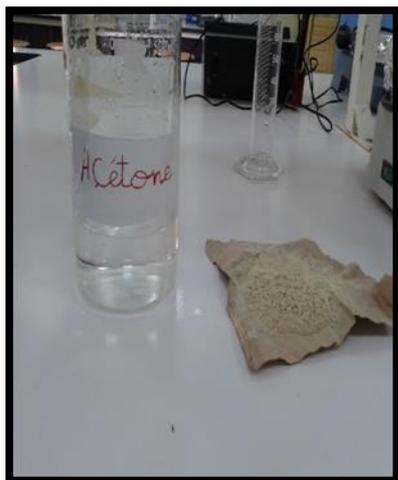


Figure 44 : Préparation des solutions organiques des pennes et pollen



Figure 45 : Préparation des extraits bruts des pennes et de pollen avec DMSO



Figure 46 : Stérilisation des extraits à travers un filtre à membrane

2.4.2 Analyse antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits a été réalisée selon la méthode de diffusion sur disque telle que décrite par (Karra et al., 2020) avec quelques modifications.

2.4.2.1 Préparation d'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (milieu gélose nutritive) ayant au maximum 24h, à l'aide d'une pipette pasteur scellée, on racle quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne (Makhloufi, 2010).

Les souches bactériennes ont été cultivées sur des géloses nutritives (NA) à partir de suspensions congelées de tampon phosphate glycérol. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24 heures. Des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau stérile physiologique et ajustées à 0,5 unité McFarland. En présence de bec bunsen, les suspensions bactériennes ont ensuite été inoculées sur des boîtes de pétris contenant 20 mL de la gélose Muller Hinton (MHA) à l'aide d'écouvillons stériles (fig. 47-A, B). Pour obtenir des inoculum uniformes, toute la surface du milieu a été régulièrement striée. En utilisant une pince, les disques imprégnés de différents extraits ont ensuite été déposés délicatement sur la surface inoculée de MHA (fig.48-A, B). Le disque imprégné de DMSO a été utilisé comme contrôle négatif. Cependant, le disque de gentamicine (disque industriel 30 µg) a été utilisé comme contrôle positif. Après la diffusion des extraits sur le milieu, les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 h à 37°C. L'essai a été répété en triplicata pour chaque souche

bactérienne et l'expérience a été répétée trois fois. Pour évaluer l'activité antibactérienne, le diamètre des zones d'inhibition autour des disques a été mesuré (en millimètres) à l'aide d'un pied à coulisse.

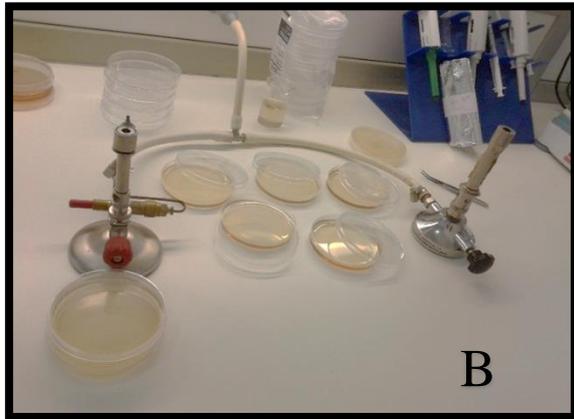


Figure 47 : Préparation de l'inoculum

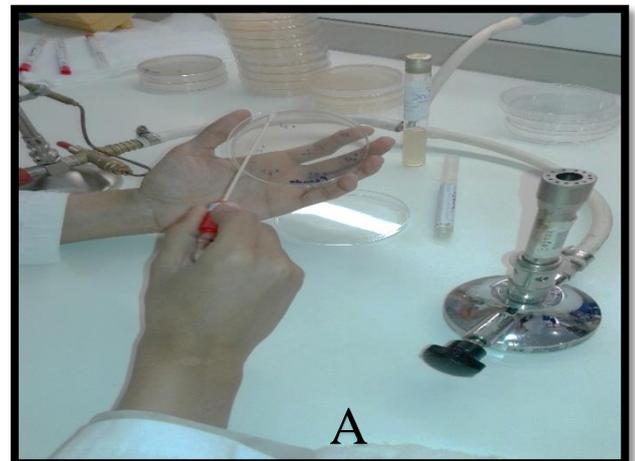
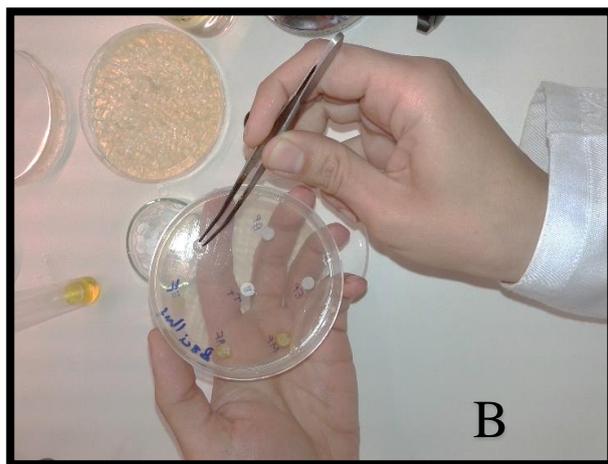


Figure 48 : Test antibiogramme

2.4.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer les CMI des extraits les plus importants, on a utilisé la méthode des microdilutions (NCCLS 2000) en utilisant des microplaques à 96 puits et du bouillon Mueller-Hinton (MHB). Les suspensions bactériennes ont été préparées dans du MHB et leurs concentrations ont été ajustées à 10^8 CFU₉/mL (Merah et al. 2021). Les puits de la première colonne (A1 à H1) ont été remplis avec 100 μ L de la solution mère des extraits (100 mg/mL). Chaque puits contenait une

solution mère d'extrait différente. Les puits de la deuxième à la neuvième colonne ont été remplis avec 50 µL de MHB stérile. Pour préparer des série de dilutions d'extraits ; 50µl de chaque solution mère (la première colonne) ont été ajoutés à 50µl de MHB stérile de la deuxième colonne pour obtenir la première dilution (1:2). Les puits de la troisième colonne ont été remplis avec 50µl de la dilution précédente pour obtenir la deuxième dilution (1:4). La même procédure pour les autres colonnes jusqu'à obtenir la dernière dilution dans la colonne 9 (1:256). Chaque rangée contient la dilution en série d'un des extraits. 50 µL de la suspension bactérienne ont été ajoutés à chaque puits (de la première à la neuvième colonne) pour obtenir un volume final de 100 µL. les puits de la dixième colonne ont été remplis avec la solution de contrôle de stérilité (50µL de MHB + 50µL de l'extrait) (fig.49). La gentamicine (30 mg/L) a été utilisée à la place de l'extrait de plante contrôle positif ont été ajoutées à la onzième colonne. Les puits de la dernière colonne ont été remplis de MHB stérile et utilisés comme contrôle de croissance (Merah et al. 2012). Après homogénéisation du contenu, les microplaques ont été recouvertes d'un couvercle stérile et incubées à 37°C pendant 24h. Trois répétitions de microplaques par bactérie ont été utilisées et l'expérience a été répétée trois fois. Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, la croissance bactérienne a été évaluée à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek, ELx800, Winooski, VT, USA).

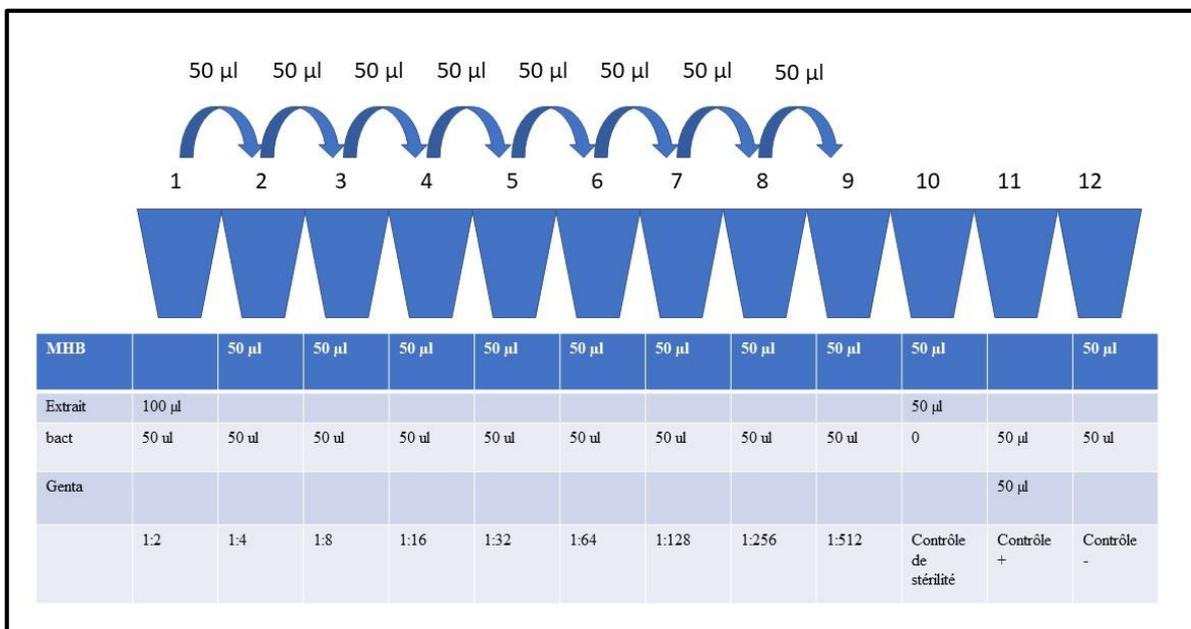


Figure 49 : Schéma explicatif de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer la CMB, des subcultures sur gélose ordinaire ont été réalisées à partir des puits montrant l'absence de croissance bactérienne. Après 48 h d'incubation à 37°C, les valeurs CMB ont été interprétées comme les concentrations les plus faibles de l'échantillon, qui indiquent un développement de micro-organismes inférieur ou égal à 0,01% (Bolou et al. 2011).

3 Analyse statistique

Tous les essais ont été réalisés en triplicatas ; les résultats ont été calculés sous forme de moyenne \pm écart-type. La signification statistique de l'activité antibactérienne des extraits testés a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, France. 2021). Les différences entre les mesures ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$.

4 Résultats et discussion

4.1 Tests de diffusion sur disque

L'activité antibactérienne des extraits de penes et de pollen de *Phoenix dactylifera* L. mâles a été évaluée quantitativement contre huit souches bactériennes en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition et en déterminant CMI et CMB.

La première étape été la mesure des zones d'inhibition par la méthode de diffusion sur disque. Pour les bactéries à Gram négatif, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les extraits testés.

L'absence d'une activité antimicrobienne dans les extraits organiques des penes et du pollen peut être expliquée par plusieurs facteurs :

Il est possible que la concentration des substances à effet antibactérien ne soit pas adéquate, ou bien, la diffusion dans le milieu de culture des molécules actives pose problème, peut-être la technique d'ensemencement est effectuée de manière erronée ou bien, ça peut être dû à la période et le lieu de récolte de la matière végétale et la méthode d'extraction des molécules dotées d'activité antimicrobienne. Tous ces facteurs et autres peuvent expliquer l'absence de l'activité antibactérienne comme indiqué par Mahmoudi et al (2013) ; El haci (2015).

Concernant les bactéries à Gram positif, les zones d'inhibition obtenues sont rapportées dans le tableau 9 et illustrées dans les fig (50 et 51).

Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par la méthode de diffusion sur disque pour les différents extraits de penes et du pollen.

Extraits	Bactéries			
	<i>S.aureus</i> Diameter±SD (mm)	<i>L. monocytogenes</i> Diameter±SD (mm)	<i>B. cereus</i> Diameter±SD (mm)	<i>E.faecalis</i> Diameter±SD (mm)
gentamicine	33.33±1.53 ^a	38.33±2.89 ^a	34.67±2.08 ^a	22.33±4.04 ^e
HM-LAE	9 ±1 ^b	8±1 ^b	9 ±1 ^b	6± 0
SF-LAE	8±3.46 ^b	6± 0	8.33±4.04 ^b	6.33±0.58 ^f
GH-LAE	9.33 ±1.53 ^b	10.00 ±1.00 ^b	10.00 ±1.00 ^b	6.67 ±1.1 ^f
HR-LAE	8.00±1.00 ^b	7.00 ±1.00 ^b	7.33 ±0.58 ^b	6 ± 0
DN-LAE	8.33 ±2.08 ^b	8.33±0.58 ^b	9.00± 0 ^b	6.80±0.72 ^f
DN-PAE	10.33±0.58 ^b	10.33 ±0.58 ^c	11.67 ±1.53 ^b	6.70±1.21 ^f
HM-LME	8± 2 ^b	11.33±2.31 ^b	9.33±0.58 ^b	6 ± 0
SF-LME	9.67± 3.51 ^b	11.33±1.51 ^c	9.00±1.73 ^b	7.00±1.73 ^f
GH-LME	8.00± 2.00 ^b	7.67± 0.58 ^b	9.33±1.15 ^b	7.33±1.53 ^f
HR-LME	11.33±6.81 ^b	14.00±7.00 ^b	10.33±3.79 ^b	7.33±1.15 ^f
DN-LME	9.00± 2.65 ^b	9.33 ±0.58 ^b	9.00 ±1.00 ^b	6 ± 0
DN-PME	15.67±1.53 ^c	16.67±2.52 ^d	16.33±1.53 ^d	14.33± 4.5 ^b
HM-LEE	9.67±1.51 ^b	9.67±2.08 ^b	7.00±1.73 ^b	6.00± 0
SF-LEE	10.00 ±1.00 ^b	6.67±0.58 ^b	6.67±1.15 ^b	6.00± 0
GH-LEE	9.67± 0.58 ^b	8.00 1.00 ^b	9.33±0.58 ^b	6.00± 0
HR-LEE	10.00±1.00 ^b	9.67±0.58 ^b	8.33±1.53 ^b	6.00± 0
DN-LEE	9.33±0.58 ^b	7.67±1.53 ^b	10.00±4 ^b	6.00± 0
DN-PEE	14.33±1.53 ^c	12.67±3.79 ^b	10.33±0.58 ^b	7.67±0.58 ^b

LAE= Leaf acetonic extract, LME= leaf methanolic extract, LEE= leaf ethanolic extract

PAE= Pollen acetonic extract, PME=pollen methanolic extract, PEE= pollen ethanolic extract. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences répétées ± écart type. HR: cultivar Hora, SF: cultivar safray, GH: cultivar Ghars, HM:

cultivar Hamray, DN: cultivar Deglet Nour. Les valeurs en italique indiquent qu'aucune zone d'inhibition n'a été observée. Les chiffres avec la même lettre ne sont pas significativement différents comme indiqué par Newman-Keuls multiple range test ($P > 0.05$).

A partir des résultats obtenus de la méthode de diffusion des disques, ont indiqué que les extraits des penes et du pollen des cinq cultivars présentaient différents degrés d'inhibition de la croissance, tous les extraits testés ont enregistré une activité antibactérienne de faible à forte contre les bactéries Gram positif.

Si l'on considère les bactéries Gram-positif, les différents extraits étaient actifs contre *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *B. cereus* mais moins contre *E. faecalis* sauf pour les extraits de pollen.

Il est a noté que l'extrait méthanolique du pollen était le plus efficace, vis-à-vis *L. monocytogenes*, *B. cereus* et *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de 16.6, 16.3 et 15.6 mm respectivement.

Sur la base de notre étude, pour chaque type d'extrait, ceux du pollen étaient plus actifs que les extraits de penes indépendamment du cultivar ($P < 0,05$).

De plus, en ce qui concerne l'activité antibactérienne, il n'y avait pas de différence significative entre les extraits de penes des cultivars (Newman-Keuls multiple range test, $P > 0,05$),

Les résultats présentés dans le tableau 9 ont révélé que les extraits acétoniques des penes étaient capables d'inhiber modérément la croissance de toutes les bactéries Gram positives (Newman-Keuls multiple range test, $P < 0.05$). GH et DN étaient les extraits les plus puissants avec un diamètre moyen de 10 et 9 mm respectivement ($P < 0,05$). Toutefois, *B. cereus* était la bactérie la plus sensible, suivie de *S. aureus* et de *L. monocytogenes* ($P < 0,05$).

La recherche a aussi dévoilé que les extraits éthanoliques des penes des cultivars SF et HR présentaient une activité anti- *S. aureus* significative (10 mm) ($P < 0,05$), ainsi que *B. cereus* a illustré une grande sensibilité envers l'extrait du cultivar DN avec une zone d'inhibition de (10 mm). Cependant, un effet négligeable contre les autres bactéries a été enregistré. Les extraits de cultivars HM et GH ont montré un faible effet antibactérien contre toutes les bactéries testées avec un diamètre moyen allant de 7 à 9.67mm.

En revanche, *E. faecalis* n'avait pas démontré de sensibilité aux extraits de penes obtenus par l'acétone et l'éthanol ; par contre, on a constaté un effet très faible avec les extraits méthanoliques des cultivars SF, GH et HR (7 à 7.33mm), ainsi que les extraits éthanolique du pollen (7.67mm).

Cependant, elle était plus sensible, exceptionnellement pour l'extrait méthanolique du pollen et a montré une valeur de zone d'inhibition équivalente à 14,3 mm ($p < 0,05$).

Alors que, pour ce qui est des extraits méthanoliques des penes, les cultivars HM et SF ont indiqué un effet important contre *L. monocytogenes* de 11,3 mm de diamètre. Toutefois, le cultivar HR était le plus efficace contre la même souche bactérienne. Cette bactérie a enregistré une valeur de zone d'inhibition équivalente à 14 mm, suivie par *S. aureus* (11,3 mm) et *B. cereus* (10,3 mm). Tandis que les cultivars GH and DN ont révélé un diamètre d'inhibition modéré (8 à 9.6 mm pour l'extrait de GH et de 9 à 9.3 mm pour l'extrait de DN). En outre, il ressort clairement des résultats, que *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *B. cereus* étaient les bactériens les plus sensibles aux extraits de penes ($P < 0.05$).

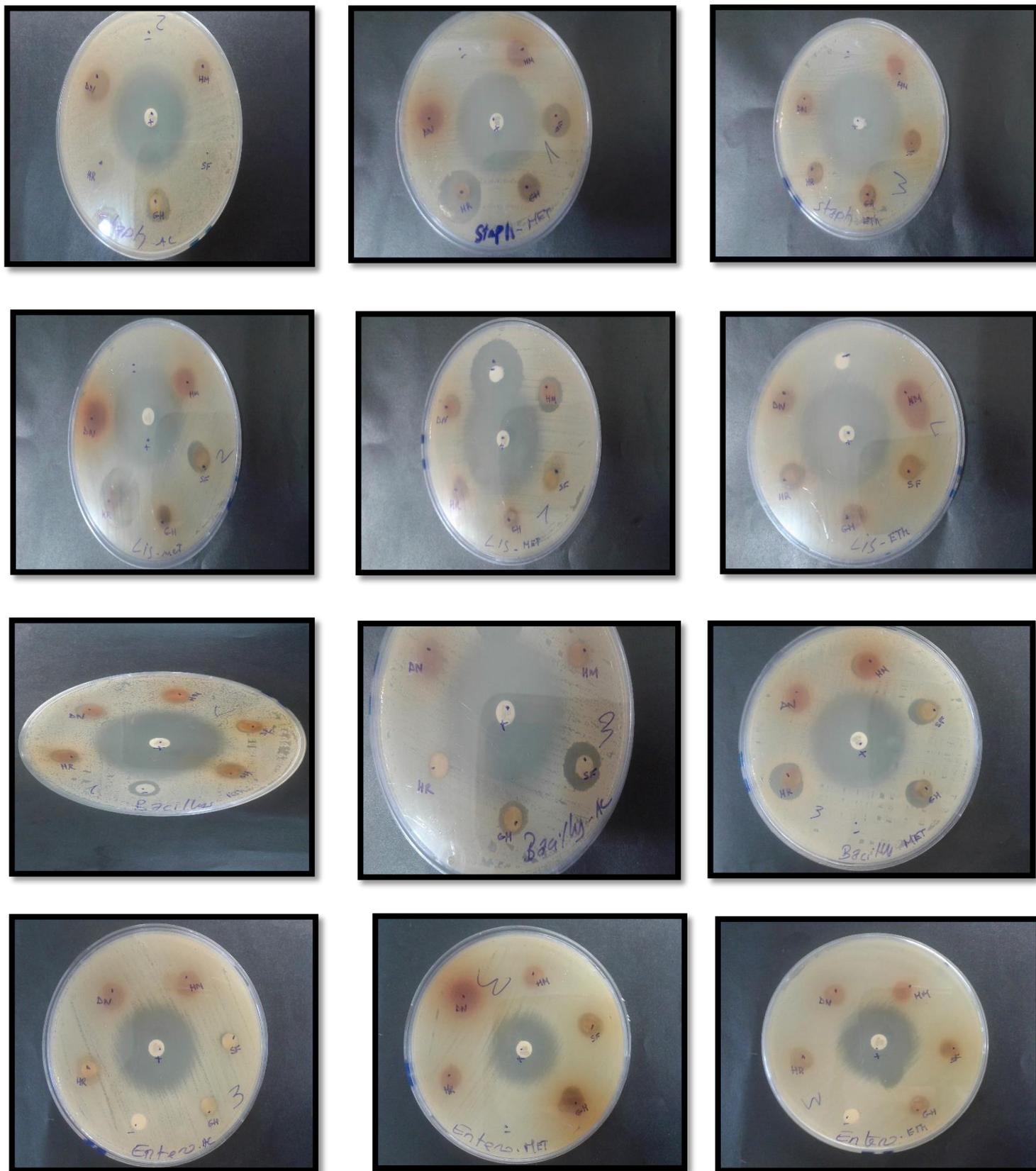


Figure 50: L'activité antibactérienne des extraits de penne sur des bactéries de (Gram+) Staphylococcus, Listeria, Bacillus et Enterococcus



Figure 51: L'activité antibactérienne des extraits de pollen sur des bactéries de (Gram+)

4.2 Détermination de CMI et CMB

Pour les extraits de pollen, les résultats de la détermination de CMI et CMB contre les bactéries à Gram positif sont présentés dans le tableau 10 et (fig.52)

Tableau 10: Détermination de CMI et CMB pour *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *B. cereus* pour les différents extraits de pollen

Extrait	paramètre	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
		Moyenne	SD	Moyenne	SD	Moyennnen	SD
Pollen-Ethanol	CMI (mg ml ⁻¹)	4.17 ^a	1.61	15.63 ^a	4.84	91.67 ^a	20.41
Pollen-Ethanol	CMB (mg ml ⁻¹)	11.08 ^b	3.74	65.63 ^b	22.96	150.00 ^{a,c}	54.77
Pollen-Ethanol	CMB/CMI ratio	2.7		4.0		1.6	
Pollen-Methanol	CMI (mg ml ⁻¹)	1.56 ^c	0.60	7.81 ^c	2.42	15.63 ^b	4.84
Pollen-Methanol	CMB (mg ml ⁻¹)	4.29 ^a	0.96	32.80 ^d	11.48	68.75 ^{a,c}	15.31
Pollen-Methanol	CMB/CMI ratio	2.7		4.2		4.4	
Pollen-Acetone	CMI (mg ml ⁻¹)	114.58 ^d	25.52	83.33 ^b	25.82	56.25 ^c	20.54
Pollen-Acetone	CMB (mg ml ⁻¹)	229.17 ^e	51.03	166.67 ^e	51.64	133.33 ^a	30.28
Pollen-Acetone	CMB/CMI ratio	2		2		2.4	

Pour l'agent pathogène, le nombre avec les mêmes lettres n'est pas significativement différent ($p > 0,05$).

Les extraits méthanoliques ont eu les valeurs les plus faibles des CMI et CMB. Ces valeurs sont nettement inférieures (Newman–Keuls multiple range test, $P < 0.05$) que les autres extraits.

Pour les extraits éthanoliques et méthanoliques, la CMI et la CMB sont les plus faibles pour *L. monocytogenes*, suivis de *S. aureus* et de *B. cereus*. Ceux-ci sont significativement différents ($P < 0.05$). Pour les extraits acétoniques, il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$) entre la CMI ou la CMB pour *L. monocytogenes* et *S. aureus* ou entre les CMI ou les CMB pour *S. aureus* et *B. cereus*. Toutefois, les CMI ou les CMB pour *B. cereus* et *L. monocytogenes* sont significativement différents ($P < 0,05$). Le rapport entre CMB/CMI varie entre 1.6 à 4.4.

Si le rapport $CMB/CMI \leq 4$, l'effet a été considéré comme bactéricide mais si le rapport $CMB / CMI > 4$ l'effet a été défini comme étant bactériostatique (Thomas et al., 2012).



Figure 52 : La détermination des CMI des extraits par la méthode des micro-dilutions de microplaques

Dans notre étude, les résultats étaient plus en faveur d'une activité bactéricide de la plupart des extraits testés contre les bactéries Gram-positives.

Nos données concordent avec une étude antérieure de (Vayalil et al. 2012) confirmant que les extraits méthanoliques et acétoniques des pennes de palmier dattier d'Arabie saoudite indiquent une bonne activité antibactérienne contre *B. cereus* et *S. aureus* (21 mm).

Si on considère les composés des extraits, certains pourraient avoir un effet antibiotique. Par exemple le thymol et le carvacrol ont un effet inhibiteur sur la génération intra-cellulaire d'ATP chez *B. cereus*, ils provoquent la perforation et la réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire, également, impactés sur le flux de potassium (intra et extra-cellulaire) qui endommage la membrane cytoplasmique (Shapiro et Guggenheim 1994 ; Ultée et al. 2000).

La méthode employée pour évaluer l'activité antibactérienne influence également les résultats, la méthode de diffusion sur disque est la plus adaptée pour les extraits aqueux et organiques de *Cuminum cyminum* L (Athamena et al. 2010).

Le méthanol était le solvant qui a montré la plus grande capacité d'extraction pour les composés bioactifs, suivi de l'éthanol et de l'acétone, qui correspondent à ce qui a été obtenu comme résultats par (Mahmoudi et al., 2013).

En ce qui concerne le pollen, il a été démontré que tous les extraits étaient les plus efficaces sur les bactéries à Gram positif et que les plus sensibles étaient *L. monocytogenes* et *B. cereus* suivis de *S. aureus* et *E. faecalis*. Les mêmes résultats ont été obtenus avec des extraits de fleurs de palmier dattier mâles (Karra et al., 2020), où les valeurs de la zone d'inhibition étaient égales à (12,1, 10,5,

11,1 mm) respectivement. Cependant, dans une autre étude, les valeurs de la zone d'inhibition pour différents extraits (méthanol, chloroforme, eau) de différentes parties de la plante (racine, pennes, pollen, spathe, noyau) variaient de 13 à 21 mm pour *B. cereus* et de 12 à 18 mm pour *S. aureus*, respectivement (**Shakiba et al., 2011**).

Dans cette étude, les différents extraits n'ont montré aucune efficacité contre les bactéries Gram négatif. Cela correspond avec l'étude établie par Qadoos et al. (2017) selon laquelle *E. coli* et *P. aeruginosa* ont montré une résistance contre tous les extraits de pennes. Parallèlement, les bactéries Gram positif étaient les plus sensibles (**Rurián-Henares et Morales, 2008 ; Abdallah et al. 2017**). Elle est probablement due à la différence de structure de la paroi cellulaire entre les bactéries Gram négatif et Gram positif. D'une part, la présence de LPS chez les bactéries Gram négatif peut agir comme une barrière pour les extraits. D'autre part, le peptidoglycane est peut-être la cible des extraits puisque cette structure est plus développée chez les bactéries Gram-positif que chez les bactéries Gram-négatif.

La différence observée dans le diamètre de la zone d'inhibition entre les extraits de différents cultivars, et même demeure faire en comparant avec la gentamicine, peut s'expliquer aussi par la différence de solubilité du matériel végétal et leurs composés bioactifs dans les solvants ou par la différence de masse des bactéries cultivées à chaque fois comme indiqué par (**ALrajhi et al., 2019**).

Les données de la présente étude ont démontré que tous les extraits des pennes et de pollen pouvaient contrôler seulement le développement de bactéries Gram positif. Il a déjà été signalé que des extraits méthanoliques, acétoniques et éthanoliques des pennes de palmier, étaient actifs contre les bactéries à Gram négatif (**Vayalil et al. 2012 ; Abdul Maged et Abed Abbas 2013**), ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. Cela est peut être due à la méthode d'extraction ou au rapport matériel végétal/solvant comme mentionné précédemment (**Mahmoudi et al., 2013**), où ils ont montré que la méthode de macération semble être meilleure pour extraire les métabolites secondaires en utilisant le méthanol, l'éthanol et l'acétone comme solvants, cependant, la décoction aqueuse est plus appropriée pour l'extraction des tanins condensés. Certaines études publiées appuient nos constatations, où la plus grande zone d'inhibition a été enregistrée pour *B. cereus* et *S. aureus* avec des valeurs allant de 14 et 20 mm pour trois extraits de pennes de *P. dactylifera* de l'Algérie et de l'Arabie saoudite (**Laouini, 2014 ; Abdallah et al. 2017**). Cette activité antibiotique a été mise en relation avec la présence de certains composés bioactifs, comme, les flavonoïdes, les phénols/polyphénols, les phytostérols, les quinine, les saponines, les tanins et les résines.

Une corrélation linéaire significative a été trouvée entre la quantité des composés phénoliques et l'activité antibactérienne ce qui est en faveur de leur contribution dans cette activité (**Biglari et al., 2007 ; Daas et al., 2009; Qadoos et al., 2017**).

En ce qui concerne l'effet antimicrobien des extraits du pollen, nous avons remarqué qu'il est clairement plus important que ceux des pennes. Les extraits méthanoliques de pollen du cultivar Deglet Nour présentait un fort comportement antibactérien contre *S. aureus*, et *E. faecalis* (**Bentrad et al., 2017**) ce qui est en accord avec nos résultats. Ceci est peut-être dû aux flavonoïdes identifiés (flavonic aglycones : flavonols et flavones, anthocyanidines et C-glycosylflavones) ou par la quantité élevée d'acide palmitique (22.27 %), linoléique (33.4%) et linoléique (17.05%) ou des stérols, des triterpènes, saponines (**Mahran et al. 1976**).

Une étude importante a montré que les composés 3,4- diméthoxytoluène et 5,9-Undecadien-2-one composé, détectés dans les huiles essentielles de pollen, étaient responsables de l'activité antibactérienne contre certains pathogènes d'origine alimentaire comme *L.monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli* (zones d'inhibition de 11 à 13 mm) (**Al zoreky et Al Taher, 2019**).

Il a été révélé que les activités biologiques potentielles des extraits des pennes et de pollen pourraient être attribuées, essentiellement, à leurs éléments phytochimiques, connus sous le nom d'agents antibactériens naturels contre de nombreuses souches pathogènes, par la précipitation des protéines et l'inhibition des enzymes des micro-organismes (**Saleh et Otaibi, 2013**). Ce qui est le cas de nos extraits étudiés. Selon des études antérieures, ont indiqué que l'analyse HPLC a identifié l'acide gallique, la catéchine, l'acide caféique, l'épicatchin, l'acide vanillique, la coumarine, la quercitine et la rutine (**Abu-Reidah John et al., 2019 et Karra et al., 2020**) aussi confirmé par les résultats de la partie 2 (**Benouamane et al., 2022**).

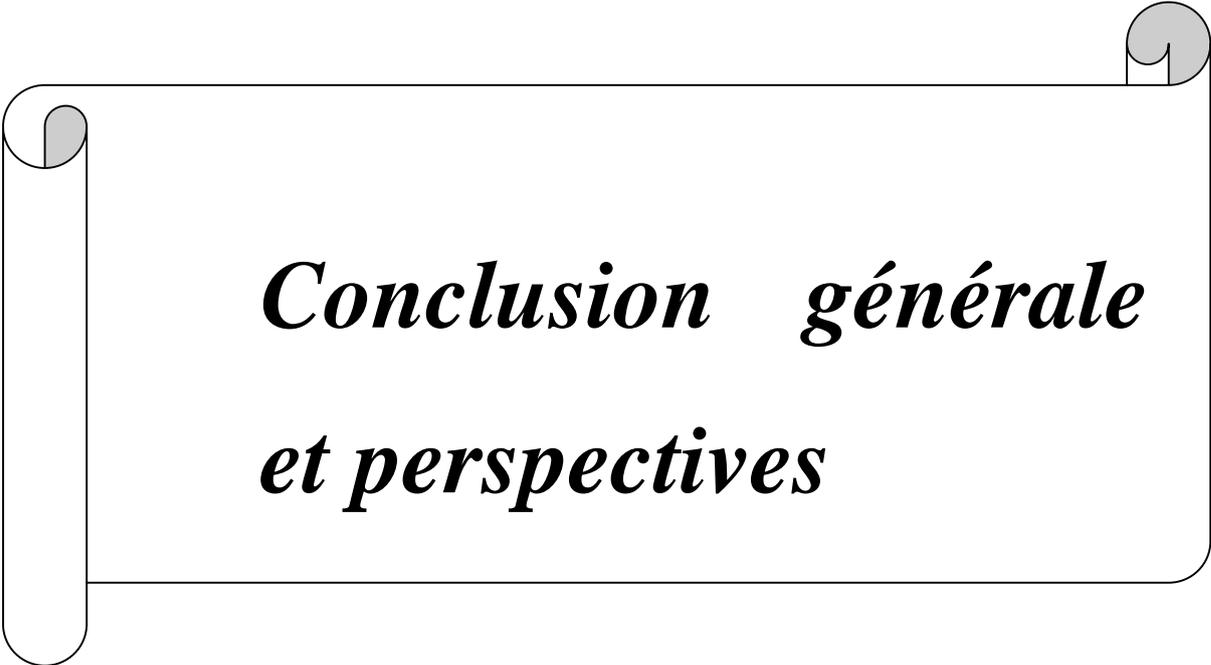
5 Conclusion

Les résultats de notre recherche ont indiqué que les différents extraits des pennes de palmier dattier mâles et principalement le pollen, à partir de divers solvants organiques, ont une activité antibactérienne contre différentes souches bactériennes en particulier Gram positif responsables des intoxications alimentaires comme *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *B. cereus* ou des maladies entériques *E. fecalis*.

Les extraits de pollen de *P. dactylifera* L. sont avérés plus efficaces que les extraits de pennes, où les extraits méthanoliques du pollen ont été les plus actifs contre les bactéries à Gram positif, suivis des extraits méthanoliques, éthanoliques et acétoniques des pennes de cinq cultivars. Tous les extraits

testés ont enregistré une activité antibactérienne de faible à forte, contre seulement, les bactéries Gram positif. À l'opposé, les bactéries à Gram négatif sont les plus résistantes où aucune activité n'a été indiquée, les résultats négatifs peuvent être dus à des quantités insuffisantes des composés actifs dans les extraits bruts pour montrer une activité avec les doses utilisées.

Sur la base des résultats atteints, on peut conclure que le potentiel d'inhibition contre la croissance des bactéries a été attribué à la présence et de composés phytochimiques dans les extraits de penes et du pollen, il est suggéré qu'ils pourraient être utiles comme une source prometteuse d'agents antibactériens alternatifs et naturels pour traiter les infections causées par les bactéries Gram+. Cependant, nos résultats constitueront une excellente base pour des recherches futures sur l'exploitation de penes et du pollen et ouvre la voie à l'étude de l'efficacité de ces extraits contre les infections résistantes aux antibiotiques. D'autres recherches sont nécessaires pour identifier, purifier et comprendre le mécanisme d'action des composés actifs des extraits testés, en particulier les extraits de pollen de d'autres cultivars.



*Conclusion générale
et perspectives*

Conclusion générale et perspectives

L'Algérie de part ses caractéristiques géographiques (grande surface, climats, variété du sol) renferme une richesse phoenicicole importante. La culture du palmier dattier est une culture traditionnelle en Algérie. Cependant, la grande diversité des cultivars nécessite de pouvoir les différencier non seulement phénotypiquement mais aussi génotypiquement. Il s'agissait d'étudier la variabilité génétique intra et inter cultivars.

Le présent travail qui traite du polymorphisme moléculaire du palmier dattier provenant de différents cultivars mâles de la région de Biskra. En effet, il a permis d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés au début, à savoir la comparaison moléculaire pour établir des bases génétiques utiles pour la gestion et l'exploitation des ressources génétiques des pieds mâles du palmier dattier.

Au cours de ces travaux de recherche, nous avons comparé les génomes de différents cultivars en utilisant comme la RAPD et l'ISSR. Ces méthodes sont les plus simples à mettre en œuvre et donnent des renseignements préliminaires utiles.

L'analyse des cinq accessions par les marqueurs ISSR a permis, significativement, leur différenciation. Les 2 amorces utilisées en PCR pour amplifier l'ADN se sont révélées polymorphes. Pour l'ISSR avec l'amorce biba1, 12 bandes reproductibles dont 7 polymorphes ont été amplifiées. Pour l'ISSR avec amorce biba2, le nombre total de bandes 14 où les bandes polymorphes était de 12.

Toutefois, l'analyse moléculaire faite par la technique RAPD a été par rapport à celle d'ISSR plus discriminante. L'utilisation de 2 amorces RAPD a généré 13 amplicons dont 11 sont polymorphes avec L'amorce A10, alors qu'avec le marqueur A12. 14 bandes ont été générées dont 12 sont variables.

Les ISSR et RAPD sont des méthodes efficaces pour détecter le polymorphisme entre les cultivars du palmier dattier en Algérie et peuvent être utilisés pour estimer la variabilité génétique pour établir des stratégies d'amélioration et de conservation.

On déduit qu'il y a une l'homogénéité génétique de la plupart des individus appartenant u même cultivar testé, l'important polymorphisme observé montre un degré élevé de diversité génétique chez le germoplasme algérien et confirmé par le Dendogramme qui est construit à l'issu de l'analyse statistique par la méthode en « complete linkage » pour l'ensemble des marqueurs génétiques. Il ressort de cette étude, que globalement la variabilité intra cultivar était plus faible que la variabilité inter cultivars.

Conclusion générale et perspectives

L'originalité de ces résultats, permettant l'évaluation de la diversité phénotypique et génétique du palmier dattier, constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse.

Cependant, des perspectives sont recommandées, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations :

- Elargir l'étude de la diversité génétique par l'évaluation d'autres cultivars répartis dans les oasis de Biskra, car une meilleure connaissance de la variabilité permet l'élaboration d'une stratégie de lutte contre les maladies.

- Utiliser des méthodes de séquençage de nouvelle génération qui sont actuellement plus informatives pour comparer les génomes.

- L'utilisation d'autres marqueurs moléculaires pour faciliter l'identification et la conservation des ressources génétiques du palmier dattier.

- La variation génétique peut servir de base pour la sélection des mâles puissants afin d'améliorer leur rendements qualitatif et quantitatif et modifier la précocité des fruits selon la demande du marché.

- Les outils moléculaires peuvent être un moyen d'identification des différents cultivars, établir les degrés de parenté entre eux et de recenser et maintenir la biodiversité phoénicienne.

Relativement au second axe, et dans le cadre de la valorisation des ressources végétales dans les régions arides et plus particulièrement dans la région de Biskra. Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer les sous-produits du palmier dattier par l'étude phytochimique de leurs extraits organiques. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'étude, *in vitro*, de l'activité antioxydante des extraits bruts par la méthode de piégeage des radicaux libres en utilisant le DPPH. Une variabilité détectée chez tous les cultivars testés.

Les valeurs les plus basses des IC_{50} ont été enregistrées pour le cultivar DN qui présente la plus forte activité antioxydante, avec les trois solvants utilisés.

D'après les résultats le cultivar DN présente un potentiel économique non négligeable que nous devons exploiter et investiguer ses composants.

Les résultats obtenus pour l'analyse quantitative de la composition phénolique, en utilisant le test colorimétrique de Folin Ciocalteu, confirment que les pennes sont plus riches en polyphénols, surtout pour les cultivars DN, SF et HM, que le pollen.

Tandis que le dosage des flavonoïdes, a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), les valeurs les plus élevées ont été représentés par les extraits acétoniques du cultivar SF.

Conclusion générale et perspectives

Alors que pour le dosage des tanins condensés, effectué par la méthode colorimétrique de la vanilline, a révélé que les cultivars HM et DN possèdent les valeurs les plus supérieures pour tous les solvants.

L'utilisation de trois différents solvants (méthanol, éthanol, actéone) révèle que le méthanol semble être le solvant le plus adéquat pour l'extraction des polyphénols, comme il a donné le rendement d'extraction le plus élevé. On conclut aussi, que le rendement d'extraction dépend des caractéristiques physicochimiques des solvants utilisés, notamment leur polarité, il s'ajoute également que la solubilité des substances contenus dans la matière végétale dépend de ces propriétés.

L'analyse de la chromatographie couplée par la spectrométrie de masse, s'est avéré être un outil puissant qui nous a permis de caractériser 21 et 23 composés phénoliques dans les extraits de pennes et de pollen respectivement, qui peuvent être responsables de bloquer l'action de DPPH et qui sont principalement des acides phénoliques (comme les acides p-coumarique et caféique), des flavonols et des flavones (comme la lutéoline et la rutine), et des flavan-3-ols (comme la catéchine et l'épicatéchine).

En effet, les pennes et le pollen sont une source prometteuse de nutraceutiques naturelles ; avec des applications médicales possibles pour réduire le stress oxydatif et pourraient ouvrir de nouvelles possibilités pour le développement d'agents de conservation des aliments plus efficaces contre la détérioration des aliments.

Pour optimiser les conditions de séparation des composés polyphénoliques, pour la première dimension ¹D, la meilleure performance a été obtenue en utilisant la colonne RP-amide suivie par PFP. Pour l'optimisation des conditions ²D, la meilleure séparation a été obtenue avec la combinaison (RP-amide×C18) avec le plus grand nombre de pics 145. Les profils chromatographiques LC x LC ont été utilisés pour discriminer et classer les échantillons des pennes de palmier dattier en fonction de leurs cultivars à l'aide de LDA.

À travers ces résultats, on peut conclure que les extraits de pennes et pollen représentent une source naturelle et prometteuse de molécules chimiques qui possède des activités biologiques très importantes.

Sur base de nos résultats préliminaires, il semble intéressant :

- D'isoler et de purifier les substances antioxydantes à partir des extraits organiques, comme sont des produits à forte valeur ajoutée, il est souhaitable d'essayer de les incorporer dans les produits agro-alimentaires et de les utiliser dans les industries pharmaceutiques.

Conclusion générale et perspectives

- Les pennes et pollen constituent une ressource non négligeable en matière de molécules bioactives, mais demeure moins exploitée que ce soit au niveau des études scientifiques ou économique, il est recommandé de poursuivre la valorisation d'autres cultivars mâles.

- En outre, il est conseillé d'utiliser les pennes et le pollen comme complément alimentaire et suggérer pour l'industrie des médicaments antibactériens et antioxydants après approbation de l'innocuité et d'autres études biochimiques, toxicologiques, pharmacologiques et cliniques.

Après la mise en évidence de différents composés chimiques et la quantification de polyphénols et flavonoïdes totaux ainsi que les tanins condensés dans nos extraits, nous avons étudié, *in vitro*, l'effet de ces extraits sur l'activité antibactérienne.

La phytothérapie connaît à ce jour un essor important du fait de la découverte de plus en plus des plantes efficaces dans le traitement des maladies.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur huit souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur disque ; Les résultats obtenus au cours de cette étude ont révélé un effet antibactérien intéressant des extraits de pennes de différents cultivars sur les bactéries à Gram positif. Ces résultats ont démontré que les extraits méthanoliques du pollen sont plus actifs que ceux obtenus par l'acétone et éthanol.

En résumé, les résultats de notre étude ont démontré une activité antibactérienne potentielle des pennes et du pollen de cinq cultivars de palmier dattier contre divers pathogènes responsables de grande variété d'infections, en particulier, les bactéries de Gram positif, prouvée par l'analyse phytochimique, cette activité est probablement liée à la richesse de nos extraits en polyphénols et en flavonoïdes qui peuvent être une bonne source de nouveaux antibiotiques naturels complémentaires aux antibiotiques actuels. Le pollen est certainement le produit le plus efficace dans cette perspective.

En outre, la valorisation des pennes et du pollen a prouvé leur pouvoir comme un puissant antioxydant et antibactérien en raison du large éventail et richesse en métabolites secondaires dans leurs extraits, c'est une étape très importante dans la gestion des maladies en absorbant et neutralisant les radicaux libres d'une part et inhibant le développement des bactéries infectieuses d'autre part. Vu cet impact de protection sur la santé humaine, ils peuvent être mis à profit dans différentes industries alimentaire, en cosmétique et en biotechnologie et peuvent être un traitement alternatif en pharmacie moderne comme source naturelle d'agents préventifs et efficaces contre les infections causées par les bactéries de Gram + résistantes aux antibiotiques.

Nous prévoyons que nos résultats, qui sont appuyés par d'autres recherches publiées antérieurement, constitueront une excellente base pour des études futures sur l'exploitation du des

Conclusion générale et perspectives

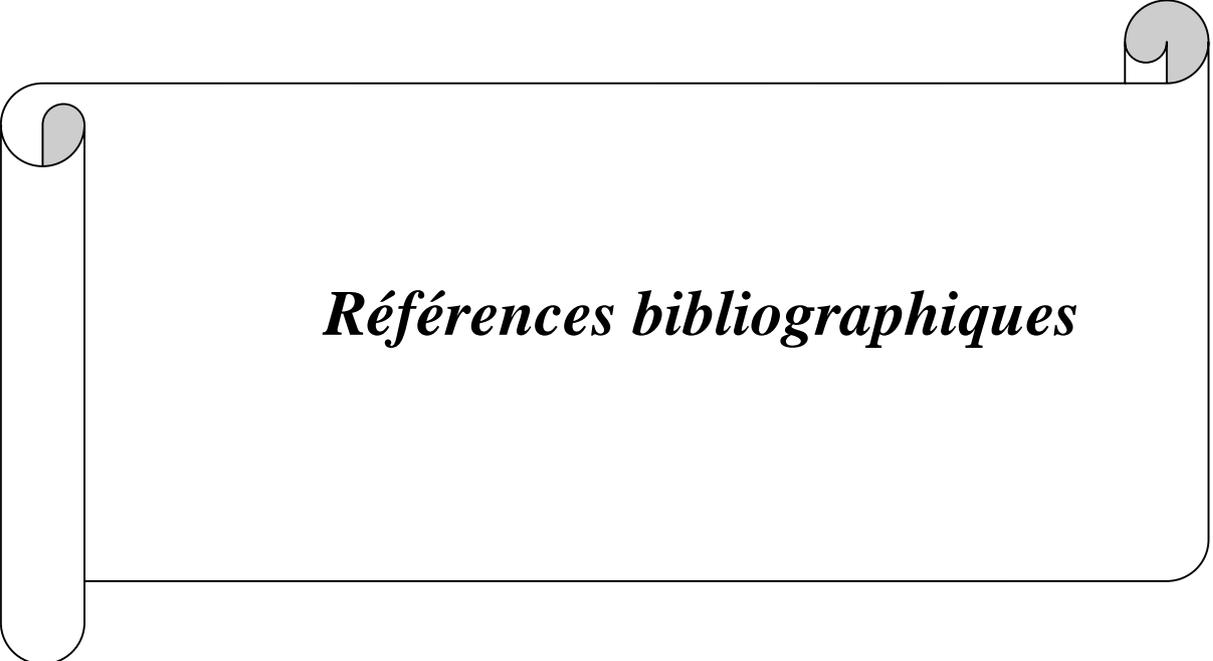
pennes et du pollen et ouvriront la voie à l'étude de l'efficacité de ces extraits contre les infections résistantes aux antibiotiques.

A la lumière de ces résultats cette étude, d'éventuelles études sont nécessaires qui s'intéresseront au mécanisme d'action des extraits sur les bactéries qui n'est pas bien élucidé, ce qui forme un terrain vierge pour de nouvelles recherches afin de mieux élucider les principes d'interaction et d'inhibition à l'échelle moléculaire.

- Elargir la gamme des souches microbiennes (des champignons, des levures) ;
- Mettre en valeur d'autres cultivars locaux ;
- Etudier séparément les molécules responsables de cette activité dans le but de la fabrication des compléments alimentaires à base de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, il est souhaitable qu'une innocuité, *in vivo*, doit être soigneusement étudiée sur des modèles expérimentaux de rongeurs avant son application éventuelle. Nous recommandons que les prochaines études, se concentrent sur l'examen des activités antidiabétiques et anti inflammatoires, anti-douleur, cicatrisantes, anti-cancéreuses. En effet, le palmier dattier est une source riche de molécules bioactives.

Il s'agira donc d'isoler les substances actives, d'en établir le mécanisme d'action et enfin d'établir une manière efficace de produire ces molécules actives en grande quantité soit à partir de la plante soit par synthèse chimique afin d'en assurer la commercialisation soit sous forme de complément alimentaire soit de médicaments. Cette dernière étape nécessitera la collaboration avec l'industrie pharmaceutique.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1) **Abdallah, E., Musa, K., Qureshi, K., & Sadeek, A. (2017).** Antimicrobial activity and antioxidant potential of the methanolic leaf extracts of three cultivars of date palm trees (*Phoenix dactylifera*) from Saudi Arabia. *Med. Sci. Int. Med. J*, 6, 614-619.
- 2) **Abdul Maged, Q.N. and Abed Abbas, N. (2013)** Antibacterial activity of *Phoenix dactylifera* L. leaf extracts against several isolates of bacteria. *Kufa J Vet Med Sci* 4, 45-50.
- 3) **Abedi, A., Karimian, S. M., Parviz, M., Mohammadi, P., & Roudsari, H. R. S. (2014).** Effect of aqueous extract of *Phoenix dactylifera* pollen on dopamine system of nucleus accumbens in male rats. *Neuroscience & Medicine*, 5, 49-59.
- 4) **Abo-Rekab, Z., & El-Kafrawy, T. (2014).** Selection of good male date palm pollinators for improving both yields and fruit quality, using morphological characterization and genetic relationships of pollinators using ISSR markers. *Sci.J.Flowers.Ornam.Plants*, 1(1), 55-71.
- 5) **Abssi, R., (2013).** Analyse de la diversité variétale du Palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L). Cas des Ziban (Région de Sidi Okba). Magister en sciences agronomiques Option : Agriculture et environnement en régions arides, p : 8.
- 6) **Abuelgassim, A. O. (2020).** Towards the utilization of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaves as a rich source of antioxidants. *Journal of Food and Nutrition Research*, 8, 632–637.
- 7) **Abu-Reidah, I. M.; Gil-Izquierdo, A.; Medina, S.; & Ferreres, F. (2017).** Phenolic composition profiling of different edible parts and by-products of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by using HPLC-DAD-ESI/MS. *Int. Food Res.J.100*, 494–500.
- 8) **Açourene, S., Buelguedj, M., Tama, M., & Taleb, B. (2001).** Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. Recherche Agronomique, éd. INRAA, 8, 19-20.
- 9) **Açourene, S., Belguedj, M., Tama, M., et Talebi, B., (2001)** Caractérisation, évaluation de la qualité de la Datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des ziban. Revue semestrielle 19, n8, 19-39.
- 10) **Adawy, S. S., Hussein, E. H., Ismail, S. E. M. E., & El-Itriby, H. A. (2005).** Genomic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) as revealed by AFLPs in comparison to RAPDs and ISSRs. *Arab J. Biotech*, 8(1), 99-114.
- 11) **Adeosun, A. M., Oni, S. O., Ighodaro, O. M., Durosinlorun, O. H., & Oyedele, O. M. (2016).** Phytochemical, minerals and free radical scavenging profiles of *Phoenix dactylifera* L. seed extract. *Journal of taibah university medical sciences*, 11(1), 1-6.
- 12) **Ahmed, M. V. O. M., Bouna, Z. E. O., Lemine, F. M. M., Djeh, T. K. O., Mokhtar, T., & Salem, A. O. M. (2011).** Use of multivariate analysis to assess phenotypic diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Sci. Hortic.* 127(3), 367-371.

Références bibliographiques

- 13) **Ahmed, T. A., & Al-Qaradawi, A. Y. (2010).** Genetic diversity of date palm genotypes in Qatar as determined by SSR and ISSR markers. In IV International Date Palm Conference 882 (279-286).
- 14) **Akkak, A., Scariot, V., Torello Marinoni, D., Boccacci, P. A. O. L. O., Beltramo, C., et Botta, R. (2009).** Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other *Phoenix* species. *Biologia Plantarum*, 53(1), 164-166.
- 15) **Akroum. S (2011).** Etude analytiques et biologiques des Flavenoides naturels Doctorat en sciences option : physio-toxicologie. Département de Biologie Animale Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Mentouri de Constantine. 29.
- 16) **Al Harthi, S. S.; Mavazhe, A.; Al Mahroqi, H.; & Khan, S. A. (2015).** Quantification of phenolic compounds, evaluation of physicochemical properties and antioxidant activity of four date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Oman. *J. Taibah Univ. Medical Sci*, 10, 346–352.
- 17) **Al-Ameri, A. A., Al-Qurainy, F., Gaafar, A. R. Z., Khan, S., & Nadeem, M. (2016).** Molecular identification of sex in *Phoenix dactylifera* using inter simple sequence repeat markers. *BioMed. Res. Int.* 2016.1-5.
- 18) **Al-Khalifah, N. S., & Askari, E. (2003).** Molecular phylogeny of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1266-1270.
- 19) **Al-Kharusi, L. M., Elmardi, M. O., Ali, A., Al-Said, F. A. J., Abdelbasit, K. M., & Al-Rawahi, S. (2009).** Effect of mineral and organic fertilizers on the chemical characteristics and quality of date fruits. *Int. J. Agric. Biol*, 11(3), 290-296.
- 20) **Allam.A.E.K., Açourene.S., Chouaki.S., Djafari.K. (2006).** Etude de la diversité génétique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de la région de Ghardaia. *Revue des regions arides*.12-15.
- 21) **Al-Qurainy, F., Khan, S., Al-Hemaid, F. M., Ali, M. A., Tarroum, M., & Ashraf, M. (2011).** Assessing molecular signature for some potential date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia, based on chloroplast DNA sequences rpoB and psbA-trnH. *Int. J. Mol. Sci.* 12(10), 6871-6880.
- 22) **ALrajhi, M; Mabrouk AL-Rasheedi, Salah Elnaeem M. Eltom, Yasir Alhazmi, Mustafa Mohammed Mustafa (2019).** Antibacterial activity of date palm cake extracts (*Phoenix dactylifera*) *Cogent Food & Agriculture*. 5.
- 23) **Al-Samarrai, R. R., Al-Samarrai, A. M. H., & Al-Salihi, F. G. (2017).** Identification of flavonoids in Iraqi date palm pollen by HPLC. *Orient. J. Chem*, 33, 985-988.

Références bibliographiques

- 24) **Al-Zoreky NS, Al-Taher AY. (2019).** In vitro and in situ inhibition of some food-borne pathogens by essential oils from date palm (*Phoenix dactylifera L.*) spathe. *Int J Food Microbiol*; 299:64-70.
- 25) **Ancillotti, C.; Orlandini, S.; Ciofi, L.; Pasquini, B.; Caprini, C.; Droandi, C., & el Bubba, M. (2018).** Quality by design compliant strategy for the development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of selected polyphenols in *Diospyros kaki*. *Journal of Chromatography A*, 1569, 79–90.
- 26) **Anonyme (2010):** HPLC Principe et appareillage. Ressources pédagogiques - Biochimie et Bio moléculaire - Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine -Académie de Rouen, 1-11.
- 27) **Arcari, G.S.; Arena, K.; Kolling, J.; Rocha, P.; Dugo, P.; Mondello, L.; Cacciola, F. (2020).** Polyphenolic compounds with biological activity in guabiroba fruits (*Campomanesia xanthocarpa Berg.*) by comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Elec.pho.* 1-9.
- 28) **Archambaud.M, (2009).** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse.
- 29) **Arena, K.; Cacciola, F.; Dugo, L.; Dugo, P.; & Mondello, L. (2020).** Determination of the metabolite content of *Brassica juncea* cultivars using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with a photodiode array and mass spectrometry detection. *Molecules*, 25, 1235.
- 30) **Asmussen. C. B., Dransfield. J., Deickmann. V., Barfod. A. S., Pintaud. J.C., Baker. W. J., (2006).** Une nouvelle classification de sous-famille de la famille des palmiers (Arecaceae) : preuves de la phylogénie de l'ADN des plastes, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151, (1). 15- 38.
- 31) **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. and Khebri, S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum L.* *Leban Sci J* 11, 69-81.
- 32) **Babahani, S. (2006)** Contribution à l'évaluation de la production des palmiers mâles dans la région de Ourgla. *Revue des régions arides*.881-885.
- 33) **Babahani, S. (2011).** Analyses biologique et agronomique des palmiers mâles et conduite de l'éclaircissage des fruits chez les cultivars Ghars et Deglet Nour., Thèse de Doctorat; ENSA El Harrach, Algérie. 7,18-20.
- 34) **Babahani, S., Bouguedoura, N., (2009).** Effet de quelques méthodes simples de conservation du pollen sur les caractères de la production dattière. *Science & Technologie C- N°30* p 10.

Références bibliographiques

- 35) **Baharara, J., Amini, E, Salek-Abdollahi, F., Nikdel, N., Asadi-Samani, M. (2015):** Protective effect of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*) on sperm parameters and sexual hormones in male NMRI mice exposed to low frequency electromagnetic field (50 Hz). *J Herb.Med Pharmacol.* 4(3):75-80.
- 36) **Bahmanpour, S., Panjeh, S. M., Talaei, T., Vojdani, Z., Poust, P. A., Zareei, S., & Ghaemian, M. (2006).** Effect of *Phoenix dactylifera* pollen on sperm parameters and reproductive system of adult male rats. *Iran J Med 208 Sci.* 31(4), 208-212.
- 37) **Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., & Vayalil, P. K. (2011).** A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *Food. Res.int*, 44(7), 1812-1822.
- 38) **Ben abdellah, A., (1990).** La phoeniculture. Option Méditerranéenne, Série. A/n°1-les systèmes agricoles Oasiens ; ed CRP, INRAT. Tunisie. 106
- 39) **Ben Abdellah, H. B., Laajimi, A., Guesmi, F., Triki, T., et Ferchichi, A. (2020).** Caractérisation morphologique et biochimique des cultivars rares de palmier dattier dans les oasis de Nefzaoua. *Revue des Régions Arides n°43 (3/2017) – Numéro spécial – Actes du 5ème Meeting International sur l’Aridoculture et les Cultures Oasiennes : Biotechnologie végétale en zones arides et oasiennes.*
- 40) **Bennaceur, M., Lanaud, C., Chevallier, M. H., & Bounaga, N. (1991).** Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant breeding*, 107(1), 56-69.
- 41) **Benouamane, O., Vergara-Barberan, M., Benaziza, A., Garcia-Alvarez-Coque, M. C., Simó-Alfonso, E., China, B., & Lerma-Garcia, M. J. (2022).** Characterization of different cultivars of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves and pollen by comprehensive two-dimensional liquid chromatography of phenolic compounds extracted with different solvents. *Microchemical Journal*, 182, 107874.
- 42) **Benoumane, O. (2015).** Valorisation de quelques dokkars par l’étude de la diversité génétique moyennant les marqueurs morphologiques de l’IPGRI. Thèse de Magistère, Université el-hadj lakhdar batna Institut des sciences vétérinaires et des sciences agronomiques. 180.
- 43) **Bentrad, N.; Gaceb-Terrak, R.; Benmalek, Y.; & Rahmania, F. (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*, 14, 242–256.
- 44) **Bessas, A., Benmoussa, L., Kerarma, M. (2008).** Dosage biochimique des polyphénols dans les dattes et le miel récoltés dans le sud algérien. Diplôme d’ingénieur d’état en biologie

Références bibliographiques

- Option : contrôle de qualité et analyses Université Djillali Liabes -Sidi Bel Abbas- Faculté des sciences, Département de biologie.55.56. 60.
- 45) **Biglari, F., AlKarkhi, A. F.M. and Easa, A. M. (2007)** Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chem* **107**, 1636–1641.
- 46) **Bolou, G.E.k., Attioua, B., N’guessan, A.C., Coulibaly, A., N’guessan, J.D. and Djaman A.J. (2011).** Évaluation in vitro de l’activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 80, 772-790.
- 47) **Boubekri, C., (2014).** Etude de l’activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques Doctorat en sciences Spécialité : Chimie Université Mohamed Khider – Biskra.38-39,67, 71.
- 48) **Boudian, A., Hasnaoui, A., El houmaizi, M. A., Nachtigall, Marion., Ndir, K.N., Wehling, P. (2012).** Genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Figuig oasis (Morocco) using SSR markers, *Int. J. Sci. Advanc. Tech*, 2(3),96-104.
- 49) **Bougedoura, N., Benkhala, A., Bennaceur, M. (2010).** Le palmier dattier en Algérie. In « Biotechnologies du palmier dattier », edited by Frédérique Aberlenc-Bertossis, IRD Editions, Paris., Pages 15-22.
- 50) **Bouziane, Rahal ., H., Boulahbal, O., Blama, A., Mossab, K., Djidda, A., Allam, A., & Tirichine, A. (2010).** Les oasis algériennes : richesse mais diversité menacée. *Revue des Régions Arides*, 24, 76-79.
- 51) **Brac de la perrière.,(1988).** Les recherches sur les ressources génétiques du palmier dattier en Algérie. *Ann.Inst.Nat.Agro. URZA. Elharrach*, 12,493.
- 52) **Cacciola, F.; Rigano, F.; Dugo, P.; & Mondello, L. (2020).** Comprehensive two-dimensional liquid chromatography as a powerful tool for the analysis of food and food products. *Trends. Analyt. Chem.*127, 115894.
- 53) **Chetaille. A., (2002)** Accès aux ressources génétiques et protection des variétés végétales en Afrique centrale et occidentale, partie 1, ICTSD, EANDA Solagral.
- 54) **Corniquel, B., & Mercier, L. (1994).** Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant. Sci.* 101(2), 163-172.
- 55) **Daas, A.S. (2009).** Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) et l’évaluation in vitro de leur activité biologique. Thèse de Magister en Biologie, chimie appliquée. UHLB.

Références bibliographiques

- 56) **Dahir, A.M., (2010)**. Détermination du sexe chez le palmier dattier ; approche histocytologiques et moléculaires ; thèse de doctorat. Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire ; école doctorale biologie intégrative. Univ Montpellier II. France.p:13, 16.
- 57) **Daoud, A.; Drira, M.; Bakari, S.; Hfaeidh, N.; Mnafgui, K.; Kadri, A.; Gharsallah, N. (2015)**. Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arab.J.Chem.* 1-11.
- 58) **Djerbi, M., (1996)**. Prise de phoeniciculture- chapitre : 7, Pollinisation et soins apporté aux régimes, FAO. 79-81.
- 59) **Donzo,M., Sara, A., Diop, M., Samb, A., Bassene, E. et Barry, M.S.(2015)**. Dosage des flavonoïdes totaux et détermination du pouvoir antioxydant dans l'extrait brut des écorces de tronc de *Uapaca togoensis* (Aub. et Léan.) Pax Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes Vol.8 n°1.
- 60) **Dugo, P.; Škeříková, V.; Kumm, T.; Trozzi, A.; Jandera, P.; Mondello, L. (2006)**. Elucidation of Carotenoid Patterns in Citrus Products by Means of Comprehensive Normal-Phase x Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 78, 7743-7750.
- 61) **Dzoyem, J.P., McGaw, L.J. and Eloff, J.N. (2014)** In vitro antibacterial, antioxidant and cyto-toxicactivity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. *BMC Complement. Alter. Med* 14(147), 1-7.
- 62) **Eddine, L. S.; Segn, L.; Nouredine, G.; Mohammed Redha, O.; & Mokni, S. (2013)**. Scavenging activity, anti-inflammatory and diabetes related enzyme inhibition properties of leaves extract from some varieties of *Phoenix dactylifera* L. *Int. Lett.Chem.*9, 125–135.
- 63) **Eissa, E. A., Abd El-Razek, A. B., El-Sharabasy, S. F., & Rizk, R. M. (2009)**. Morphological and molecular genetic characterization of soft date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Egypt. *Egypt. J. Genet. Cytol*, 38(2), 269-284.
- 64) **El kalamouni, C., (2010)**. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de DOCTORAT spécialité: Sciences des Agro-ressources l'Institut National Polytechnique de Toulouse de l'université de Toulouse.70-71.
- 65) **El-Azim M. H. M. A.: El-Mesalamy, A. M. D., Yassin, F. A., & Khalil, S. A. (2015)**. Identification phenolic and biological activities of methanolic extract of date palm pollen (*Phoenix dactylifera*). *J.Microb.Biochem.Technol.* 7, 047-050.

Références bibliographiques

- 66) **El-Haci, I. A., Atik-Bekkara, F., Didi, A., Gherib, M. and Didi, M. A. (2012)** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie* 10, 280-285.
- 67) **Elhoumaizi, M. A., Devanand, P. S., Fang, J., & Chao, C. C. T. (2006)**. Confirmation of Medjool date as a landrace variety through genetic analysis of medjool accessions in Morocco. *J.AMR.Soc.Hort.Sci*, 131(3), 403-407.
- 68) **El-Rayes, D. A. (2009)**. Characterization of three date palm cultivars based on RAPD fingerprints and fruit chemical composition. *Met., Env. & Arid Land Agric. Sci*, 20(2), 3-20.
- 69) **Ishibli, S., et Korpelainen, H. (2008)**. Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica*, 134, 251-260.
- 70) **Etebu, E., & Ukpong, M. (2016)**. Bacterial resistance to antibiotics: Update on molecular perspectives. *Microbiol. Res Int*, 4(4), 40-49.
- 71) **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., & Oueld-Mokhtar, S. M. (2015)**. Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des pennes de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
- 72) **González-Pérez, M. A., Caujapé-Castells, J., & Sosa, P. A. (2004)**. Molecular evidence of hybridisation between the endemic *Phoenix canariensis* and the widespread *P. dactylifera* with Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Syst. Evol.* 247:165-175.
- 73) **Guettouchi, A., Cherif, K., Belguedj, M., Abdelkrim, F., Kadri, H., Belkadi, F. Z., & Ykhlef, N. (2015)**. Inventaire et conservation de la palmeraie de Bou-Sâada, Algérie. *Revue Recherche Agronomique*, 27, 48-56.
- 74) **Gursoy, N.; Sarikurcu, C.; Cengizc, M.; & Solak, M. H. (2009)**. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2381–2388.
- 75) **Gutierrez, I.P., (2021)**. Caracterización de mieles de diferentes orígenes florales. Máster en Técnicas Experimentales en Química. Universidad de Valencia.
- 76) **Habib, H. M.; Platat, C.; Meudec, E.; Cheynier, V.; & Ibrahim, W. H. (2013)**. Polyphenolic compounds in date fruit seed (*Phoenix dactylifera*): characterisation and quantification by using UPLC-DAD-ESI-MS. *J. Sci. Food Agric.* 94, 1084–1089.
- 77) **Hadjeer, A. (2006)**. Utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de diversité des plantes : module d'enseignement technologie basée sur l'ADN. Technologies basées sur la PCR Séquences ciblées (microsatellites, SCAR, CAPS, ISSR), ed Cirad & SupAgro.
- 78) **Hadyatou, D.B., Kossi.E.K., (2007)**. Importance de la préservation des ressources phytogénétiques locales dans le développement durable. ITRA. 27,28.

Références bibliographiques

- 79) **Haider, N., Nabulsi, I., & MirAli, N. (2012).** Phylogenetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Syria using RAPD and ISSR markers. *J. Plant Biol. Res.*, 1(2), 12-24.
- 80) **Hammadi, H., Vendramin, G. G., & Ali, F. (2011).** Microsatellite diversity among Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sub-populations. *Pak. J. Bot.*, 43(2), 1257-1264.
- 81) **Hamwiah, A., Farah, J., Moussally, S., Al-Sham'aa, K., Almer, K., Khierallah, H., Udupa, S., Lababidi, S., Malek, J.A., Aaouine, M. & Baum, M. (2010).** Development of 1000 microsatellites markers across the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genome. In IV International Date Palm Conference A. Zaid and G.A. Alhadrami *Acta Hort.* 882 (269-277).
- 82) **Harrak, H., Hamouda, A., Boujnah, M., & Gaboune, F. (2005).** Teneur en sucres et qualités technologique et nutritionnelle des principales variétés de dattes marocaines. In Actes du Symposium International sur le Développement Durable des Systèmes Oasiens Maroc: Institut National de la Recherche Agronomique. 08-10.
- 83) **Hassan, W.A.; El-kashlan, A.M.; Ehssan, N.A. (2012).** Egyptian Date Palm Pollen Ameliorates Testicular Dysfunction Induced by Cadmium Chloride in Adult Male Rats. *J.Am.Sci.* 8(4), 659-669.
- 84) **Hasson, S. S., Al-Shaqsi, M. S., Albusaidi, J. Z., Al-Balushi, M. S., Hakkim, F. L., Aleemallah, G. M., & Al-Jabri, A. A. (2018).** Influence of different cultivars of *Phoenix dactylifera* L-date fruits on blood clotting and wound healing. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 8(7), 371-376.
- 85) **Hazli, U. H. A. M.; Abdul-Aziz, A.; Mat-Junit, S.; Chee, C. F.; & Kong, K. W. (2019).** Solid-liquid extraction of bioactive compounds with antioxidant potential from *Alternanthera sesillis* (red) and identification of the polyphenols using UHPLC-QqQ-MS/MS. *Food Res. Int.*, 115, 241-250.
- 86) **Heiba. S. A. A., Hoda. A. B. M., Mostafa. E. A. M., Saleh. M.M. S., Ashour. N.E., Hassan. H. S. A. (2015).** The phylogenetic map between three pollinizers and their impact on fruit set, yield and fruit quality of Zaghoul and Samani date palms. *Catrina: The Egyptian. Soc. Environ Sci.*, 11(1), 51-58.
- 87) **Heimler, D.; Vignolini, P.; Giulia, D. M.; Vincieri. F. F.; & Romani, A. (2006).** Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chem.*, 99, 464–469.
- 88) **Henderson, S. A., Billotte, N., & Pintaud, J. C. (2006).** Genetic isolation of Cape Verde Island *Phoenix atlantica* (Arecaceae) revealed by microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 7, 213-223.

Références bibliographiques

- 89) **Hilary, S.; Tomás-Barberán, F. A.; Martínez-Blázquez, J. A.; Kizhakkayil, J.; Souka, U.; Al-Hammadi, S.; Habib, H.; Ibrahim, W.; & Platat, C. (2020).** Polyphenol characterisation of Phoenix dactylifera L. (date) seeds using HPLC-mass spectrometry and its bioaccessibility using simulated in-vitro digestion/Caco-2 culture model. *Food Chem.*311, 125969.
- 90) **Iqbal, M.J., I., Munir, M., & Khan. M. (2009).** Floral characteristics of the different male date palms and their response to fruit setting and yield of cv Dhakki. Pakistan. *J. Agric. Res.*, 22(1/2), 36-41.
- 91) **John, J. A.; & Shahidi, F. (2019).** Phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory activities of seeds and leaves of date palm (Phoenix dactylifera L.). *J.Food Bioact*, 5, 120–130.
- 92) **Jubrael, M.S.J., Udupa, S. M., & Baum, M. (2005).** Assessment of AFLP-based genetic relationships among date palm (Phoenix dactylifera L.) varieties of Iraq. *J. AMR. Soc Hortic. Sci*, 130(3), 442-447.
- 93) **Kahkashan, P., Bokhari, N. A. and Soliman, D. A. W. (2012)** Antibacterial activity of Phoenix dactylifera L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram-positive pathogenic bacteria. *J Med Plant Res* 6, 296-300.
- 94) **Kahouli., I (2010).** Effet antioxydant d'extraits de plantes (laurus nobilis l., rosmarinus officinalis, origanum majorana, oléa europea l.) dans l'huile de canola chauffée. Ed la Faculté des études supérieures département des sols et de genie agroalimentaire faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'Université Laval. 46.
- 95) **Karra, S.; Sebi, H.; Jardak, M.; Bouaziz, M. A.; Attia, H.; Blecker, Ch.; & Besbes, S. (2020).** Male date palm flowers: Valuable nutritional food ingredients and alternative antioxidant source and antimicrobial agent. *S. Afr. J.* 131, 181–187.
- 96) **Khallouki, F.; Ricarte, I.; Breuer, A.; & Owen, R. W. (2018).** Characterization of phenolic compounds in mature Moroccan Medjool date palm fruits (Phoenix dactylifera) by HPLC-DAD-ESI-MS. *J.Food. Compost.Anal.*, 70, 63–71.
- 97) **Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J. L., & Aly, M. A. (2012).** Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (Phoenix dactylifera L.). *Aust. J. Crop Sci*, 6(8), 1236-1244.
- 98) **Kharb, P., & Singh, R. (2020).** Molecular markers as tools to improve date palms. *In Advancement in Crop Improvement Techniques.*319-327.

Références bibliographiques

- 99) **Khouane, A. C., Akkak, A., & Benbouza, H. (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. *Sci. Hort.*274, 109668.
- 100) **Kivilompolo, M.; Obúrka, V.; Hyötyläinen, T. (2008)**. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in the analysis of antioxidant phenolic compounds in wines and juices. *Anal Bioanal Chem*, 391, 373–380.
- 101) **Koen, S.; Pat, S. (2015)**.The opportunities of 2D-LC in the analysis of monoclonal antibodies. *Bioanalysis*, 7(22), 2843-2847.
- 102) **Konate, I., (2007)** : Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia Siliqua* L.) et Des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Spécialité : Biotechnologie Et Biologie Moléculaire, thèse de doctorat université Mohammed V- faculté des sciences rabat.
- 103) **Kriaa,W.; Fatoui, H.; Makni, M.; Zaghal, N.; & Drira, N. E. (2012)**. Phenolic contents and antioxidant activities of date palm (*Phoenix Dactylifera* L.) leaves. *Int.J.Food Prop.*15, 1220–1222.
- 104) **Kula, M.; Glód, D.; & Krauze-Baranowska, M. (2016)**. Application of on-line and off-line heart-cutting LC in determination of secondary metabolites from the flowers of *Lonicera caerulea* cultivar varieties. *J. Pharm.Biomed.Anal*, 131, 316–326.
- 105) **Kwok, P. Y., & Chen, X. (2003)**. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current issues in molecular biology*, 5(2), 43-60.
- 106) **Lam, C. W., & Law, C. Y. (2014)**. Untargeted mass spectrometry-based metabolomic profiling of pleural effusions: fatty acids as novel cancer biomarkers for malignant pleural effusions. *J. Proteome. Res.* 13(9), 4040-4046.
- 107) **Laouini, S.E (2014^b)**. Etude phytochimique et activité biologique d'extrait des pennes de *Phoenix dactylifera* L. dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Doctorat en sciences en : Chimie Industrielle, spécialité : Génie chimique Université Mohamed Khider Biskra. 22 36.
- 108) **Laouini, S.E^a; Segni, L.; Noureddine,GH. ; Ouahrani, M. R.; Mokni, S. (2013)**. Antioxidant, anti-inflammatory and diabetes related enzyme inhibition properties of leaves extract from selected varieties of *Phoenix dactylifera* L. *Inn. J.L. Sci.* 1, 14-18.
- 109) **Le Cleach, S., (2015)**. Dosage des polyphénols du thé vert et du thé noir par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) Master 2 Biologie – Gestion & Marketing Université de Rennes 1 – UFR SVE.6 .10. 11.

Références bibliographiques

- 110) **Lerma García, M.J.** (2011). Desarrollo de métodos de caracterización y autenticación de aceites de oliva y de otros aceites vegetales. Tesis doctoral, Universitat de Valencia, Burjassot, 50.
- 111) **Ma, C.; Dunshea, F. R.; & Suleria, H. A. R.** (2019). LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds in palm fruits (jelly and fishtail palm) and their potential antioxidant activities. *Antioxidants*, 8, 483–503.
- 112) **Mahmoudi, S., Khali, M. and Mahmoudi, N.** (2013) Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques, 9, 35-40.
- 113) **Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N.** (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology Sciences Agronomiques et Biologiques L*, (9), 35-40.
- 114) **Mahrans, G. H.; Abdel-wahab, M.; Attia, A. M. A** (1976). Phytochemical study of date palm pollen. *Planta Med.* **29**, 171-175.
- 115) **Mahrous, A.A.; El-Tahan, A.A.H.; & Hafez, Y.H.** (2021). Effect of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves on productive performance of growing lambs. *Trop. Anim. Health. Prod* **53**, 72 (2021).
- 116) **Mansouri, A.; Embarek, G.; Kokkalou, E.; & Kefalas, P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem*, **89**, 411–420.
- 117) **Mattonai, M.; Parri, E.; Querci, D.; Degano, I.; & Ribechiniet, E.** (2016). Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS method for the determination of polyphenols in mono floral honeys from Tuscany (Italy). *Microchem.J*, **126**, 220–229.
- 118) **Merah, N., Bouacha, M., Besnaci, S., & Kouch, M.** (2021). The mucus of *helix aspersa* as an anti-inflammatory and antibacterial treatment towards multidrug-resistant bacteria from infected wounds. *uttar pradesh journal of zoology*, **43**(16), 28-36.
- 119) **Messaoudi, R.; Abbeddou, S.; Mansouri, A.; Calokerinos, A. C.; & Kefalas, P.** (2013). Phenolic profile and antioxidant activity of date-pits of seven Algerian date palm fruit varieties. *Int. J. Food Prop.* **16**, 1037–1047.
- 120) **Moghaieb R. E.A., Abdel-Hadi A.A., Ahmed M. R.A. and Hassan A. G. M.** (2010). Genetic diversity and sex determination in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) based on DNA markers. *Arab J. Biotech.*, **13**(2), 143-156.
- 121) **Mohammedi,Z.**, (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales dans la région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie

Références bibliographiques

- Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Option : Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses. Faculté des Sciences Université Belkaied Abou Boubakar. 58,65, 66,
- 122) **Mokhtarpour, A., Naserian, A. A., Valizadeh, R. (2014).** Extraction of Phenolic Compounds and Tannins from Pistachio By-products Annual Research & Review in Biology *Sci.Dom. Int.4(8):1330-1338.*
- 123) **Mondello, L.; Tranchida, P.Q.; Stanek, V.; Jandera, P.; Dugo, G.; Dugo, P.; (2005).**Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *J. Chromatogr. A.1086,* 91 – 98.
- 124) **Montero, L., Sáez, V., von Baer, D., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2018).** Profiling of *Vitis vinifera* L. canes (poly) phenolic compounds using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A, 1536,* 205-215.
- 125) **Munier, P., (1973).** Le palmier dattier, ed G.P.Maisonneuve et Larose. Paris .p:9-13, 16-17, 19-20, 22-29, 32, 43, 45, 56, 118, 124,130.
- 126) **Naoui, Y, (2007).** Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech degla. Thèse magister : Technologie alimentaire. UNV-Boumerdes.
- 127) **Nasr, T. A., Shaheen, M. A., & Bacha, M. A. (1986).** Evaluation of seedling male palms used in pollination in the central region of Saudi Arabia. *Date Palm J.*
- 128) **Nešović, M.; Gašić, U.; Tosti, T.; Horvacki, N.; Nedić, N.; Sredojević, M.; & Tešić, Ž. (2021).** Distribution of polyphenolic and sugar compounds in different buckwheat plant parts. *RSC Advances,* 11, 25816-25829.
- 129) **Orabi, S. H., & Shawky, S. M. (2014).** Effect of date palm (*Phoenix dactylifera*) seeds extracts on hematological, biochemical parameters and some fertility indices in male rats. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research,* 17(1), 137-147.
- 130) **PASA, (2021).** Rapport de mission ProGramme d'Appui au Secteur Agricole (PASA) au pôle sud : Biskra et El Oued. Analyse de la chaîne de valeur de la datte dans la wilaya de Biskra.
- 131) **Peter W. Carr and Dwight R. Stoll. (2015).** Two-dimensional liquid chromatography principles, practical implementation and applications. Primer, Agilent Technologies, Inc.1
- 132) **Peyron, G., (2000).** Cultiver le palmier dattier, ed CIRAD. Paris .p:9,12-15, 18,33-35,74.
- 133) **Pintaud, J.C., (2010).** Modèle de domestication et structure de l'agro biodiversité du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In : Aberlenc Bertossi Frédérique (ed.).

Références bibliographiques

- Biotechnologies du palmier dattier : actes du 3ème séminaire du réseau AUF-BIOVEG. Marseille : IRD, p. 107-111. Universitaire de la Francophonie-Biotechnologies Végétales : Biotechnologies du Palmier Dattier, 3., Montpellier (FRA).
- 134) **Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowski, B. (2009)**. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4(8). 25-39.
- 135) **Qadoos, A. H.; Dhafari, H. S.; Al Marzooqi, D. A.; Yaqoubi, A. I.; Kumarappan, A.; Nazir, A.; & ElSORI, D. H. (2017)**. Phenolic content and antimicrobial activities of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits and leaves. *Food Biosci*, 6, 11–15.
- 136) **Rao, S., Santhakumar, A. B., Chinkwo, K. A., & Blanchard, C. L. (2018)**. Q-TOF LC/MS identification and UHPLC-Online ABTS antioxidant activity guided mapping of barley polyphenols. *Food.Chem.* 266, 323-328.
- 137) **Rawashdeh, I., & Amri, A. (2006)**. Genetic characterization of date palm varieties using RAPD markers. *Jordan J. Agri. Sci*, 2(3), 234-242.
- 138) **Rayour, K., (2002)**. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Faculté des Sciences Dhar Mehraz –Fès. Thèse du Doctorat National Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé.
- 139) **Rhouma-Chatti, S., Zehdi-Azzouzi, S., Dakhlaoui-Dkhil, S., Chérif, E., & Trifi, M. (2013)**. Exploitation of AFLP and RAMPO markers in the assessment of genetic diversity within Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. In I International Symposium on Date Palm 994, 231-240.
- 140) **Rurián-henares, J.A. and Morales, F. J. (2008)** Antimicrobial Activity of Melanoidins against *Escherichia coli* Is Mediated by a Membrane-Damage Mechanism. *J Agric Food Chem*, 58, 2357–2362.
- 141) **Sabir, J. S.M., Abo-Aba, S., Bafeel, S., Zari, T. A., Edris, S., Shokry, A. M., et Bahieldin, A. (2013)**. Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. *C.R. biologies*, 337(1), 6-18.
- 142) **Saleh, F.A and Otaibi, M.M. (2013)**. Antibacterial Activity of Date Palm (*Phoenix Dectylifera* L.) Fruit at Different. *J. Food Process Technol*, 4:12.
- 143) **Sanchez, M. C. (2002)**.Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food. Sci. and Tech. Int.* 8-121.

Références bibliographiques

- 144) **Shaheen, M. A., Taha, A. (1984)**. Evaluation of datte palm males used in pollinisation in the central region univ King Saoudi college of agriculture, deprt of plant production; Riyadh, Saudi Arabia.
- 145) **Shakiba, M., Kariminik, A. and Parsia, P. (2011)**. Antimicrobial activity of different parts of Phoenix dactylifera. *Int. J. Mol Clin Microbiol* 1, 107–111.
- 146) **Shapiro, S. and Guggenheim, B. (1994)**. The action of thymol on oral bacteria. *Mol Oral Microbiol* 9, 202-208.
- 147) **Simbolo, M., Gottardi, M., Corbo, V., Fassan, M., Mafficini, A., Malpeli, G., et Scarpa, A. (2013)**. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PloS one*, 8(6), 62692.
- 148) **Soliman, S. S., Ali, B. A., & Ahmed, M. M. M. (2003)**. Genetic comparisons of Egyptian date palm cultivars (Phoenix dactylifera L.) by RAPD-PCR. *Afr. J. Biotechnol.*2(4), 86-87.
- 149) **Srivastav, V. S., Kapadia, C. V., Mahatma, M. K., Jha, S. K., Jha, S., & Ahmad, T. (2013)**. Genetic diversity analysis of date palm (phoenix dactylifera l.) In the kutchregion of india using rapd and ISSR markers. *Emir. J. Food Agric.*25 (11), 907-915.
- 150) **Teow, C. C.; Truong, V.; McFeeters, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V.; & Yencho, G. C. (2007)**. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103, 829–838.
- 151) **Thomas, R.H., Meeking, M.M., Mephram, J.R. (2012)**.The enteric bacterial metabolite propionic acid alters brain and plasma phospholipid molecular species: further development of a rodent model of autism spectrum disorders. *J. Neuroinflammation* 9, 153.
- 152) **Tirichine, M., (2001)**. Inventaire, caractérisation et conservation des cultivars du palmier dattier dans les différentes zones phoenicicoles du Centre- Nord région de Ghardaia. Acte des atelirs sur le palmier dattier. INRA Tougourt.
- 153) **Trifi, M., Ould Boukhary, A., Zehdi, S, Rhouma, S., (2010)** : Les ressources génétiques du palmier dattier en Tunisie. Ed : Colloques et séminaires : Biotechnologies du palmier dattier. Frédérique Aberlenc Bertossi.
- 154) **Ultée, A., Slump, R.A., Steging, G. and Smid, E.J. (2000)** Antimicrobial activity of carvacrol towards Bacillus cereus on rice. *J Food Prot.* 63, 620-624.
- 155) **Vayalil, P. K. (2002)**. Antioxidant and antimutagenic Properties of Aqueous Extract of Date Fruit (Phoenix dactylifera L. Arecaceae). *J Agric Food Chem.* 50, 610-617.
- 156) **Verardo, V.; Riciputi, Y.; Garrido-Frenich, A.; & Caboni, M. F. (2015)**. Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. *Food Chem.* 185, 239–244.

Références bibliographiques

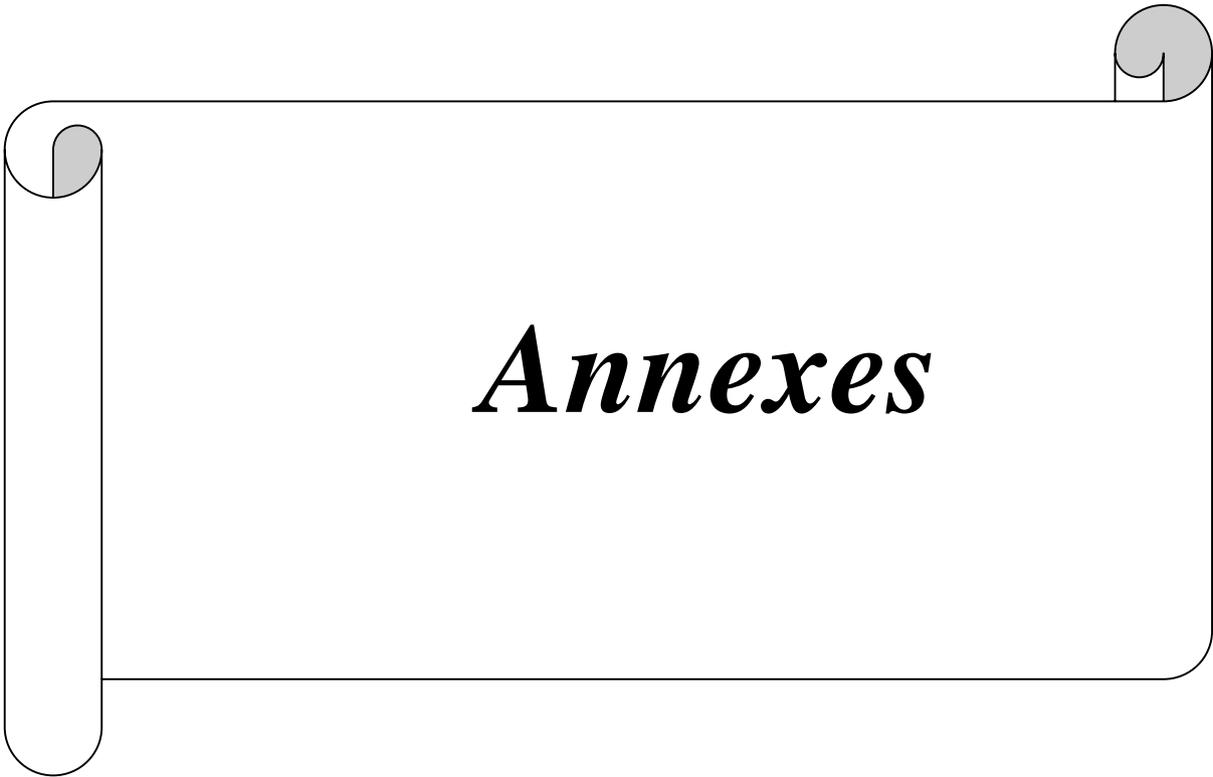
- 157) Vergara-Barberán, M., Navarro-Huerta, J. A., Torres-Lapasió, J. R., Simó-Alfonso, E. F.; García-Alvarez-Coque, M. C. (2020). Classification of olive leaves and pulp extracts by comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polyphenolic fingerprints. *Food Chem*, 320, 126630.
- 158) Wilson, N. S.; Nelson, M. D.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; & Carr, P. W. (2002). Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: II. Effect of a change in conditions. *J. Chromatog. A*. 961, 195–215.
- 159) Younis, R. A., Ismail, O. M., & Soliman, S. S. (2008). Identification of sex-specific DNA markers for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR techniques. *Res.J. Agric.Biolog.Sci*, 4(4), 278-284.
- 160) Yuan, B.; Dinssa, F. F.; Simon, J. E.; & Wu, Q. (2020). Simultaneous quantification of polyphenols, glycoalkaloids and saponins in African nightshade leaves using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with acid assisted hydrolysis and multivariate analysis. *Food Chem*, 312, 126030.
- 161) Zaher, H et Baaziz, M (2006). Contribution à l'étude de l'identification des pieds mâles et femelles chez le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'utilisation des marqueurs moléculaires RAPD. Deuxième Congrès International de Biochimie. Agadir, Maroc, 9-12 Mai 2006.69-73.
- 162) Zehdi, S^a., Sakka, H., Rhouma, A., Salem, A. O. M., Marrakchi, M., & Trifi, M. (2004). Analysis of Tunisian date palm germplasm using simple sequence repeat primers. *African J.Biotech*, 3(4), 215-219.
- 163) Zehdi, S., Sakka, H., Ould Mohamed Salem, A., Rhouma, A., Marrakchi, M., & Trifi, M. (2005). Molecular polymorphism and genetic relationships in a Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) collection using ISSR amplification fingerprinting. *Plant Genetic Resources Newsletter (IPGRI/FAO)*.
- 164) Zehdi, S^b., Trifi, M., Billotte, N., Marrakchi, M., & Christophe Pintaud, J.C (2004). Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. *Hereditas*, 141(3), 278-287.
- 165) Zhang, C. R., Aldosari, S. A., Vidyasagar, P. S., Shukla, P., & Nair, M. G. (2017). Health-benefits of date fruits produced in Saudi Arabia based on in vitro antioxidant, anti-inflammatory and human tumor cell proliferation inhibitory assays. *J. Saudi Soc.Agric.Sci*, 16(3), 287-293.

Références bibliographiques

- 166) **Zhang, Ch.; Aldosari, S.A.; Vidyasagar.S.P.V. (2015).** Health-benefits of date fruits produced in Saudi Arabia based on in vitro antioxydant, anti-inflammatory and human tumor cell proliferation inhibitory assays. *J. Saudi.Soc. A.Sc.*
- 167) **Zhao, Y., Williams, R., Prakash, C. S., & He, G. (2013).** Identification and characterization of gene-based SSR markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *BMC plant biol*, 12(1), 1-8.
- 168) **Ziouti, A.; El Modafar, C.; Fleuriet, A.; Boustani, S. E.; & Macheix, J. J. (1996).** Phenolic compounds in date palm cultivars sensitive and resistant to *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum*, 38, 451–457.

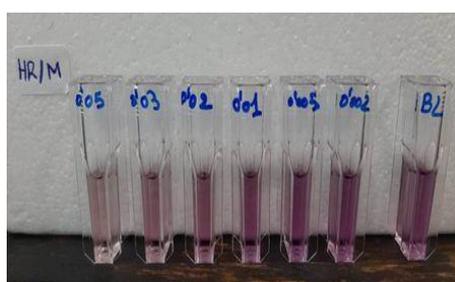
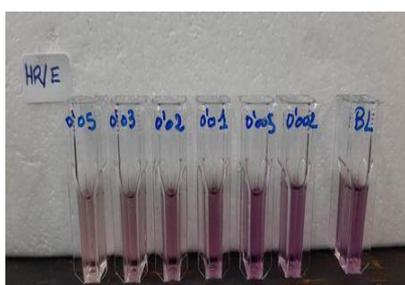
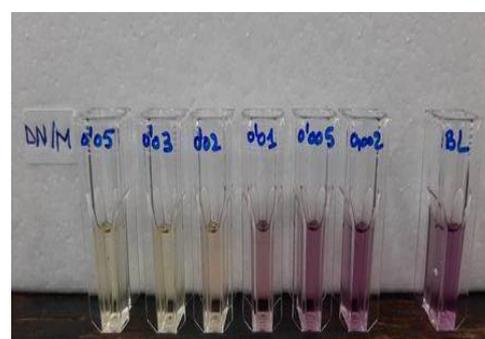
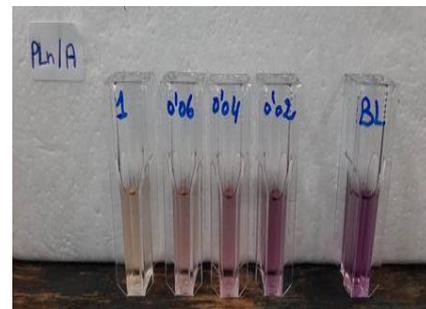
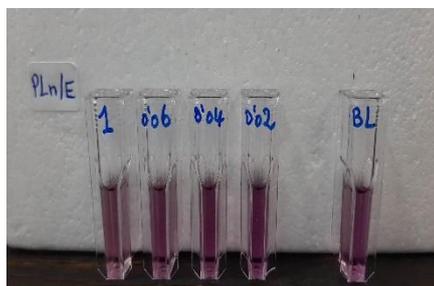
المراجع العربية:

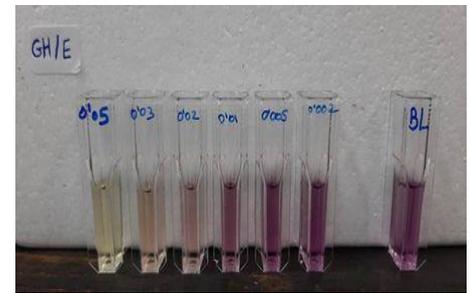
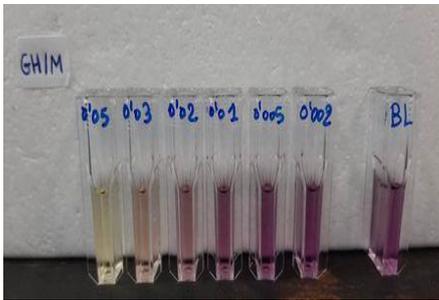
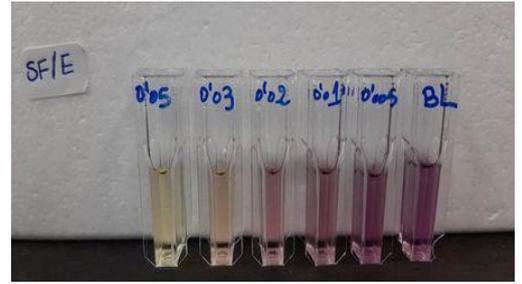
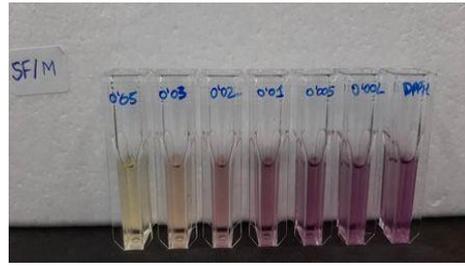
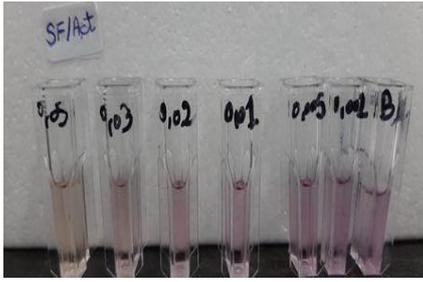
1. **عبد الكريم عبد. مؤيد فاضل عباس (2007).** مقارنة أربعة أصناف من حبوب اللقاح وتأثيرها في بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية لثمار نخلة التمر لصنفي أم الدهن والبريم *Phoenix.dactylifera* مجلة البصرة لأبحاث نخلة التمر المجلد 6 العدد 1 ص 1



Annexes

Annexe I : Le test de DPPH pour les penneset le pollen des cinq cultivars avec les trois solvants :





Les annexes

Annexe II : Tableau de Quantification des composés polyphénoliques dans les pennesd'acétone (A), de méthanol (M) et d'éthanol (E) et les extraits polyphénoliques de pollen. Teneur exprimée en mg par g d'extrait en poids sec.

Compound	Leaves															Pollen		
	DN			HM			SF			GH			HR			DN		
	A	M	E	A	M	E	A	M	E	A	M	E	A	M	E	A	M	E
Hydroxytyrosol	6.8	6.0	6.2	5.3	6.8	4.7	1.6	5.6	5.5	2.5	5.2	3.7	5.3	9.7	5.7	<LO	<LO	<LO
p-Hydroxybenzoic	5.4	3.4	5.7	2.3	2.8	1.9	1.3	1.9	1.9	2.1	3.2	1.9	1.4	4.3	4.5	<LO	<LO	<LO
Cinnamic acid	<LO D	0.5	0.5	0.6														
Protocatechuic acid	3.8	2.2	2.5	2.4	3.0	2.1	<LO D	<LO D	<LO D	1.8	1.9	1.6	2.0	2.3	1.9	<LO D	<LO D	<LO D
p-Coumaric acid	5.6	5.9	5.5	<LO D	<LO D	<LO D	0.8	0.8	0.8	1.2	1.2	1.2	3.0	5.4	2.8	2.9	1.3	1.4
Caffeic acid	<LO D	2.2	2.5	1.9	<LO D	<LO D	<LO D	1.5	1.0	0.9								
3-Caffeoylshikimic acid	9.8	12.0	8.6	6.2	8.9	9.2	4.9	21.0	17.3	5.4	18.1	15.6	3.3	5.6	4.5	3.4	2.4	1.6
Chlorogenic acid	<LO	3.1	3.7	3.5														
Apigenin	<LO	0.008	0.014	0.012														
Kaempferol/luteolin	0.5	0.3	0.3	1.0	1.1	0.9	0.7	1.1	0.8	0.7	0.5	0.4	0.3	0.3	0.3	0.7	1.0	0.3
Dihydrokaempferol	<LO D	0.005	0.006	<LO D														
Quercetin	<LO D	1.5	0.3	0.5														
Rutin	24.0	22.0	21.0	17.4	18.2	16.6	12.5	17.4	15.2	12.2	12.0	14.5	20.5	21.2	18.5	5.3	7.2	6.0
Naringin	<LO																	
Catechin+epicatechin	1.6	2.3	1.4	2.9	2.7	2.2	0.7	1.2	1.1	1.3	3.2	2.3	1.5	1.4	0.9	0.007	0.010	0.007

Les Resultats sont exprimés en moyenne de trois répétitions (RSD compris entre 1.5 and 4.3 %)
 Content below the limit of quantification: <LOQ Content below the limit of detection: <LOD

Les annexes

Annexe III :Tableau de Prédicteurs sélectionnés et coefficients normalisés correspondants du modèle LDA construit pour classer les échantillons de penne de palmier dattier en fonction de leur cultivar

Predictors^a	<i>f</i>₁	<i>f</i>₂	<i>f</i>₃	<i>f</i>₄
1/16	0.60	-1.50	1.28	-0.50
2/17	-4.31	4.32	4.55	1.82
2/18	13.54	-0.63	-1.47	-1.13
2/20	-14.59	-1.28	-6.33	-2.53
6/22	-1.22	0.24	0.16	0.24
7/20	-1.24	4.33	5.44	2.49
7/28	-2.53	-4.06	-4.93	-0.82
8/17	2.14	3.21	0.05	0.06
9/17	0.37	2.23	1.47	0.04
11/20	4.04	0.97	1.95	1.61
14/28	-1.62	-5.34	0.92	-0.64
17/18	-0.21	1.36	-0.38	1.15
18/19	0.82	2.14	-2.84	0.08
19/20	8.12	-1.32	-1.77	-1.26
19/28	3.13	5.76	4.78	2.03

^a Rapports des volumes de pointe pour les composés polyphénoliques.

Résumé : Caractérisation génétique et pharmacologique du pollen et des pennes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) dans la région de Biskra

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est l'une des ressources de vie au sud Algérien et particulièrement pour la région de Biskra, dont de nombreux cultivars sont décrits sur la base des caractères morphologiques. Notre travail est axé principalement sur deux parties majeures ; Il s'agissait d'une part, d'appliquer des méthodes de génotypage à cinq individus mâles de différents cultivars pour en étudier le degré de parenté. Les méthodes ainsi utilisées sont **ISSR** et **RAPD**, qui ont permis de mettre en évidence que la variabilité génétique des individus au sein d'un cultivar était plus faible que la variabilité génétique des individus appartenant à des cultivars différents. Ceci confirme génétiquement la notion de classification en cultivars. D'autre part, les différentes parties de la plante sont connues pour leurs propriétés médicinales. Ces propriétés font l'objet d'identifier quantitativement les principaux composés présents dans des extraits méthanoliques, acétoniques et éthanoliques des pennes et du pollen. Les fractions polyphénoliques ont été extraites et caractérisées en termes d'activité antioxydante et des teneurs en polyphénols totaux (PPT), en flavonoïdes (TF) et en tanins condensés (TTC). Tous les extraits présentaient une activité antioxydante et des valeurs PPT, TF et TTC élevées. En effet, DN étant le cultivar qui engendre les meilleurs résultats. Les extraits ont été analysés par HPLC-MS, où 21 et 23 phénols ont été identifiés, respectivement, dans les extraits de pennes et de pollen. L'analyse LC×LC à assigner des empreintes polyphénoliques utiles pour construire un modèle LDA et de classer les pennes de palmier dattier en fonction de leur cultivar. Enfin, Les fractions méthanoliques, acétoniques et éthanoliques ont été testés pour ses propriétés antibiotiques. Tous les extraits se sont montrés actifs contre les bactéries à Gram positif mais pas contre les bactéries à Gram négatif. Les extraits de pollen étaient les plus actifs. En conséquence, les extraits de pennes et du pollen se sont montrés très prometteurs tant pour leurs propriétés antioxydantes que pour leurs propriétés antibiotiques.

Les mots clés : Palmier dattier, pollen, pennes, la variabilité génétique, ISSR et RAPD, LC×LC, HPLC-MS, empreintes polyphénoliques, LDA, propriétés antibiotiques.

Abstract : Genetic and pharmacological characterization of date palm pollen and pennes (*Phoenix dactylifera* L.) in the Biskra regio

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is one of the living resources in southern Algeria and especially for the Biskra region, many cultivars of which are described mainly based on morphological characteristics. Our investigation, is mainly, focused on two major parts. On the one hand, it was a question of applying genotyping methods to five different male cultivars to study the genetic relationships. The methods used are ISSR and RAPD, which showed that the genetic variability of

individuals within a cultivar was lower than the genetic variability of individuals belonging to different cultivars. This confirms genetically the concept of classification as cultivars. On the other hand, different parts of the plant are known for their medicinal properties. These properties are investigated further, to identify, quantitatively, the main compounds present in methanol, acetic and ethanolic extracts of leaves and pollen. Polyphenolic fractions were extracted and characterized in terms of antioxidant activity and total polyphenols (TPC), flavonoids content (FC) and condensed tannins (CT). All extracts had antioxidant activity and high TPC, FC and CT values, with DN being the cultivar with the best results. The extracts were analyzed by HPLC-MS, 21 and 23 phenols were identified, respectively, in leaf and pollen extracts. The LC×LC analysis provided polyphenolic fingerprints useful for building an LDA model and classifying date palm leaves according to their cultivar. Finally, all fractions were tested for their antibiotic properties. All extracts were active against Gram-positive bacteria but not against Gram-negative bacteria. Pollen extracts were the most active. As a result, leaf and pollen extracts have shown great promise for both their antioxidant and antibiotic properties.

Keywords: Date palm, pollen, leaves, the genetic variability, ISSR and RAPD, LC×LC, HPLC-MS, polyphenolic fingerprints, LDA, antibiotic properties.

المخلص: الوصف الوراثي والصيدلاني لحبوب اللقاح وأوراق نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*) في منطقة بسكرة

نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*) هو إحدى موارد الحياة في جنوب الجزائر وخاصة لمنطقة بسكرة، والتي يتم تعريف العديد من أصنافها استناداً على الصفات المورفولوجية. يركز عملنا أساساً على جزأين رئيسيين؛ من جهة دراسة أساليب التنميط الجيني على خمسة أصناف مختلفة من ذكور النخيل لدراسة درجة القرابة والتنوع البيولوجي. الأساليب المستخدمة هي ISSR و RAPD، والتي أظهرت أن التباين الجيني للأفراد داخل الصنف كان أقل من التباين الجيني للأفراد الذين ينتمون إلى أصناف مختلفة. وهذا يؤكد جينياً مفهوم التقسيم إلى أصناف. من جهة أخرى، تعرف الأجزاء الأخرى من النبات بخصائصها الطبية. استخدمت هذه الخاصية لتحديد الكمي للمركبات الرئيسية الموجودة في مستخلصات الميثانول والأسيتون والإيثانول للأوراق وحبوب اللقاح. تم استخراج المركبات متعددة الفينولات ودراستها من حيث النشاط المضاد للأوكسدة وإجمالي البوليفينول (PPT) والفلافونويدات (TF) والطانينات المكثفة (TTC). كان لجميع المستخلصات نشاط مضاد للأوكسدة وقيم عالية من PPT و TF و TTC. ولكن، صنف دقلة نور هو الذي أعطى أفضل النتائج. تم تحليل المستخلصات بواسطة HPLC-MS، حيث تم تحديد 21 و 23 مركب فينولي، على التوالي، في مستخلصات الأوراق وحبوب اللقاح. يعطي تحليل LC×LC بصمات بوليفينولية مفيدة لبناء نموذج LDA وتصنيف أوراق النخيل وفقاً لصنفها. أخيراً، تم اختبار مستخلصات الميثانول والأسيتون والإيثانول لمعرفة خصائصها كمضادات حيوية. كانت جميع المستخلصات نشطة ضد العزلات البكتيرية Gram positif ولكن ليس ضد العزلات البكتيرية Gram négatif. كانت مستخلصات حبوب اللقاح الأكثر نشاطاً. نتيجة لذلك، أظهرت مستخلصات الأوراق لذكور النخيل وحبوب اللقاح فعالية كبيرة لكل من مضادات الأوكسدة والمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: نخيل التمر، حبوب الطلع، الاوراق، التغير الجيني، ISSR و RAPD، LC×LC، HPLC-MS، بصمات بوليفينولية، LDA، خصائص المضادات الحيوية.