

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERAHMANE MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génétique Fondamentale et Appliquée



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**L'activité antioxydante du grain de
pollen**

Présenté par :
M^{elle} DALIL Karima & M^{elle} RAAD Karima
Soutenu le 26 juin 2018

Devant le jury composé de :

M^{me} Ait Ali D.
M^{me} BAKDI H.
M^r Hammoum M.

MAB
MAA
MAB

Présidente
Examinatrice.
Encadreur.

Année universitaire : 2017 / 2018

Remerciements

Nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier :

- Mr HAMMOUM d'avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, ses conseils qu'il nous a prodigué tout le long de notre travail.*
- Mr OUCHEMOUKHE pour son aide et ses conseils, pour mis à notre disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de la partie pratique et pour le temps qu'il nous a consacré.*
- Mr OTHEMANI et M^{lle} BEDJIF pour leur aide, leurs conseils précieux et pour le temps qu'ils nous ont consacré.*
- A tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, sans oublier l'ensemble des enseignant ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.*

KARIMA ET KARIMA

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A ma très chère mère, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi

A mon très cher père, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice pour réaliser mon rêve.

A mes chers frères : ANIS, NAWAL, AISSA

A mon cher fiancé NACER

Que dieu réunisse nos chemins et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle et à sa famille.

A ma très chère famille, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, mes cousins, mes cousines et mes voisins

A mes meilleurs amis chacune à son nom surtout KARIMA, HANANE, AICHA, THAFATHE.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

A ma collègue KARIMA ainsi que toute sa famille.

A toute la promo de de génétique fondamentale et appliquée.

Que dieu vous protège.

Karima

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude

A ma mère, a qui je dois la réussite, pour l'éducation qu'elle ma prodigué; avec tous les moyens et au prix de toute les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard; pour le sens du devoir qu'elle m'a enseigné depuis mon enfance.

A mon père avec tous mes sentiments de respect, d'amour et de reconnaissance pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions.

A mes chères et adorables sœurs souad et ouïza pour leurs encouragement et leurs soutien.

A mes chers frères

A tous mes chères amies (ies) qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études

A mes sœurs de cœur Sonia, Nina, thirza, Meriem, Nedjma, Zina, Amel et Roza.

A ma binôme Karima qui me donne toujours le courage de faire mieux.

A toute ma famille, cousin, cousine et ma promo de génétique fondamentale et appliquée.

Dalil

Sommaire

Introduction générale	01
------------------------------------	-----------

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur le pollen

I.1. Définition	02
I.2. Structure du grain de pollen	02
I.3. Pollinisation	03
I.4. La récolte	04
I.5. Composition chimique du pollen.....	05
I.6. Conservation du pollen	06
I.7. Les propriétés biologiques du pollen	06

I.2. Radicaux libres et systèmes antioxydant

I.2. Définition des radicaux libres	08
I.3. Origines des espèces réactives de l'oxygène.....	08
I.4. Définition du stress oxydant.....	09
I.5. Conséquences du stress oxydant sur les molécules biologiques	10
I.6. Systèmes antioxydants	10
I.6.1. Définition d'un antioxydant	11
I.6.2. Les principaux enzymes antioxydants	11
I.6.3. Les antioxydants non enzymatiques.....	11

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Échantillonnage	14
II.2. Analyse physico-chimique	15
II.2.1. Humidité.....	15
II.2.2. Teneur en Brix	15
II.2.3. Couleur	15
II.2.4. Dosage des protéines	15
II.3. Evaluation des antioxydants et activité antioxydante	16
II.3.1. Dosage des antioxydants	16
II.3.1.1. Dosage des caroténoïdes	16
II.3.2. Extraction et dosage des composés phénoliques.....	16

II.3.2.1. Préparation des extraits du pollen.....	16
II.3.2.2. Dosage des composés phénolique totaux	16
II.3.2.3 Dosage des flavonoïdes.....	17
II.3.2.4. Dosage des proanthocyanidines.....	17
II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante	17
II.3.2.1. Activité antiradicalDPPH	17
III.3.2.2. Activité antiracical ABTS	18
II.3.2.2. Test au FRAP	19
II.3.2.3. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium	19
II.4. Analyse pollinique.....	20
II.5. Analyse statistique.....	20
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Analyse pollinique	21
III.2. Paramètres physico-chimiques.....	23
III.2.1. Brix	23
III.2.2. Couleur.....	23
III.2.3. Teneur en protéines	24
III.2.4. Humidité	25
III.3.1. Dosage des antioxydants.....	25
III.3.1.1. Caroténoïdes.....	26
III.3.1.2. Composés phénoliques	27
III.3.1.3. Flavonoïdes	28
III.3.1.4. Proanthocyanidines	29
III.3.2. Activités antioxydantes.....	30
III.3.2.1. Activité antiradicalaire DPPH	30
III.3.2.2. Activité antiradical ABTS	31
III.3.2.3. Test au FRAP.....	32
III.3.2.4. Pouvoir réducteur au ferricyannure de potassium.....	32
IV. Corrélations antioxydants et activités antioxydantes	33
Conclusion	34

Liste des abréviations

ABTS : 2,2-azobis-ethylbenzothiazoline-6-sulphoniqu

A.N.O.V.A. :Analyse de la variance.

BSA : Sérum d'Albumine Bovin

CETAM : Centred'Etude Technique apicoles de Moselle..

DPPH : 2,2-diphenyl -1- picrylhydrazyl

EBC :Equivalent de β -Carotène

EAG :Equivalent d'acide gallique

ECA :Equivalent de Catéchine

ERN:Espèces Reactivesd'azote

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène.

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

FeCl₃ : Chlorure Ferrique

GPx : Glutathione peroxydase

GSH: Glutathione

K₃Fe(CN)₆: Potassium ferricyanidine

SOD:superoxyde dismutase

TCA:TriChloroAcétate

TPTZ-Fe³⁺ :tripyridyletriazineferrique

Liste des tableaux

Tableau I : Wilayas de récolte des échantillons du pollen.....	14
Tableau II : Analyse pollinique et pourcentage des pollens analysés.....	22
Tableau III : Résultats des analyses physico-chimiques des pollens étudiés	23
Tableau IV : Résultats des teneurs en antioxydants des pollens étudiés	26
Tableau V : Résultats des activités antioxydantes des pollens étudiés	30

Liste des figures

Figure 01 : Différentes granules de pollen	02
Figure 02 : Anatomie du grain de pollen.....	03
Figure 03 : Schéma de la pollinisation.....	03
Figure 04 : Butineuse récoltant du pollen	04
Figure 05 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants	09
Figure 06 : Structure du 2-phényle chromane	12
Figure 07 : Structure des flavonoïdes	13
Figure 08 : Structure de lycopène.....	13
Figure 09 : Photographie des échantillons des pollens analysés	14
Figure 10 : Photographie des extraits éthanoliques des pollens	16
Figure 11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	18
Figure 12 : Schéma sur la réaction de test FRAP.....	19
Figure 13 : Teneurs en protéines des pollens analysés	24
Figure 14 : Humidité des échantillons des pollens analysés.....	25
Figure 15 : Teneur en polyphénols totaux des pollens analysés	27
Figure 16 : Teneur en flavonoïdes des pollens analysés	28
Figure 17 : Teneur en caroténoïdes des pollens analysés.....	29
Figure 18 : Activité antiradical DPPH des pollens analysés	31
Figure 19 : Pouvoir anti radical de l'ABTS pour les échantillons des pollens analysés.....	31
Figure 22 : Test au FRAP des pollens analysés	32
Figure 21 : Pouvoir réducteur des extraits des pollens analysés.....	33

Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'Homme utilisait les ressources naturelles pour survivre et évoluer dans son environnement. Il s'est investi de plus en plus dans la recherche des produits sains et naturels notamment les produits de la ruche. Au fur et à mesure de leurs utilisations, ils ont découvert que les produits apicoles ont une vertu médicale.

En plus à l'étude des miels, plusieurs travaux ont été menés sur les autres produits, en particulier, le pollen où ils ont démontré son effet sur différentes pathologies, dont la plupart de ces dernières sont induites par le stress oxydant : une situation physiologique expliquée par un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants suivie d'une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Derbel, 2005), qui peuvent causer de nombreuses maladies en raison de leur capacité à endommager tout les types de molécules dans l'organisme (Fontaine, 2007).

Le pollen est considéré comme le gamétophyte mâle des fleurs, mais aussi comme la matière première avec laquelle les abeilles fabriquent le miel (Percie du sert, 2003). Il est très riche en composants chimiques (protéines, enzymes, glucides, les sels minéraux, substances actives telles les phénols), et présente grâce à ces derniers un potentiel intéressant d'antioxydant (Blanc, 2010).

Ce travail consiste à étudier les propriétés physico-chimiques (humidité, couleur, brix) des échantillons collectés du pollen, leurs teneurs en antioxydants (phénols, flavonoïdes, caroténoïdes) ainsi que leurs activités antioxydantes. Pour cela, ce travail englobe deux parties : une synthèse bibliographique comporte des notions nécessaires pour la compréhension du thème et une partie expérimentale regroupant le matériel et les méthodes utilisées lors de différentes analyses réalisées.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I.1 Généralités sur le pollen

Aux cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les produits de la ruche notamment le pollen (Percie du sert, 2011).

I.1. Définition

Le mot pollen est tiré du mot grec « pâle » signifiant farine ou poussière. Petit élément sphérique ou ovoïde de taille oscillant entre 20 et 40 micromètre porté dans les sacs polliniques des anthères de la fleur. Il sert à féconder cette dernière (Donnadieu, 1983 ; Blanc, 2010).



Figure 01 : Différentes granules du pollen (Jaroz, 2003).

I.2. Structure du grain de pollen

Malgré les différences morphologiques que présentent les grains de pollen, mais ils ont une structure anatomiquement constante.

- La membrane s'imprègne de cutine pour se différencier en deux couches dans le grain mur : l'exine et l'intine qui forment le sporoderme.
- L'exine est la membrane externe, formée de fibres cellulosiques protectrices des éventuels écrasements.
- L'intine est la membrane interne, constituée de polysaccharides et de cellulose.
- Le cytoplasme accumule des réserves et divers composés comme les caroténoïdes qui donnent la coloration au pollen (Percie du sert, 2003 ; Cousin, 2014).

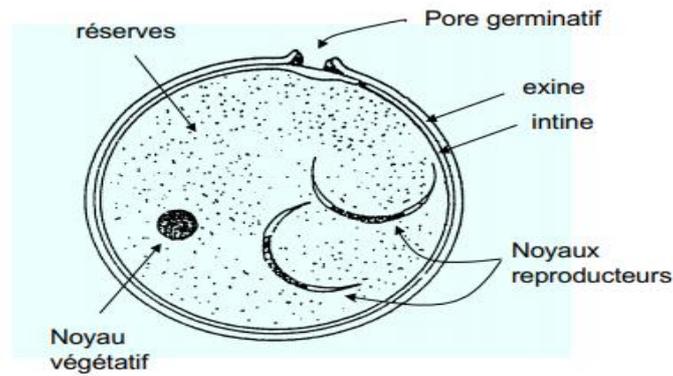


Figure 02 : Anatomie du grain de pollen (Jaroz, 2003).

I.3. Pollinisation

La fécondation des angiospermes et les plantes à fleurs ne peut se faire sans pollinisation. Ce processus consiste en le transfert du pollen de l'anthère vers le stigmate de la fleur et s'opère essentiellement suivant deux modalités :

- **Autopollinisation (autogamie)** : l'ovule est fécondé par le pollen de la même fleur.
- **Pollinisation croisée (allogamie)** : l'ovule est fécondé par le pollen d'une autre fleur (Vaissière, 2005 ; Benachoure, 2008).

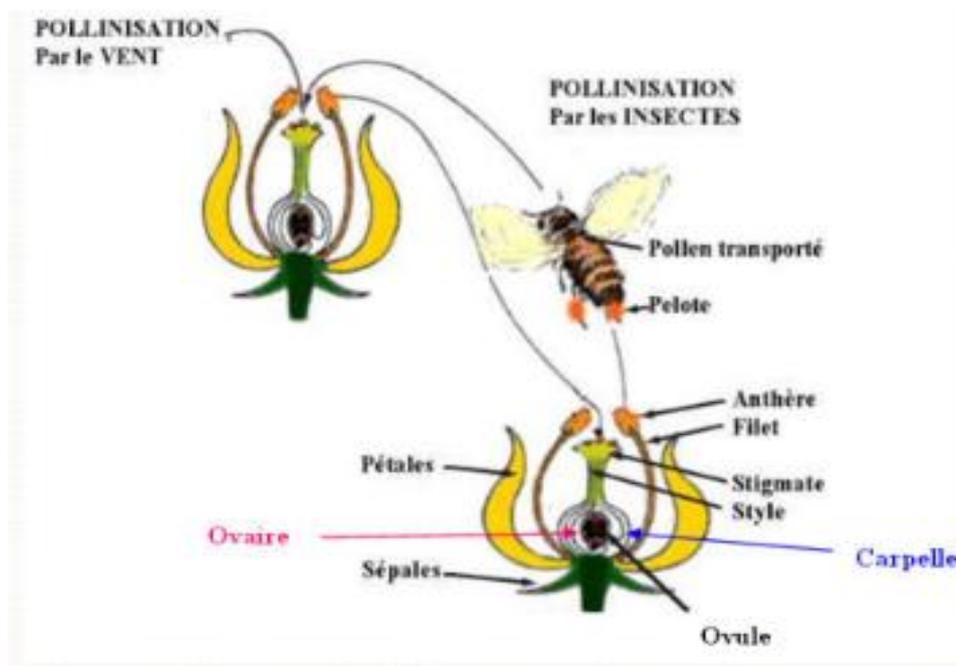


Figure 03 : Schéma de la pollinisation (Benachoure, 2008).

I.4. La récolte

La récolte du pollen d'abeille a été étudiée par Sladen, 1912 (Louveaux, 1958).

La récolte du pollen par les abeilles se fait principalement à la fin de l'hiver et durant le printemps, les abeilles butineuses sortent de la ruche surtout le matin avant 10-11h. Le vole de récolte dure de 3 à 15 min. Elles mordillent avec leurs mandibules les anthères de la fleur et engluent les grains.

Le mécanisme de confection des pelotes se décompose en plusieurs étapes :

- Les grains sont piégés dans les poils du corps de l'abeille et collectés par les mandibules. Les pattes antérieures rassemblent le pollen accumulé sur la partie antérieure du corps.
- Ce pollen est repris par les pattes médiantes qui nettoient également le pollen piégé sur le thorax et l'abdomen.
- Ce pollen est ramené aux corbeilles directement.
- Une patte médiane passe entre les traces des pattes postérieures qui retiennent le pollen grâce à leurs peignes.
- Le pollen est enfin rassemblé par le peigne et tassé en pelote dans la corbeille (Aline ,2005 ; Cousin, 2014).



Figure 04 : Butineuse récoltant du pollen (Gharbi, 2011).

I.5. Composition chimique du pollen

La composition du pollen est très variable selon l'origine florale (Campos *et al.*, 2008).

I.5.1. Teneur en eau

Une des plus importantes propriétés du pollen est sa teneur en eau, car elle affecte à la fois sa vitesse de sédimentation et sa survie, elle est généralement exprimée en pourcentage de la masse totale du grain. Elle est de 18% lorsqu'il est frais (Jaroz, 2003).

I.5.2. Acides aminés

De nombreux acides aminés sont présents dans les charges de pollen. La proline, l'acide glutamique, l'acide aspartique, la leucine sont les majoritaires constituent approximativement 55% de la prédominance des acides aminés (Campos *et al.*, 2008).

I.5.3 Acides gras

Selon Scott 1962, la teneur en acide gras est très variable, on trouve l'acide palmitique, oléique, linoléique, linoléinique et stéarique (Marie- France, 1965).

I.5.4 Lipides

Leur fraction dans le pollen dépend du type de celui-ci :

- Anémophile, c'est-à-dire transporté par le vent, elle sera faible, de l'ordre de 2%.
- Entomophile butiné par les insectes, elle peut atteindre les 14% (Blanc, 2010 ;Cousin, 2014).

I.5.5. Protéines

La teneur en protéines varie entre 1 à 40 g/100g en fonction de l'origine botanique. Elles sont principalement représentées par les acides aminés, les enzymes telles les transférases et certains nucléosides (Campos *et al.*, 2008).

I.5.6. Glucides

Les sucres les plus fréquents sont le fructose, le glucose et le saccharose issus du nectar qui entre dans la confection des pelotes (Cousin, 2014).

I.5.7. Enzymes

De nombreuses enzymes sont présentes dans le pollen comme l'amylase, la pepsine, la trypsine et la phosphatase. (Cousin, 2014).

I.5.8. Antioxydants

Le pollen d'abeille est une source importante d'antioxydants y compris les polyphénols, Les flavonoïdes et la beta carotène (Hurd, 2003).

I.5.9. Vitamines

Les principales vitamines sont celles du groupe B. On trouve également des traces de vitamines liposolubles D, Ket E (Hurd, 2003).

La vitamine B₁₂ par exemple est essentielle dans le métabolisme des glucides et des protéines ainsi que dans la formation des cellules sanguines, donc elle intervient dans le maintien de tous les processus corporels (Hurd, 2003).

I.5.10. Sels minéraux

Le pollen contient plusieurs éléments minéraux : Calcium(Ca), Manganèse(Mn), Magnésium(Mg), Zinc(Zn), Cuivre(Cu), Fer(Fe), Sodium(Na) et Potassium(K).

La composition en éléments minéraux peut être mise dans l'ordre décroissant suivant : K>Mg>Na>Ca>Fe>Mn>Zn>Cu (Szczesna, 2007; Cousin, 2014).

I.6. Conservation du pollen

Le pollen peut être conservé par deux méthodes :

- Séché afin d'éviter les moisissures ou la contamination par des levures, il sera ensuite stocké dans un endroit sec pour limiter son oxydation à l'abri de la lumière et de la chaleur.
- Ou congelé le jour de sa récolte pour conserver ses propriétés thérapeutiques(Blanc, 2010).

I.7. Les propriétés biologiques du pollen

D'après les études menées sur le pollen, il a été démontré que le pollen possède plusieurs propriétés biologiques (Katarzyna, 2015).

- Des études pharmacologiques menées sur des rats et des lapins ont montré que le pollen présente une activité hypolipidémiques. Une étude similaire sur des patients a confirmé que le pollen fait baisser la concentration des substances lipidiques dans le

sang de 20 à 35% ; il a été appliqué avec succès dans l'hyperlipidémie et athérosclérose (Katarzyna, 2015).

- Le pollen a été proposé comme complément alimentaire précieux, car il entraîne le gain du poids plus rapide qu'un régime normal grâce à sa composition en vitamines, acides aminés et biomolécules, il augmente le taux d'hémoglobine et le nombre des globules rouges (Campos *et al.*, 2010).
- Le pollen possède une activité anti-inflammatoire grâce aux composés phénoliques et aux acides gras (phytostérols) en inhibant l'activité de la cyclo-oxygénase et lipo-oxygénase, enzymes responsables de la transformation de l'acide arachidonique en composé qui accentue l'inflammation tels que la prostaglandine et leucotriène.(Pascoal *et al.*, 2014).
- Il a été démontré aussi que le pollen possède une action détoxifiante par la diminution des niveaux de certaines substances telle que l'aspartate transaminase, l'acide phosphatase et la bilirubine dans le sérum sanguin à des valeurs physiologiques (Katarzyna, 2015).
- Le pollen possède aussi une activité anti prostatique grâce à la présence de la quercétine dans ses composants, elle présente un effet anti-prostatique par l'inhibition du cancer androgènes-indépendant à une dose de 100 μ M, et bloque le cycle cellulaire dans diverses phases comme elle joue le rôle d'un répresseur des oncogènes (Katarzyna, 2015).
- Après l'isolation de différents flavonoïdes de pollen d'*Eucalyptus globulus*, *Ranunculussardouset Ulexeuropéans* ; il a été conclu que *herbactin*dérivée de ces dernières possède une action d'antibiotique contre *Pseudomonas aeruginosa* (Campos *et al.*, 2010). Une autre étude récente sur l'extrait de pollen a confirmé que ce dernier a une activité anti microbienne contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiellasp* (Carpes *et al.* , 2007).

I.2. Radicaux libres et système antioxydants

L'oxygène est un élément indispensable à la vie, mais il donne naissance à des dérivés qui chaque jour, causent des dégâts à nos cellules. Ces dérivés sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO).

I.2. Définition des radicaux libres

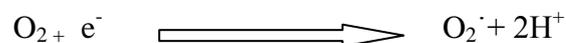
Les radicaux libres sont des composés possédants un électron célibataire non apparié sur leur orbital externe, très instables et très réactifs à une durée de vie courte (de l'ordre d'une micro à nanoseconde) (Bouguerne, 2012).

La production des radicaux libres est absolument nécessaire pour plusieurs fonctions de la cellule telle que la signalisation, l'immunité et la respiration cellulaire, aboutissant à la production des dérivés réactifs de l'oxygène (ERO) et des dérivés de l'azote (ERN), les plus courants sont cités dans le **tableau I (annexe I)** (Kenneth, 2004).

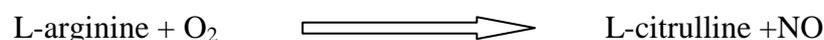
I.3. Origine des espèces réactives de l'oxygène

Les **ERO** peuvent être produites par deux sources soit exogène comme les rayonnements ionisants X et ultra-violet (UV) capables de produire le $O_2^{\cdot-}$ après activation de photosensibilisation, soit par des mécanismes endogènes dont les plus importantes sont :

- Les mitochondries sont le siège d'une importante production de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ lors de la respiration mitochondriale, le dioxygène se réduit en eau mais chaque fois qu'un électron réduit une molécule y'aura une fuite de radicaux $O_2^{\cdot-}$ qui sortent dans le cytosol (1 à 2 % du dioxygène respiré) (Bouguerne, 2012).



- L'oxyde azotique est principalement produit par le système enzymatique la NO-synthase qui transforme l'arginine en présence de la NADPH en hydroxyarginine qui après réduction, se transforme en NO et citrulline selon la réaction :



Le NO⁻ synthase peut réagir avec les métaux de transition ou l'anion superoxyde pour former le peroxinitrite (ONOOH) oxydant fort dont la rupture donne deux oxydants puissants (NO₂[·], OH[·]) (Bouguerne, 2012).

- Les ERO-ERN formées subissent une transformation en une autre forme très réactive, ainsi l'anion superoxyde O₂^{·-} et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ peuvent interagir avec les métaux de transition (fer, cuivre) pour générer des radicaux hydroxyles OH[·] (Réaction Fenton) (Yan-Zhong, 2002).



I.4. Définition du stress oxydant :

La notion du stress oxydant est définie comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, suite à un déséquilibre lié, l'organisme subit soit une production accrue des ERO, soit une diminution de la capacité des défenses anti- oxydantes (Bouguerne, 2012).

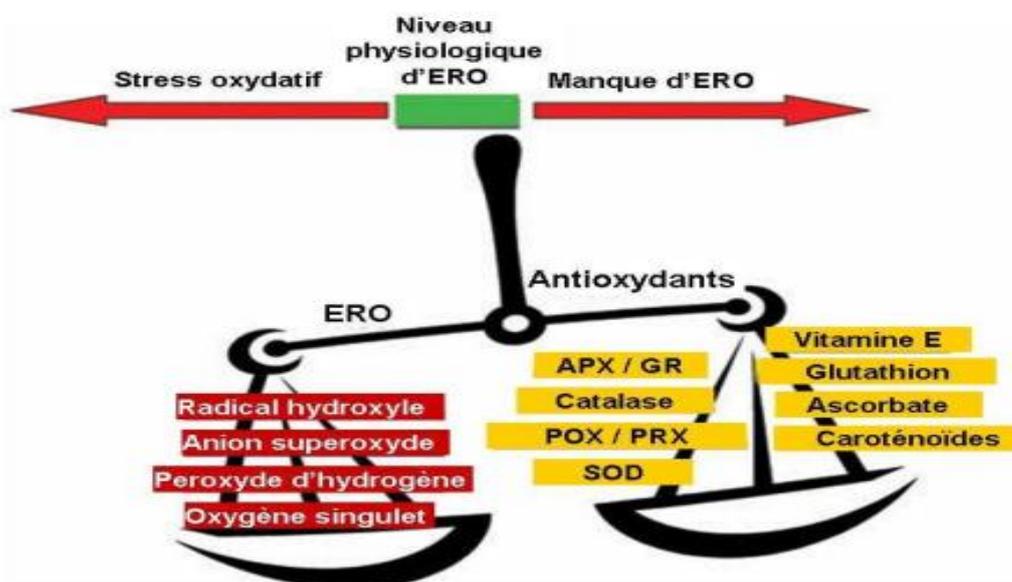


Figure 05 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Bertrand, 2004).

I.5. Conséquences du stress oxydant sur les molécules biologiques :

I.5.1. Les protéines

Les modifications oxydatives des protéines par les ERO peuvent avoir lieu soit sur la chaîne polypeptidique ou /et sur les chaînes latérales, en arrachant un atome d'hydrogène sur le carbone de la liaison peptidique par oxydation de groupement thiol de la protéine, qui peut dans un deuxième temps subir une oxydation irréversible. Ces modifications toucheront à la fois les protéines de structure, les enzymes et les facteurs de transcription (Therond, 2006).

I.5.2. Les lipides

Parmi les espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés, ce qu'on appelle la peroxydation lipidique qui consiste en l'arrachement d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène CH_2 adjacent à deux doubles liaisons, qui se combine ensuite avec l'oxygène pour former un radical peroxy, qui peut arracher un H^\cdot à un autre donneur RH et créer un nouveau radical ainsi de suite. Ce phénomène est à l'origine des maladies cardio-vasculaires et neurodégénératives (Therond, 2006).

I.5.ADN

Le radical OH peut s'additionner sur les doubles liaisons des bases de l'ADN, ou arracher un atome d'hydrogène des groupements méthylés ou des résidus désoxyriboses qui peut aboutir à la formation d'une cassure simple, la formation de 8OXO-dG, possède un fort pouvoir mutagène conduisant à des transversions de type G \rightarrow T qui seront reproduites en protéines et amplifiées tout au long de la croissance cellulaire aboutissant à des phénomènes de cancérisation (Therond, 2006).

I.6. Systèmes antioxydants

Pour contrôler la production permanente des ERO, l'organisme possède des systèmes de défense qui le protègent contre les dommages de ces derniers. Ces défenses permettent de maintenir la concentration en espèces radicalaires à un taux basal (homéostasie physiologique). En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ERO, avec les quelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser.

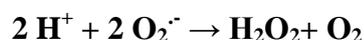
I.6.1. Définition d'un antioxydant

L'antioxydant est une molécule simple qui empêche ou ralentit l'oxydation en neutralisant les radicaux libres, il existe des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

I.6.2. Les principaux enzymes antioxydantes

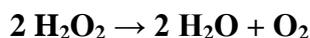
I.6.2.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Elle est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante), et la SOD extracellulaire. La SOD accélère la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygéné donc l'absence de cette enzyme peut être létale (Bouguerne, 2012).



I.6.2.2. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie (Bouguerne, 2012).



I.6.2.3. La glutathion peroxydase (GPX)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est un homotétramère avec un atome de sélénium, présente dans les liquides extracellulaire, dans les cellules au niveau du cytosol et au niveau de la mitochondrie. (Kenneth, 2004). Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H_2O_2), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Bouguerne, 2012).



I.6.3. Les antioxydants non enzymatiques:

Ces antioxydants se divisent en deux principales catégories : les endogènes (molécules issues de la biosynthèse) comme le glutathion et l'acide urique, les exogènes comme les vitamines, les polyphénols ou antioxydants de synthèse (Bouguerne, 2012).

I.6.3.1 Composés phénoliques

Les phénols, sont des molécules qui contiennent un ou plusieurs noyaux aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (OH). Ils sont synthétiques, comme ils peuvent être extraits à partir de plantes (Bouguerne, 2012). Les plus connus des acides phénoliques sont les flavonoïdes.

Les polyphénols inhibent la xanthine oxydase et par conséquent, ils empêchent la formation des radicaux libres (Fang *et al.*, 2002). Ils interrompent aussi la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique en cédant leur atome d'hydrogène aux radicaux pyroxyles (Kahkonen *et al.*, 1999).

I.6.3.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le groupe le plus représentatif des composés phénoliques et sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux (Benhamoum, 2011). Ils sont universels chez les angiospermes (Louis, 2004).

Tous les flavonoïdes ont en commun la structure de la flavane (Louis, 2004) et dérivent de la même structure de base : l'enchaînement 2-phényl chromane (figure 06) (Derbel et Gherida, 2005) à base de quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ (Benhamoum, 2011), ces atomes sont constitués de deux noyaux aromatiques que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**figure 07**) (Athamena, 2009).

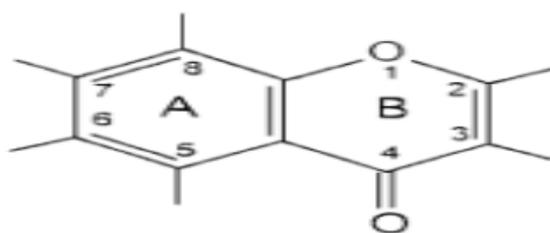


Figure 06 : Structure du 2-phényl chromane (Benhamoum, 2011).

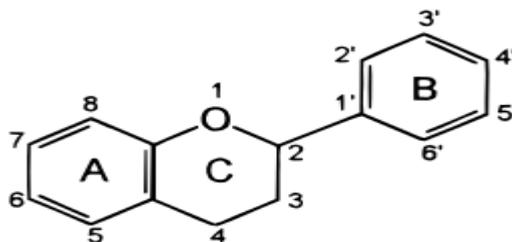


Figure 07 : Structure des flavonoïdes (Pietta, 2000).

Les flavonoïdes régulent le processus du stress oxydant par trois façons :

- Ils captent directement les espèces réactives de l'oxygène (Athamena, 2009).
- Ils chélatent les métaux de transition comme le cuivre et le fer (Curtay et Robin, 2000).
- Ils inhibent l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO (Athamena, 2009).

I.6.3.4 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules.

Tous les caroténoïdes dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation de la même molécule ($C_{40}H_{56}$) : le lycopène (**figure 08**) (Bertrand, 2004).

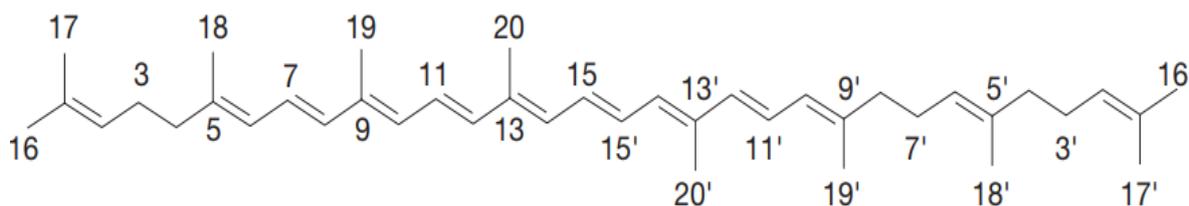


Figure 08 : Structure de lycopène (Derbel et Gherida, 2005).

Les caroténoïdes sont capables de réagir avec les radicaux libres par le transfert d'électron, comme ils présentent une activité anti radicalaire (Hermes-Lima, 2005).

Chapitre II :
Matériel et
méthodes

Matériel et méthodes

Notre étude qui a été réalisée au niveau du laboratoire de physico-chimie de l'université d'Abderrahmane Mira de Bejaïa consiste à faire une analyse physico-chimique de sept échantillons du grain de pollen et de tester leurs activités antioxydantes.

II.1. Echantillonnage

Le travail est réalisé sur sept échantillons du pollen qui sont récoltés dans différentes wilayas d'Algérie en 2018 (**tableau I**), ces derniers ne sont soumis à aucun traitement et sont broyés à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre.

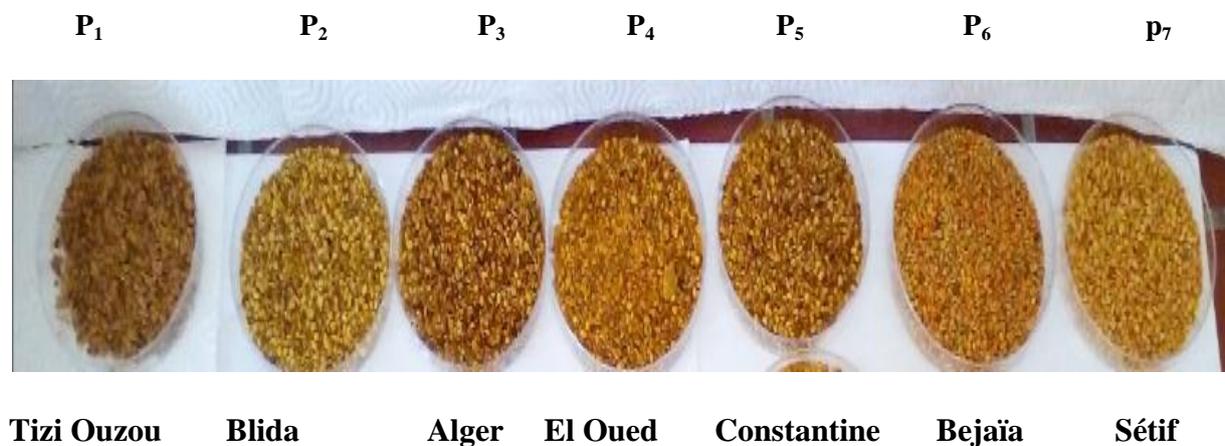


Figure 09 : Photographie des échantillons des pollens analysés.

II.2. Analyses physico-chimiques

II.2.1. Humidité

Pour déterminer l'humidité des échantillons du pollen, une quantité de 2g de ce dernier est séchée dans une étuve à 100 ± 3 °C jusqu'à ce que son poids devient stable. Après refroidissement, les échantillons ont été pesés (Messaid, 2008).

Les résultats sont exprimés comme suit :

$$H\% = \left[\left(\frac{P_0 - P_t}{P} \right) \right] 100$$

P₀ : Poids de l'échantillon avant séchage avec le creuset.

P_t : Poids de l'échantillon et du creuset après séchage

P : Poids pesé (2g).

II.2.2. Teneur en Brix

Le Brix exprime le pourcentage de la concentration des solides solubles contenus dans un échantillon (Messaid, 2008).

Une quantité de 1 g du pollen broyé est dissoute dans 10 ml d'eau distillé. Après agitation pendant 20 min, la solution est filtrée, une goutte de ce dernier est placée sur la surface du prisme du réfractomètre pour déterminer le Brix, ce dernier est lu directement sur l'appareil.

II.2.3. Couleur

Cette caractéristique physico-chimique de pollen est déterminée selon la méthode de quantification spectroscopique.

Une quantité de 0,07 g du pollen est dissoute dans 10 ml d'éthanol. Après agitation et filtration, l'absorbance est mesurée à 450 nm (Bathe et Singh, 1999).

II.2.4. Dosage des protéines

La teneur du pollen en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford. Cette dernière est une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation d'un bleu de Coomassie G 250 qui se fixe au groupement NH_3 de la protéine (Bradford, 1976).

Une quantité de 100 μl d'extrait du pollen est ajoutée à 5 ml du réactif de Bradford. Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 595 nm.

Les concentrations en protéines sont exprimées en mg équivalent de sérum d'albumine bovin par 100 g d'échantillon du pollen (mg EBSA /100g).

II.3. Evaluation des antioxydants et activité antioxydante

II.3.1. Dosage des antioxydants

II.3.1.1. Dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont extraits par la méthode de Sass-Kiss *et al.*, (2005). 20 ml d'un mélange de solvants (hexane, acétone, éthanol : (2/1/1)) sont ajoutés à 0,2 g d'échantillon de pollen broyé. Après 2 heures d'agitation, formation de trois phases distinctes dont la phase hexanique est récupérée puis l'absorbance est déterminée à 450 nm.

Les concentrations en caroténoïdes sont exprimées en mg équivalent de la β carotène par 100 g d'échantillon du pollen (mg E β C/100g).

II.3.2. Extraction et dosage des composés phénoliques

II.3.2.1 Préparation des extraits de pollen

Une quantité de 0,5 g du pollen est ajoutée à 70ml d'éthanol. Après 2 heures d'agitation, la solution obtenue est filtrée et conservée dans des pots en plastique.

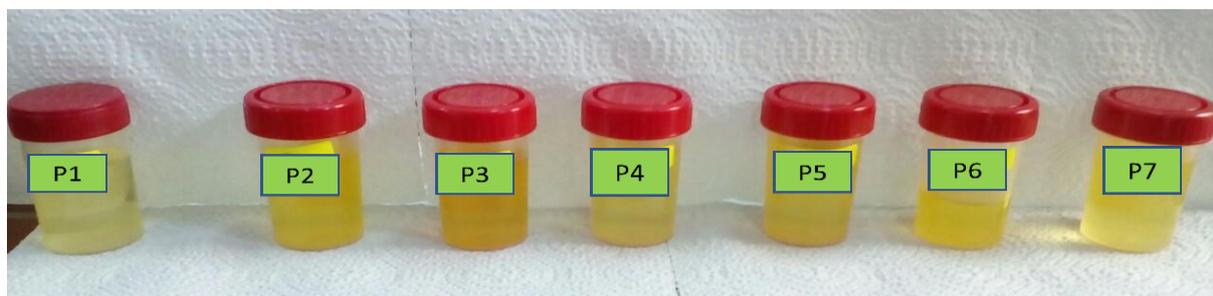


Figure 10 : Photographie des extraits éthanoliques du pollen.

II.3.2.2. Dosage des composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Al *et al.*, 2009). Ce réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des composés phénoliques, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleu produite est proportionnelle aux teneurs des composés phénoliques dans la solution (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

Un volume de 100 μ l d'extrait de pollen est mélangé avec 100 μ l du réactif du Folin-Ciocalteu (50%), puis 2 ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (2%) sont ajoutés au mélange réactionnel. Ce dernier est laissé pendant 30min à l'abri de la lumière puis l'absorbance est mesurée à 750 nm. Les concentrations en composés phénoliques sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100 g d'échantillon de pollen (mg EAG /100g).

II.3.2.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode décrite par Kim, 2003, modifiée par Al *et al.*, (2009).

Un volume de 100 µl d'extrait de pollen est mélangé avec 4 ml d'éthanol et 300 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) (5%), ce dernier est laissé pendant 5 min puis 300 µl de chlorure d'aluminium (AlCl₃) (10%) sont ajoutés, ce mélange est laissé pendant 6 min et à la fin une quantité de 2 ml d'hydroxyde de sodium est ajoutée (NaOH). L'absorbance du mélange est mesurée à 510 nm. Les concentrations en flavonoïdes sont exprimés en mg équivalent de catéchine par 100g d'échantillon du pollen (mg ECA /100g).

II.3.2.4. Dosage des proanthocyanidines

Le dosage des proanthocyanidines a été déterminé par la méthode du HCL/Butanol (Maksimovic *et al.*, 2005).

Une quantité de 500 µl d'extrait de pollen est mélangée avec 2 ml du réactif (HCL/butanol). Après 1 heure d'incubation au bain-marie à 95 °C, l'absorbance est lue à 530 nm. Les concentrations en proanthocyanidines sont exprimées en mg équivalents de catéchine par 100 g du pollen (mg ECA/100g).

II.3.2. Évaluation de l'activité antioxydante :

II.3.2.1. Activité antiradicalaire -DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre stable (Gulcin *et al.*,2003). Cette stabilité est due à la délocalisation de son électron célibataire au tour de la molécule en empêchant sa dimérisation. Cette délocalisation donne naissance à une couleur violette foncée qui peut disparaître grâce à la présence d'une molécule antioxydante dans le milieu et formation d'une couleur jaune pâle (figure 11) (Molyneux,2004).

Un volume de 100 µl d'extrait de pollen est mélangé avec 2 ml d'une solution de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 15 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

Le pourcentage de réduction est donné selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire}(\%) = \left[\left(\frac{\text{Absc} - \text{abse}}{\text{Absc}} \right) \right] 100$$

Abs_c : Absorbance de contrôle.

Abs_e : Absorbance de l'échantillon.

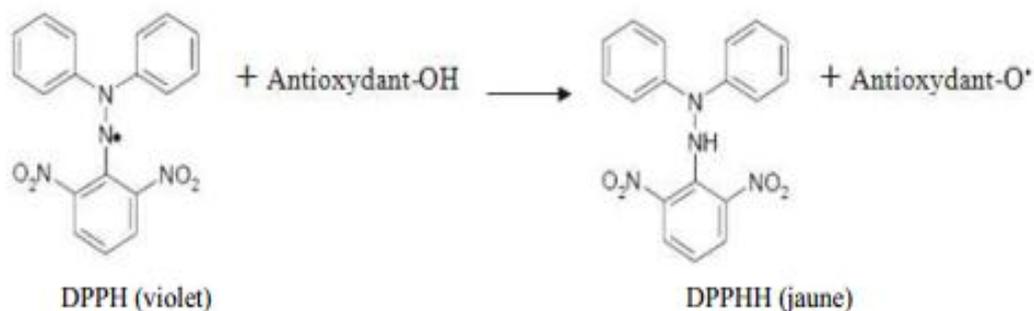


Figure11 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Gongo, 2012).

II.3.2.2. Activité antiradical ABTS

La méthode de radical ABTS (2,2-azobis-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique) est l'une des tests les plus utilisés, il est basé sur la transformation et la réduction d'un radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en ABTS[•] incolore par un antioxydant (Re *et al.*, 1998).

Une quantité de 100 µl d'extrait de pollen est mélangée avec 1 ml de la solution d'ABTS. Le mélange est laissé pendant 7 min, l'absorbance est lue à 734 nm.

La capacité scavenging est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire}(\%) = \left[\left(\frac{\text{Absc} - \text{abse}}{\text{Absc}} \right) \right] 100$$

Abs_c : Absorbance de contrôle.

Abs_e : Absorbance de l'échantillon.

II.3.2.3. Test au FRAP

Le pouvoir antioxydant est déterminé par le test de FRAP (FericReducingAntioxidant Power). En présence d'un antioxydant, le complexe tripyridyletriazine ferrique (TPTZ-Fe₃⁺) se réduit en sa forme ferreux (TPTZ-Fe₂⁺) qui donne la couleur bleu (figure 12) (Aljadi *et al.*, 2004).

Le test de FRAP est réalisé selon le protocole décrit par Makcimovic *et al.*, (2005). Un volume de 100 μ l d'extrait de pollen dilué cinquième (100 μ l d'extrait +400 μ l d'éthanol) est mélangé avec 1 ml de la solution de FRAP. Après 5 min, l'absorbance est lue à 593 nm. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100 g d'échantillon de pollen (mgEAG/100g).

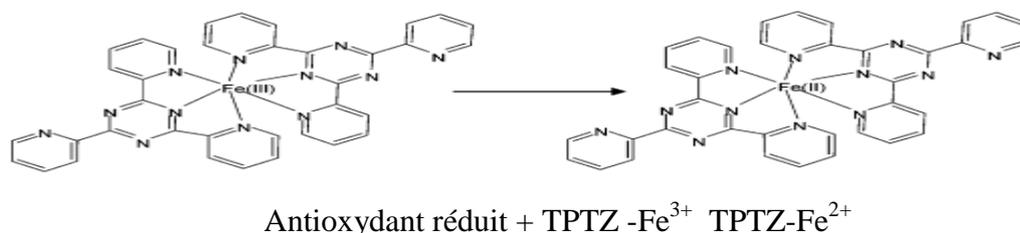


Figure 12 : Schéma sur la réaction de test de FRAP (Prior *et al.*, 2005).

II.3.2.4. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

Le test du pouvoir réducteur repose sur la capacité des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le chlorure ferrique (FeCl₃) en chlorure ferreux (FeCl₂) en présence de ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] (Sousa *et al.*,2008).La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Gulcin *et al.*, 2005).

Le protocole est décrit par Beretta *et al.*, (2005).Un volume de 500 μ l d'extrait de pollen est homogénéisé avec 1500 μ l de tampon phosphate (pH 6,6) et 1500 μ l de ferricyanure de potassium [(K₃Fe(CN)₆] (1%).Après agitation, le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min, puis 1500 μ l de trichloroacétate (TCA,10%) sont ajoutés à ce dernier. Un volume de 1250 μ l est prélevé de mélange et dilué dans 1250 μ l d'eau distillé puis 250 μ l de chlorure ferrique (FeCl₃) (0,1%) sont additionnés. Après 10 min, l'absorbance est lue à 700nm.

Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100g d'échantillon de pollen (mgEAG/100g).

II.4. Analyse pollinique :

Le protocole décrits par la commission internationale de botanique apicole est utilisé pour l'analyse pollinique des échantillons de pollen (Louveaux *et al.*, 1978).

Une quantité de 1 g de pollen broyé est dissoute dans 50 ml d'eau distillé, après agitation et homogénéisation pendant 20 min, le surnageant est éliminé. 60 μ l de l'homogénat est étalé sur une lame en verre puis sécher à l'étuve. Après séchage, les lames sont recouvertes de gélatine glycérine. L'examen au microscope optique est réalisé au grossissement (G×40).

L'identification des grains de pollen est effectuée grâce aux banques de données du Centre d'Etude Technique apicoles de Moselle, France (CETAM).

II.5. Analyse statistique :

Une analyse statistique est réalisée par le logiciel STATISTICA par application d'une analyse de la variance (A.N.O.V. A) pour tous les paramètres.

À l'aide de statistique élémentaire, les matrices de corrélation sont déterminées afin d'étudier la corrélation entre les différents paramètres. Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois essais.

Les résultats sont classés par ordre décroissant $a > b > c > d > e > f > g$. Les valeurs qu'ont la même lettre ne présentent aucune différence significative et les barres verticales représentent les écart-types.

*Chapitre III :
Résultats et
discussion*

Résultats et discussion

III.1. Analyse pollinique

L'analyse pollinique consiste à déterminer l'origine botanique des pollens et aussi ses caractéristiques comme : la forme, la taille, la couleur ainsi que les espèces existantes.

Selon les recommandations de Louveaux *et al.*, (1978), les pollens identifiés sont classés selon leur fréquence pollinique dans les catégories suivantes : pollens dominants (> 45%) ; pollens d'accompagnements (16 – 45 %) ; pollens minoritaires (3-15%) ; pollens très minoritaires (<3%).

Les résultats de l'analyse pollinique récapitulés dans le **tableau II** révèlent que cinq échantillons sont des pollens monofloraux (P1, P2, P3, P4, P5) alors que les deux autres sont des pollens polyfloraux (P6, P7).

La richesse du pollen en différentes formes peut être due aux conditions climatiques, le nombre de fleurs que l'abeille a butiné et l'origine géographique.

Tableau II : Analyse pollinique et pourcentage des pollens analysés

Echantillons	Pollens dominants (>45%)	Pollens d'accompagnements (16-45%)	Pollens minoritaires (3-15%)	Pollens très minoritaires (≤3%)	Origine botanique
P1	Ericaceae (<i>Rhododendron ferruginum</i>) (50%)	Absence	Astéraceae (10%) Liliaceae (14%) Fabaceae (11%) Rosaceae (14%)	Apiaceae (1%)	Monofloraux
P2	Chenopodiaceae (49%)	Astéraceae (<i>Solidagolabra</i>) (16%)	Acacia (12%) Gentianaceae (9%) Liliaceae (8%) Rhamnaceae (7%)	Liliaceae (1%)	
P3	Astéraceae (<i>Solidago glabra</i>) (49%)	Liliaceae (22%)	Gentianaceae (7%) Ericaceae (10%) Cyperus (6%) Astéraceae (<i>Arnica montana</i>) (5%)	Fabaceae (1%)	
P4	Chenopodiaceae (50%)	Gentianaceae (23%)	Asteraceae (<i>Solidago glabra</i>) (15%) Fabaceae (10%)	Rhamnaceae (1%)	
P5	Astéraceae (<i>Solidago glabra</i>) (52%)	Astéraceae (<i>Arnica montana</i>) (20%)	Chenopodiaceae (14%) Liliaceae (6%)	Malvaceae (3%) Echium (1%)	
P6	Absence	Chenopodiaceae (44%) Gentianaceae (27%)	Acacia (10%) Astéraceae (<i>helianthusannuus</i>) (8%) Fabaceae (5%) Brassicaceae (5%)	Ericaceae (1%)	Polyfloraux
P7	Absence	Chenopodiaceae (31%) Astéraceae (<i>Adenostylealliariae</i>) (26%) Fabaceae (25%)	Brassicaceae (7%) Apiaceae (6%)	Brassicaceae (<i>Brossicassp</i>) (3%) Fabaceae (2%)	

III.2. Paramètres physico-chimiques

Tableau III : Résultats des analyses physico-chimiques des pollens étudiés.

Echantillons	Brix (%)	Couleur (%)	Protéines (mg EBSA /100g)	Humidité (%)
P1	5,10±0,10 ^{cd}	0,110±0,003 ^f	52,59±27,24 ^{de}	34±11,69 ^{ab}
P2	5,03±0,05 ^{cd}	0,269±0,004 ^b	237,59±30,70 ^b	16,25±7,75 ^b
P3	4,50±0 ^b	0,316±0,001 ^a	30,76±14,40 ^e	25,5±1,5 ^{ab}
P4	4,96±0,05 ^d	0,168±0,002 ^e	151,32±14,06 ^c	55,33±46,20 ^a
P5	4,50±0 ^b	0,187±0,002 ^d	52,59±15,69 ^{de}	23,33±0,57 ^b
P6	5,16±0,05 ^c	0,255±0,004 ^c	278,12±19,47 ^a	25,16±1,52 ^{ab}
P7	5,73±0,15 ^a	0,183±0,003 ^d	81,69±12,47 ^d	25,5±2,05 ^{ab}

III.2.1. Brix

Le contenu des solides solubles dans les échantillons de pollen varie entre (4,50±0 %) pour P3 et P5 à (5,73±0,15 %) pour P7.

L'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas une différence significative à $p < 0,05$ entre (P1 et P2) ;(P3 et P5). Tandis que P4, P6, P7 présentent une différence significative qui peut être due à l'origine botanique de ces échantillons (**tableau III**).

III.2.2. Couleur

L'intensité de la couleur est liée à la présence de pigments, tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes (Khalil *et al.*, 2012).

Les couleurs des différents échantillons de pollen varient entre (0,110±0,003%) pour P1 et (0,316±0,001%) pour P3.

L'analyse de la variance montre une différence significative entre tous les échantillons de pollen sauf P5 et P7 (**tableau III**).

Les différences des couleurs obtenues peuvent être expliquées par la composition chimique telle que les flavonoïdes et les caroténoïdes des pollens analysés et par l'origine botanique.

II.2.3. Teneurs en protéines

Les teneurs en protéines des échantillons de pollen ont été déterminées par la méthode de Bradford et sont représentées dans la figure 13.

La valeur la plus élevée est celle de l'échantillon P6 (278,12 ±19,47 mg EBSA/100g) et la plus petite est celle de l'échantillon P3 (30,76±14,40 mg EBSA/100g). Nos résultats sont inférieurs à celles rapportés par Çelemlı Gençay *et al.*, (2017) qui varient de 5000 mg EBSA/100 g à 7800 mg EBSA/100g.

L'analyse statistique de la variance révèle une différence significative pour les cinq échantillons (P2, P3, P4, P6, P7) alors que P1 et P5 ne présentent pas une différence significative. Nous pouvons expliquer ces différences par la période de récolte, les conditions de stockage et l'origine botanique.

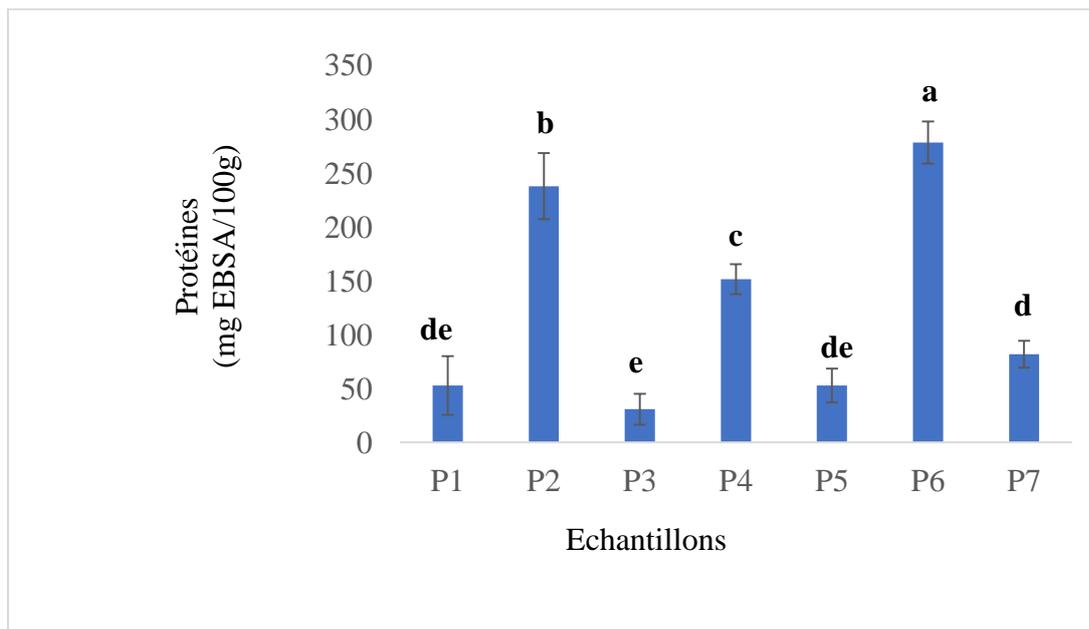


Figure 13 : Teneurs en protéines des pollens analysés

Chaque valeur représente la moyenne ± écartype (n=3).les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

II.4. Humidité

La teneur en eau de pollen est un indicateur de qualité, elle touche plusieurs paramètres du produit dont les plus importants : le goût, l'arôme et la conservation (Margano *et al.*, 2011).

La plus grande teneur revient à l'échantillon P4 ($55,33 \pm 46,20\%$) et la plus faible revient à l'échantillon P2 ($16,25 \pm 7,75\%$) (**Figure 14**). Morgano *et al.*, (2011) et Almeida-Murdiam *et al.*, (2005) ont rapporté une valeur en humidité de pollen de Brésil inférieure à celles obtenues dans cette étude (10%, 7,4%) respectivement.

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ montre qu'il n'existe pas une différence significative entre les échantillons (P1, P3, P6 et P7) ; (P5 et P2) sauf l'échantillon P4. Ce qui peut être due au climat, période de récolte, processus de séchage et conditions de stockage.

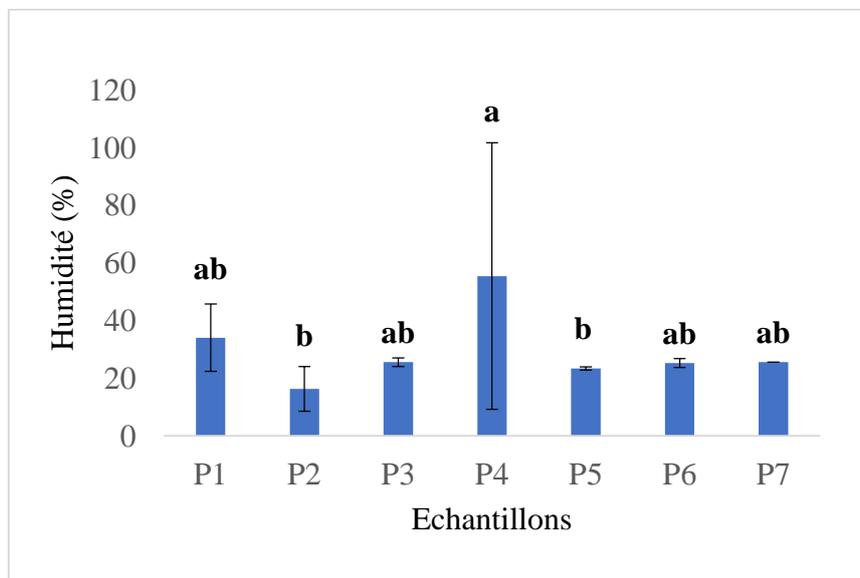


Figure 14 : Humidité des pollens analysés

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype ($n=3$). Les valeurs portant des lettres différentes représentent des différences significatives.

III.3.Évaluation des antioxydants et activités antioxydante

III.3.1. Dosage des antioxydants

Tableau IV : Résultats des teneurs en antioxydants des pollens étudiés.

Échantillons	Composés phénoliques totaux (mg EAG/100g)	Flavonoïdes (mg ECA/100g)	Caroténoïdes (mg EBC/100g)	Proanthocyanidines (mg ECA/100g)
P1	2168,07±9 ^d	190,73±25,48 ^d	19,56±2,51 ^f	547,95±8,49 ^b
P2	2785,44±31,23 ^a	698,22±56,62 ^a	86,73±2,60 ^b	690,21±53,06 ^a
P3	2157,68±62,12 ^d	478,79±84,75 ^b	68,47±1,40 ^c	493,99±30,63 ^b
P4	2585,89±39,48 ^b	482,17±10,85 ^b	25,68±2,73 ^e	405,69±22,48 ^c
P5	2471,56±56,67 ^c	332,51±23,63 ^c	19,16±1,24 ^f	513,61±67,44 ^b
P6	2645,13±25,39 ^b	459,66±39,12 ^b	106,67±2,29 ^a	547,95±51,68 ^b
P7	992,57±99,10 ^e	225,61±3,89 ^d	59,29±3,35 ^d	415,50±42,48 ^c

III.3.1.1. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles présents dans de nombreux organismes vivants.

La figure 15 montre que P6 présente la plus grande valeur en caroténoïdes (106,67±2,29 mg E βCA/100 g) et P5 présente la plus faible valeur (19,16±1,24 mg E βCA/100 g). Ces résultats obtenus sont supérieurs à celles rapportés par Almeida *et al.*, (2005) qui varient de 1,338 mg EBC/100 g à 13,66 mg EβC/100g, cela confirme que nos échantillons contiennent une quantité importante en caroténoïdes.

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ montre que les échantillons P2, P3, P4, P6, P7 présentent une différence significative entre eux, par contre P1 et P5 ne montrent aucune différence significative. La différence des teneurs en caroténoïdes des échantillons de pollen peut être due à l'origine botanique.

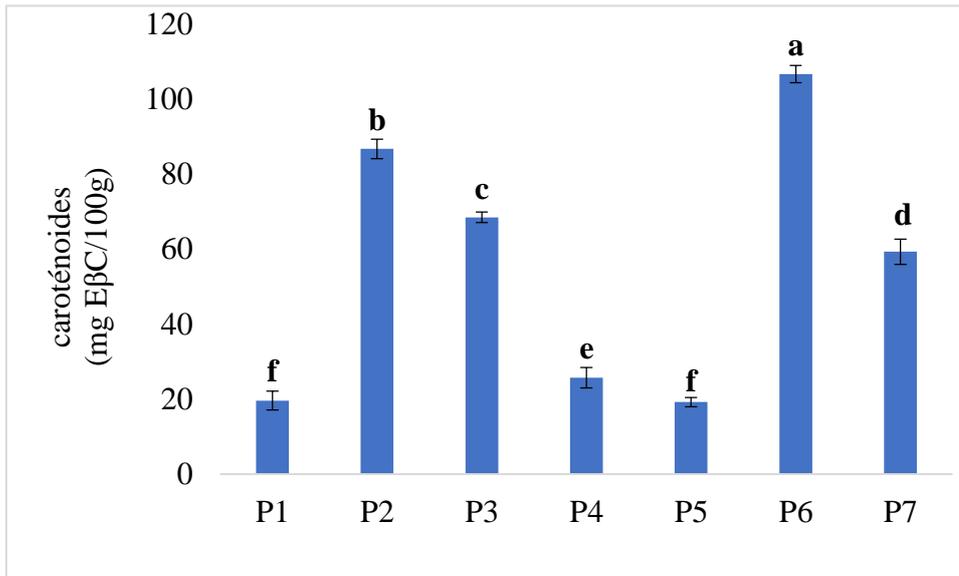


Figure 15 : Teneurs en caroténoïdes des pollens analysés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype (n=3). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives

III.3.1.2. Composés phénoliques totaux

La teneur totale en polyphénols a été mesurée sur la base de la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les teneurs en polyphénols varient de $992,57 \pm 99,10$ mg EAG/100g (P7) à $2785,44 \pm 31,23$ mg EAG/100g (P2) (**figure 16**). Les résultats obtenus sont dans la marge rapportée par Kroyer *et al.*, (2001) qui sont entre 2140 mg EAG/100g à 2460 mg EAG/100g.

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ montre que les échantillons (P1 et P3) ; (P4 et P6) ne présentent aucune différence significative, Tandis que P2, P5, P7 présentent une différence significative. Ces différences des teneurs en polyphénols des échantillons de pollen peuvent être dues à l'origine florale, à la période de récolte, et à l'origine géographique.

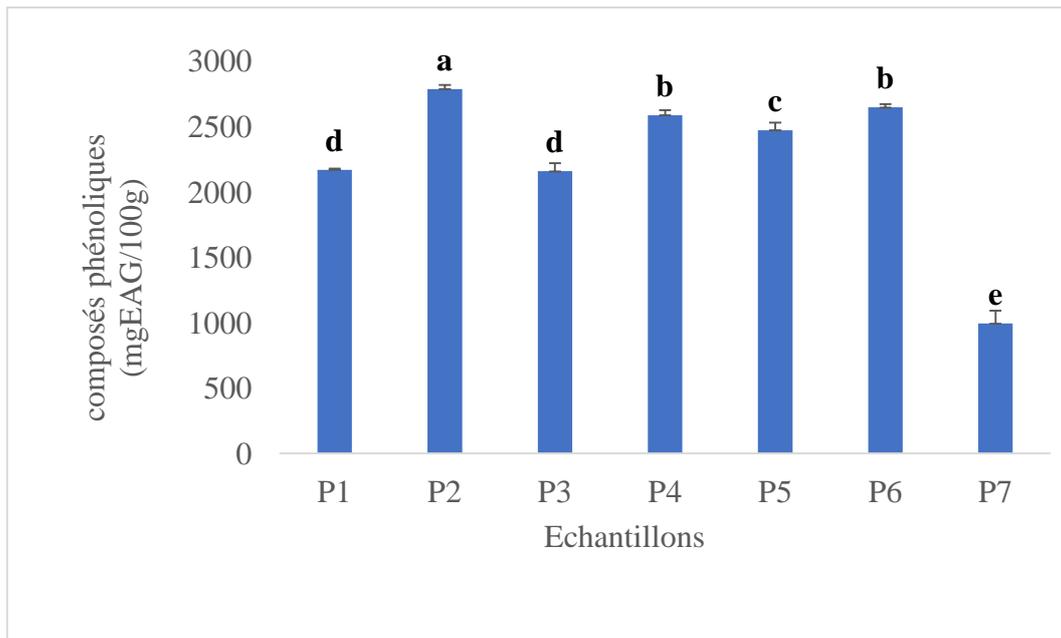


Figure 16 : Teneurs en polyphénols totaux des pollens analysés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype (n=3).les valeurs portant des lettres différentes présentant des différences significatives.

III.3.1.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus répandu des composés phénoliques et sont responsables du potentiel antioxydant de pollen.

La figure 17 illustre les teneurs en flavonoïdes des extraits de pollen. Le pollen de Blida (P2) présente la plus grande valeur ($698,22 \pm 56,62$ mg ECA/100g) ainsi que le pollen de Tizi Ouzou (P1) présente la plus faible valeur ($190,73 \pm 25,48$ mg ECA/100g). Les résultats obtenus sont dans la marge à celles obtenus par Feas *et al.*, (2012) qui varient entre (400,5 mg ECA/100g à 700,1 mg ECA/100g).

Selon l'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$, aucune différence n'est montrée entre les échantillons (P3, P4 et P6) ;(P1 et P7) mais P2 diffère significativement aux autres échantillons. Cette différence peut être expliquée par l'origine florale (chaque pollen possède ses propres flavonoïdes), conditions Climatiques.

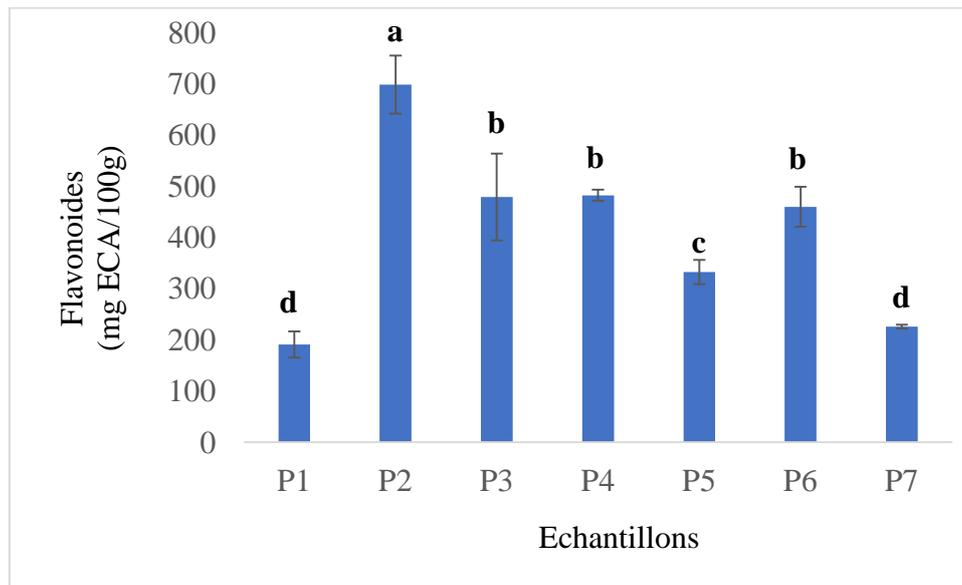


Figure 17 : Teneurs en flavonoïdes des pollens analysés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype (n=3). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

III.3.1.4. Proanthocyanidines

Le tableau IV montre les taux de proanthocyanidines extraits à partir des différents échantillons du pollen.

Les teneurs en proanthocyanidines sont comprises entre $405,69 \pm 22,48$ mg ECA/100g (P4) à $690,21 \pm 53,06$ mg ECA/100g (P2). Les résultats obtenus sont supérieurs à celles rapportés par Maksimovic *et al.*, (2005) qui varient de $74,8 \pm 10,0$ mg ECA/100g à $469,6 \pm 52,3$ mg ECA/100g. Nous pouvons déduire que nos échantillons possèdent un pouvoir antioxydant élevé.

Selon l'analyse statistique, aucune différence significative à $p < 0,05$ n'est montée entre les échantillons (P1, P3, P5 et P6) ; (P4 et P7) alors que P2 diffère significativement par rapport aux autres échantillons.

III.3.2. Activité antioxydantes

Tableau V : Résultats des activités antioxydantes des pollens étudiés.

Echantillon	DPPH (%)	ABTS (%)	FRAP (mg EAG/100g)	Pouvoir réducteur (mg EAG/100g)
P1	31,35±1,13 ^e	27,45±0,59 ^f	42,95±1,40 ^f	2882,74±31,03 ^f
P2	86,96±2,10 ^a	39,45±0,59 ^{cd}	203,67±4,25 ^a	7237,38±227,55 ^b
P3	30,48±1,18 ^e	38,74±1,29 ^d	78,79±0,27 ^d	4434,28±41,37 ^e
P4	76,03±0,43 ^b	46,50±0,35 ^b	147,17±1,87 ^c	5909,96±29,85 ^c
P5	36,35±4,59 ^d	32,39±1,76 ^e	74,09±1,43 ^d	5027,31±108,64 ^d
P6	72,71±0,78 ^b	52,62±0,13 ^a	182,54±4,46 ^b	8678,58±26,03 ^a
P7	48,28±3,14 ^c	41,33±2,23 ^c	56,25±2,11 ^e	4454,96±57,59 ^e

III.3.2.1. Activité antiradicalaire DPPH

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des molécules pures ou d'extraits végétaux.

Le pollen de Blida (P2) possède le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (86,96±2,10%) contrairement au pollen d'El Oued (P3) qui possède le pouvoir antiradicalaire le plus petit (30,48±1,18) (**figure 18**). Les résultats obtenus sont supérieurs à celles obtenus par Kroyer *et al.*, (2001) (53%), cela confirme que nos échantillons contiennent des teneurs élevés en polyphénols et flavonoïdes.

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ des échantillons du pollen montre que (P1 et P3) ; (P4 et P6) ne présentent pas une différence significative entre eux concernant la capacité de réduction du radical DPPH par contre les échantillons P2, P5, P7 présentent une différence significative. Cette différence peut être expliquée par la différence de l'origine botanique et la composition chimique.

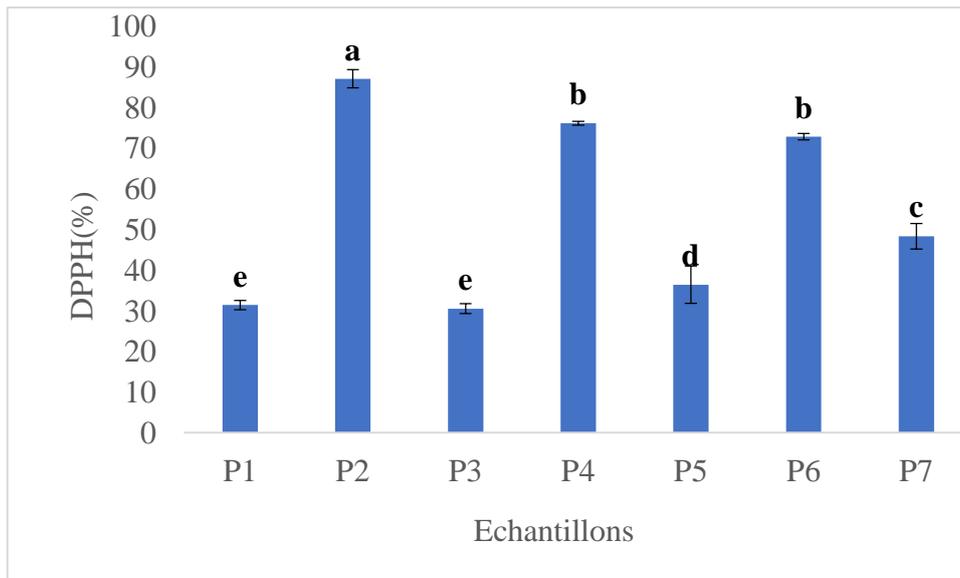


Figure 18 : Activité antiradical-DPPH des pollens analysés.

Chaque valeur présente la moyenne \pm écartype (n=3). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

III.3.2.2. Activité antiradical ABTS

Ce test repose sur la capacité des substances antioxydantes existantes naturellement dans le pollen à réduire le radical ABTS⁺.

L'activité antiradicalaire des échantillons de pollens varie entre $27,45 \pm 0,59$ % (P1) à $52,62 \pm 0,13$ % (P6) (**figure 19**). La valeur maximale d'ABTS rapporté par Zuluoga *et al.*, (2015) est de 43%, donc nos résultats sont dans la marge.

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ montre une différence significative entre tous les échantillons de pollen. Cela peut être expliqué par la différence de la nature et le taux des antioxydants présents dans chaque échantillon.

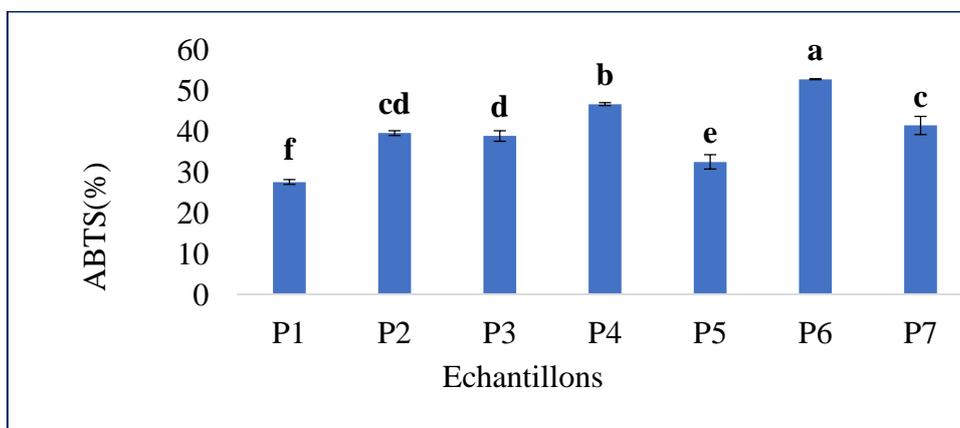


Figure 19 : Pouvoir antiradical de l'ABTS pour les échantillons des pollens analysés.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype (n=3). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

III.3.2.3. Test au FRAP

Le principe du test de FRAP consiste à la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique en fer ferreux ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$).

Le test de FRAP a montré que la capacité réductrice varie entre $42,95 \pm 1,40\%$ (P1) à $203,67 \pm 4,25\%$ (P2) (**figure 20**). Ces résultats sont proche de celle rapporté par Maksimovic *et al.*, (2005) qui varient entre $79,8 \pm 0,5$ mg EAG/100g à $160,8 \pm 0,5$ mg EAG/100g

L'analyse statistique de la variance à $p < 0,05$ montre que tous les échantillons de pollens analysés présentent une différence significative entre eux, donc la capacité réductrice des différents échantillons est différente. Cette différence peut être expliquée par la différence en composés phénoliques.

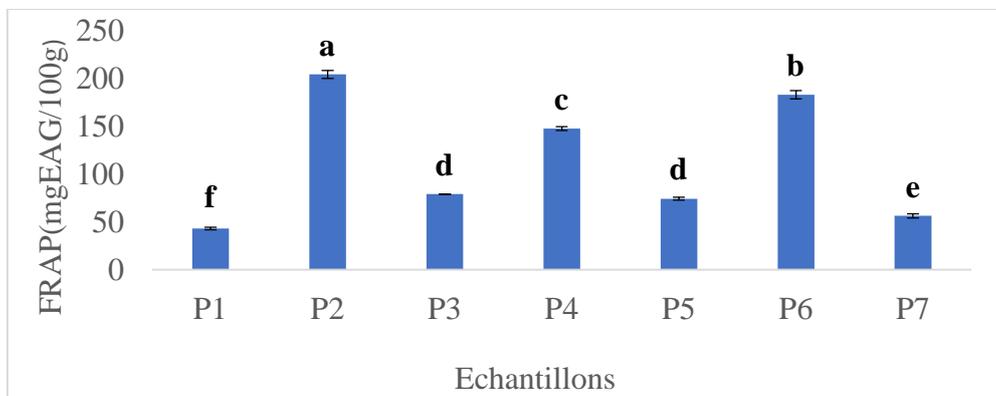


Figure 20 : Test au FRAP des pollens analysés

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype ($n=3$). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

III.3.2.4. Pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de l'extrait testé.

Les résultats du pouvoir réducteur présentés par les échantillons des pollens analysés varient de $8678,58 \pm 26,03$ mg EAG/100g (P6) à $2882,74 \pm 31,03$ mg EAG/100 g (P1) (**figure 21**).

Les échantillons (P3 et P7) ne présentent aucune différence significative à $p < 0,05$ par contre les autres échantillons (P1, P2, P4, P5, P6) présentent une différence significative. Ces différences peuvent être dues à l'origine botanique.

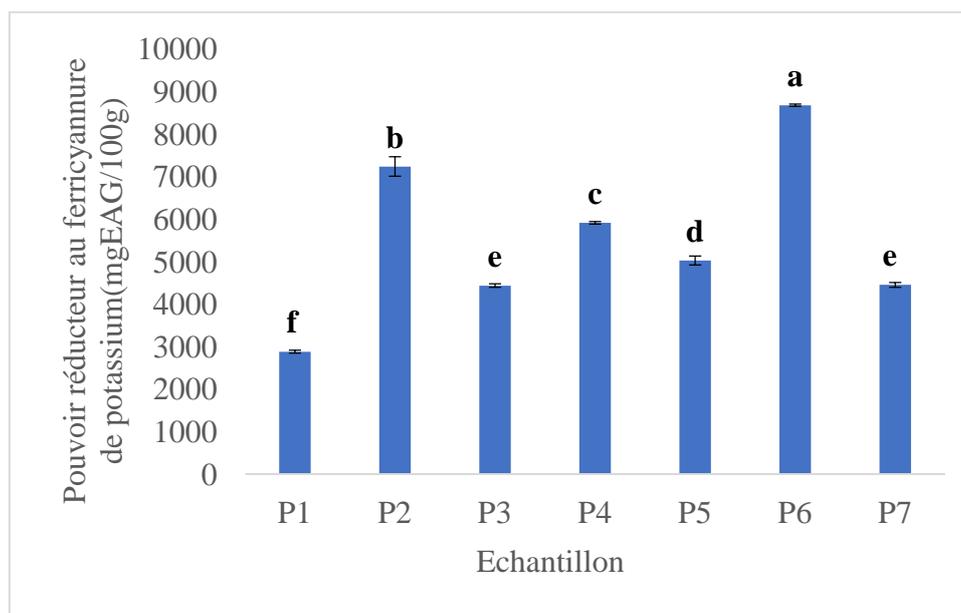


Figure 21 : Pouvoir réducteur des extraits des pollens analysés.

Chaque valeur présente la moyenne \pm l'écartype (n=3). Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives.

III.4. Corrélations antioxydants et activité antioxydante

L'analyse statistique de l'ensemble des résultats obtenus pour les différents échantillons des pollens analysés indique qu'il existe une corrélation significative ($p < 0,001$) entre les composés phénoliques totaux et le test de FRAP ($r=0,67$); une corrélation hautement significative entre les flavonoïdes et le test de FRAP et significative entre les flavonoïdes et DPPH et le pouvoir réducteur ($r=0,84$; $r=0,69$; $r=0,68$ respectivement); ainsi qu'une corrélation significative entre les caroténoïdes et le pouvoir réducteur ($r=0,73$).

Conclusion générale

Ce travail est consacré à l'étude de certaines propriétés physico-chimiques (brix, couleur et humidité), aux dosages des différents antioxydants, à l'évaluation des activités anti oxydantes de sept échantillons du pollen ainsi qu'à l'analyse pollinique.

Les analyses polliniques ont montré que cinq échantillons de pollen sont monofloraux et deux autres sont polyfloraux.

Le pollen est présenté comme un complément alimentaire sur le plan nutritionnel. De grandes variabilités concernant le contenu en antioxydants et les capacités antioxydantes au niveau des échantillons de pollen sont observées.

Les résultats obtenus pour les pollens analysés ont révélé des taux en humidité inférieurs à $55,33 \pm 46,20$ % ; le brix varie entre $5,73 \pm 0,15$ à $4,50 \pm 0$ %.

Les teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes et proanthocyanidines sont variables entre les échantillons. L'échantillon P2 de Blida possède de grandes valeurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines ($2785,44 \pm 31,23$ mg EAG/100 g ; $698,22 \pm 56,62$ mg ECA/100 g ; $690,21 \pm 53,06$ mg ECA/100 g respectivement).

L'étude de l'activité antioxydante par différentes méthodes a montré que la plus grande activité concernant le test de FRAP et l'activité antiradical DPPH est observée avec le pollen de Blida (P2) ($203,67 \pm 4,25$ mg ECA/100g ; $86,96 \pm 2,10$ % respectivement), et celle de l'ABTS et le pouvoir réducteur est observée avec P6 ($52,62 \pm 0,13$ % ; $8678,58 \pm 26,03$ mg ECA/100 g).

La matrice de corrélation a révélée une corrélation hautement significatives entre les flavonoïdes et le test de FRAP ($r=0,84$) ; une corrélation significative entre les caroténoïdes et le pouvoir réducteur au ferricyannure de potassium ($r=0,73$).

Globalement cette étude a montré que le pollen possède une bonne activité antioxydante donc très bénéfique pour la santé humaine.

L'ensemble des résultats trouvés ont permis de dégager les perspectives suivantes :

- Réaliser des essais in vivo afin de voir les effets du pollen dans le milieu biologique.
- Etudier d'autres activités biologiques et thérapeutiques du pollen.
- Etudier les divers formes du pollen afin d'identifier l'origine florale.

A

- **AL M.L., Daniel D., Moise A., Bobis O., Laslo L. et Bogdanov S. (2009).** Physico-chemical and bio,activepropreties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112 : 863-876.
- **Aldjadi A. M. et KamaruddinM.Y. (2004).**Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*; 85:513-518.
- **Aličić D.,Šubarić D.,Jašić M.,Pašalić H etAčkar D.(2014).**Antioxidant properties of pollen.*Hrana u zdravljuibolesti, znanstveno-stručniččasopiszanutricionizamidijetetiku*, 3 (1): 6-12.
- **Aline M. (2005).** Utilisation thérapeutique des produits de la ruche, étude phytochimique et activités biologiques des miels du Burkina Faso. Thèse de Doctorat en biochimie et chimie des substances naturelles. Université de Ouagadougua, Faculté des Sciences de la Vie et de la Terre ,p.34.
- **Almeida-Muradian L.B, Pamplona L.C, ColmbraS etBarthe OM. (2005).** Chemical composition and botanical evaluation of dried bee-pollen pellets. *Journal of FoodComposition Analysis*, 18: 105-111.
- **Almida M.L.B.,Lucia C.,Pamplona L.C.,CoimbraS et Barth M.O.(2005).** Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets.*journal of food compositionand analysis*,18(1):105-111.
- **Athamena S. (2008).**Etude quantitative des flavonoïdes des graines de CuminumCyminum et les feuilles de Rosmarinusofficinalis et l'évolution de l'activité biologique. Thèse de l'obtention du diplôme en Biologie. Université El-HadjeLakhder-Batna, Faculté de sciences,p.31-34.

B

- **Bathe P.K et Singh N. (1999).** A comparaison between Helianthus annus and Eucaluptuslanceolatus Honey. *Food Chemistry*, 67 :389-397.
- **Beaudeau J-L.,Delattre J.,Therond P.,Bonfont-Rousselot D.,Legrand A et PeyentJ.(2006).**Le stress oxydant composante physiologique de l'athérosclérose.Immuno-analyse biologie spécialisée,21:144-150.
- **BenachourK. (2008).**Diversité et activité pollinisaatrice des abeilles (Hymenoptera : Apoida) sur les plantes cultivées. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, P.19.
- **BenhamoumN. (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Biologie. Université AboubakarBellkaid Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, P.21-25.
- **Bernard V. (2005).** Abeilles et pollinisation. Abeilles, Pollinisation et Pesticides.

- **Berreta G., Grantata P., Ferrero M., Orioli M et Facino RM. (2005).** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 533 : 185-191.
- **Bertrand P. (2008).** Implication du stress oxydative dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia Faba. Thèse de Doctorat de l'université Toulouse. Université Toulouse, p.43.
- **Blanc M. (2010).** Propriétés et usage médicinal des produits de la ruche. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27p.
- **Bouguerene B.(2012).** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leur propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). thèse de Doctorat de Chimie-Biologie-santé. Université de Toulouse III Paul Sabatier, Ecole Doctorale des sciences de la Matière, Institut des Maladies Métabolique et cardiovasculaire, p.7-21.
- **Bradford M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principal of Protein -dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-252.

C

- **Campos M.G.R., Frigerio C., Lopes J et Bogdanov S.(2010).** What is The future of Bee pollen. *Journal of apiproduct and apimedical science*, 2(4):131-144.
- **Carpes S T., Beghini R., Mtias de alencar S et Lucia Massen M.(2007).** Study of preparation of bee pollen extract, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, 31:1816-1825.
- **Çelemligencey Ö., Barkan N.P., Özenler Ç., Özel Demiralp D et Sorkun K.(2017).** Protein Analysis of Anzer Bee Pollen by Bradford method. *Mellifera*, 17(1) : 21-32.
- **Cousin L. (2014).** L'abeille et le conseil à l'officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Poitiers, Faculté de Médecine et de Pharmacie, p.32.
- **Curtay J.P. et Robin J.M. (2002).** Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie.

D

- **Derbel S. et Gherida K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, 1 : 28-34.
- **Donadieu Y. (1983).** Le pollen : thérapeutique naturelle. Edition : Maloine S. A. Paris, p. 97.

F

- **Fang Y. Z., Yang S. et Wu G. (2002).** Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.
- **FeasX., Vazquez-Tato M.P., Estevimo L., Seija J.A et Iglcias A. (2012).** Organic Bee Pollen : Bioactive Compounds ,Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules*, 17: 8359-8377.
- **Fontaine E. (2007).** Radicaux libres et vieillissement. *Cah. Nutr. Diét.*, 2-42.

G

- **Gharbi M. (2001).** Les propriétés de la ruche : Origine -Fonctions naturelles- Composition -Propriétés thérapeutiques. Apithérapie et perspective d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de Doctorat en vétérinaire. Université de Claud Bernard - Lyon 1, Faculté de Médecine et de Pharmacie, p.55.
- **Gongo, M.Y.M. (2012).** Etude des propriétés anti radicalaires et antiproliférative d'extrait de feuilles et de rameaux de SALVADORA PERSICAL. (Salvadoraceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de OUAGADOUGOU, Faculté des Sciences de la santé, p.42.
- **Gulcin I., Alici H.A et Cesur M. (2005).** Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propolis. *Chem. Pharm. Bull*, 53(3): 281-285.
- **Gulcin I., Oktay M., Kerrecci E et Kufrevioglu O.I. (2003).** Screening of antioxidant and antibacterial activities of anise (*Pimpinellaanisum L*) seed extracts. *Food chemistry*, 83: 371-382.

H

- **Halliwell Bet Gutterdje C.M.J. (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *journal of biochem. Nutrition*, 219:1-4.
- **Hermes-Lima M. (2004).** Oxygen in Biology and biochemistry: Role of Free Radicals, In K.B. Story (Ed). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, p.319-368.
- **Hurd L. (2003).** Bee pollen: top rank antioxidant. *Total Health*, 24 :40-42. In les composés phénoliques des végétaux. Edition : Dunad 9. Paris, p. 1-27.

J

- **JarozN. (2003).** Etude de la dispersion atmosphérique du pollen du maïs : contribution à la maîtrise des risques de pollinisation croisée. *Biologie végétale*. INAPG (Agro Paris Tech), Français, P.19.
- **Jean L. (1985).** Recherche sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica L*). *Les annales de l'abeille*, INRA Edition, 1958, 1(3), p.113-118.

K

- **Kahkoen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T.S et Heinonen M. (1999).**Antioxydant activity of plant extracts containig phenolic compounds. *J. Agric. Food chemistry*, 47: 3954-3962.
- **Khalil MB, Moniruzzaman M, Boukraa L, Benkanifia M, Asiful I, Nazmul I, SitiAmrahS et Siew HG. (2012).** Physicochemical and antioxidant propertes of Algerian honey. *Molecules*.17, 11: 11199-11215.
- **Komosiska-Vassev K.,Olczyk P.,Kazmierczak J.,Mencer L et Olczyk k.(2015).**Bee pollen:chemical Composition and ThrrapurticApplication.*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,p.1-6
- **Kroyer G et Hegedus N.(2001).**Evolution of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplements.*Jglsvirer Innovation Food Science Emerging Technologies*,2 (3): 171-174.

L

- **Louis S. (2004).** Diversité structural et d'activité biologique des Albumines entomotoxique de type 1b des grains de Légumineuses. *Biochimie [q-bio-BM]*. INSA de Lyon, français,p.45-49.
- **Louveaux JL. (1985).** Recherche sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L). Les annales de l'abeille, INRA Edition, 1958,1(3) :113-118.
- **Louveaux J., Maurizio A., et Vorwohl G. (1978).**Methods of melisspalynology. *Bee World*,59 : 139-157.

M

- **Maksimovic Z., Malenic D. etKovacevic N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioressource Technology*,96 : 873-877.
- **Marie-France H. (1965).** Composition et propriétés du pollen : Revue de travaux récents. Les annales de l'abeille, INRA Editions, 8(4) : 299-307.
- **Messaid H. (2008).** Optimisation du processus d'immersion-réhydratation du système datte sèches-jus d'orange. Thèse de Magister en Biologie. Université M'hamedBouguera de Boumerdes, Faculté des Sciences de l'Ingénieur,p. 41-44.
- **Molyneux P. (2004).** The use of the free stable radical diphenylpicryl-hydrasyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songlakarin.J. Sci. Techno*, 26(2):211-219.
- **Morgano MA, Milani RF, Martins MCT et Rodriguez-Amaya DB. (2011).** Détermination of water content in Brazilian honey-bee collected pollen by Karl-Fischer titration.*Food Control*, p.1-5.

N

- **Nicolay J. (2014).** Perspectives d'avenir en apéothérapie à l'officine. Thèse pour le Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Faculté de Pharmacie, p. 23.

P

- **Pascoal A.,Rodrigeus S.,TeixiraA.,Feas X et Estevinho M L.(2014).**Biological activities of commercial bee pollen : Antimicrobial,Antimutagenic,Antioxidant and Anti-inflammatory.*Food and Chemical Toxicology*,63:233-239.
- **Percie du Sert P. (2003).** Les pollens qui nous soignent. Guy Trédaniel. Editeur 2^{ème} édition,p. 221.
- **Pietta PG. (2000).**Flavonoids as antioxidants.*J. Nat. Prod*, 63, 1035-1042.
- **Pourrut B. (2008).** Implication du stress oxydative dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, Vicia Faba. Thèse de Doctorat de l'université Toulouse. Université Toulouse ,p.43.
- **Prior R.L .,Wu X et Schaich K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in food and dietary supplements. *J. Agric. Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

R

- **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M et Rice -Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology et Medicine*, 26 : 1231-1237.

S

- **Sandrine L. (2004).** Diversité structural et d'activité biologique des Albumines entomotoxique de type 1b des grains de Légumineuses. *Biochimie [q-bio-BM]*. INSA de Lyon, français,p.45-49.
- **Sass-kiss A., Kiss J., Mitotay P., Kerek M.M etToth-Markus M. (2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research.Int*,38: 1023-1029.
- **Sousa A., Ferrreira I.C.F.R., Barros L., Bento A et Pereira J.A. (2008).**Effet of solvent and extraction temperature on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "akaparras". *LWT-Food. Science and Technology*, 41: 793-745.
- **Szczena T. (2007).** Concentration of selected elements in honey-bee collected pollen. *Journal of Apiculture Science*,51. N01.

Z

- **ZuluogaM C.,Serrata.C JetQuicazan.C M.(2015).**Bee-Pollen Structure Modification by physical and Biotechnological processing :Influence On the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds .*Chemical Enginerig Transactions*; 43: 79-83.

Annexe 01

Tableau I : Espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives d'azote(ERN).

NOM	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Peroxyde organique	$ROOH$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Ozone	O_3
Aldéhydes	$HCOR$
Oxygène singulet	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot-}$

Tableau II : Protocol de préparation des réactifs et solutions utilisés dans les analyses de pollen.

Solution /Réactif	Préparation
Réactif de Bradford pour 1000 ml	-bleu de Coumassie 250G (100mg) -Ethanol (50 ml) -Acide phosphorique (H_3PO_4) (100 ml)
La solution d'ABTS concentré (7mM)	-0,01801 g de l'ABTS + 0,00331 g de persulfate de potassium dans 5 ml d'eau distillé, agiter et laisser incuber pendant 16 h à l'obscurité. Cette solution est diluée jusqu'à atteindre une absorbance de 0,7 à 734 nm.
Solution de FRAP	(300 mM de tampon acétate de sodium, Ph=6,6) TPTZ (10 mM dans 40 Mm d'HCL) et 20 Mm de la solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6H_2O$) sont mélangés avec un rapport de 10/1 /1 (v / v / v).
Tampon phosphate (Ph=6,6)	Solution acide [2,4 g /100 ml d' H_2O de sodium d'hydrogène orthophosphate ($H_2NaO_4P, 2H_2O$)] +Solution base [(4 g /100 ml d' H_2O d'hydroxyde de sodium(NaOH).

Annexe 02 : courbes d'étalonnage

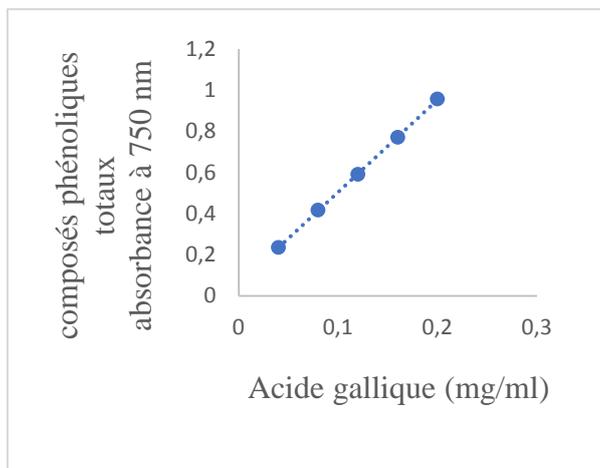


Figure 01 : Courbes d'étalonnage des composés phénoliques.

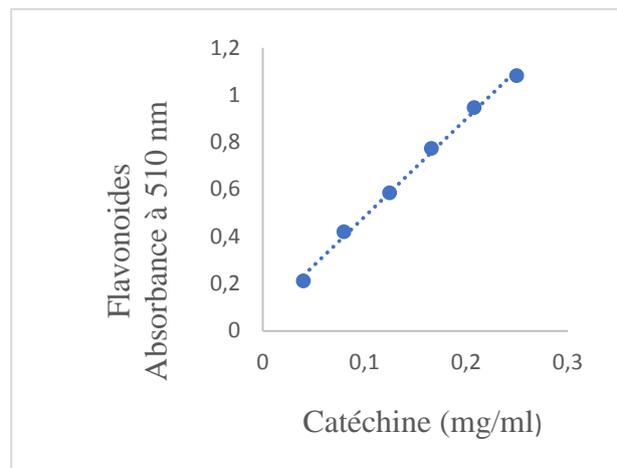


Figure 02 : Courbes d'étalonnage des flavonoïdes.

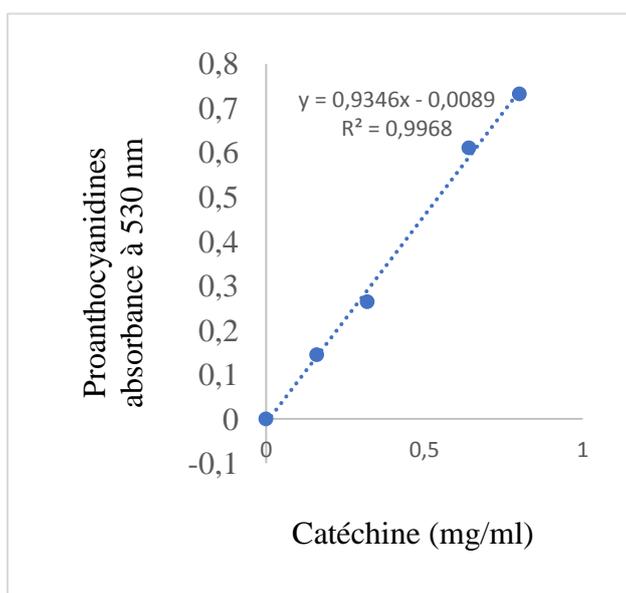


Figure 03 : Courbe d'étalonnage Proanthocyanidines.

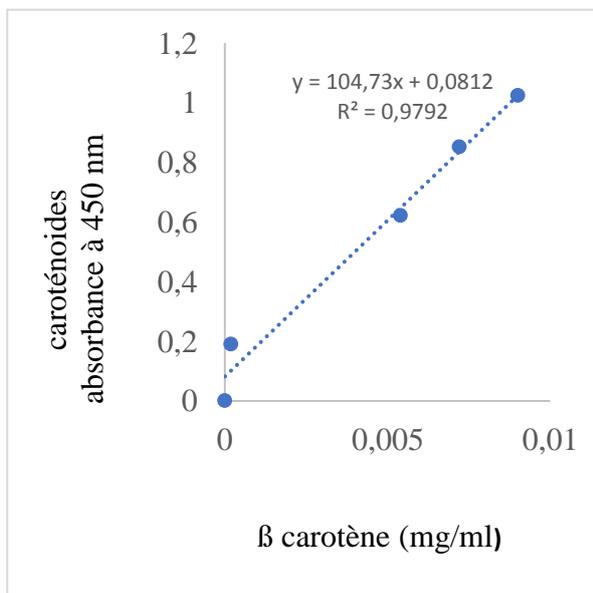


Figure 04 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes

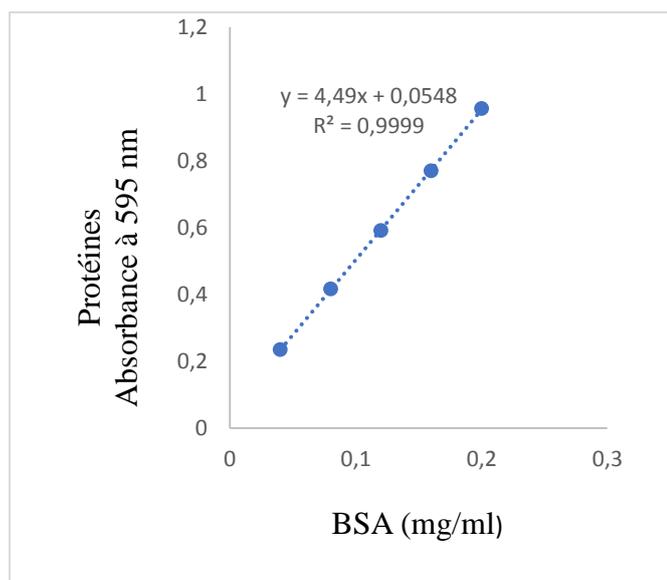


Figure 05 : Courbe d'étalonnage des protéines

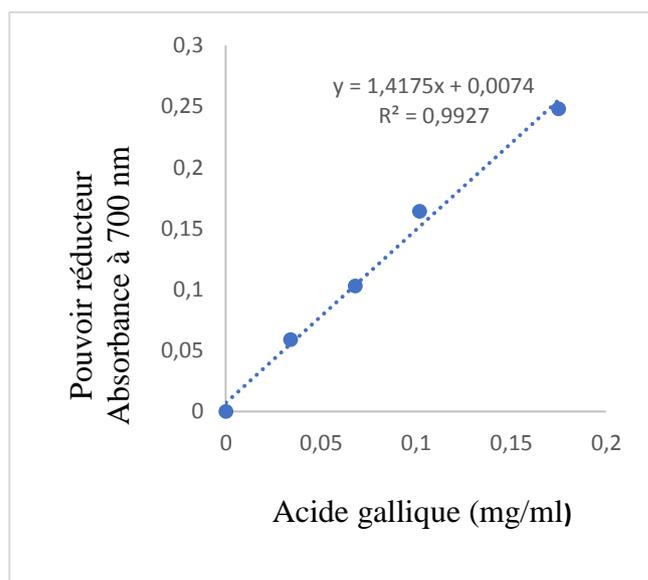


Figure 06 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur

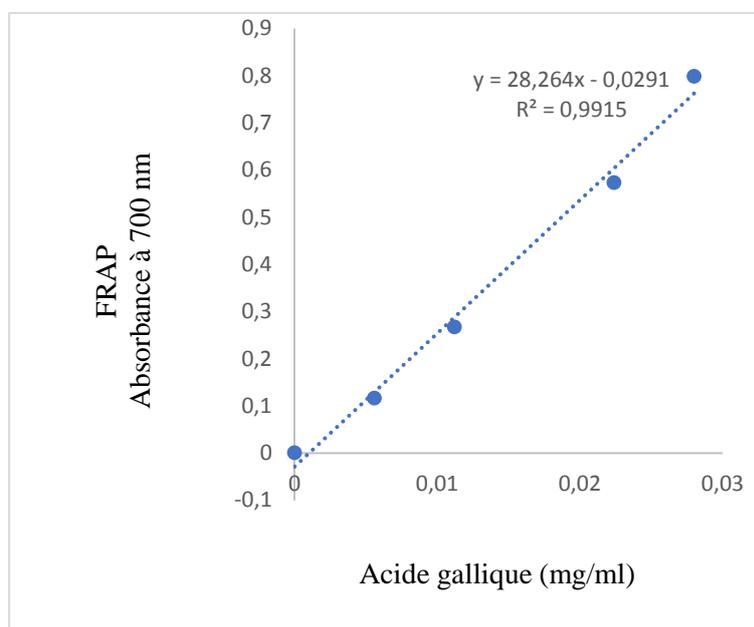


Figure 07 : Courbe d'étalonnage de test de FRAP.

Annexe 03 : Corrélations marquées à $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ des pollens analysés.

Correlations (Spreadsheet1)												
Marked correlations are significant at $p < .00100$												
N=21 (Casewise deletion of missing data)												
Variable	Brix (%)	humidité	couleur	protéines(mgEBSA/100g)	Flavonoides (mgEACA/100g)	carotennoïdes(mgEABC/100g)	Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	CPT(mgEAG/100g)	ABTS (%)	FRAP (mgEAG/100g)	PR (mgEAG/100g)	DPPH(%)
Brix (%)	1,000000	-0,005376	-0,334974	0,270730	-0,296045	0,237487	-0,166248	-0,591207	0,264274	0,007235	0,063514	0,288653
humidité	-0,005376	1,000000	-0,319021	-0,041714	-0,099940	-0,337649	-0,407241	0,030732	0,110853	-0,035310	-0,112284	0,059957
couleur	-0,334974	-0,319021	1,000000	0,295037	0,689614	0,753965	0,315666	0,246602	0,430200	0,472363	0,507352	0,220614
protéines(mgEBSA/100g)	0,270730	-0,041714	0,295037	1,000000	0,615191	0,693479	0,409523	0,497067	0,714059	0,915134	0,913684	0,883317
Flavonoides (mgEACA/100g)	-0,296045	-0,099940	0,689614	0,615191	1,000000	0,542401	0,458772	0,644673	0,430234	0,843819	0,683415	0,697168
carotennoïdes(mgEABC/100g)	0,237487	-0,337649	0,753965	0,693479	0,542401	1,000000	0,408590	0,126253	0,652163	0,638892	0,734448	0,495617
Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	-0,166248	-0,407241	0,315666	0,409523	0,458772	0,408590	1,000000	0,524239	-0,186560	0,465346	0,337065	0,309336
CPT(mgEAG/100g)	-0,591207	0,030732	0,246602	0,497067	0,644673	0,126253	0,524239	1,000000	0,152681	0,674978	0,542526	0,459007
ABTS (%)	0,264274	0,110853	0,430200	0,714059	0,430234	0,652163	-0,186560	0,152681	1,000000	0,670671	0,796616	0,664853
FRAP (mgEAG/100g)	0,007235	-0,035310	0,472363	0,915134	0,843819	0,638892	0,465346	0,674978	0,670671	1,000000	0,916224	0,921533
PR (mgEAG/100g)	0,063514	-0,112284	0,507352	0,913684	0,683415	0,734448	0,337065	0,542526	0,796616	0,916224	1,000000	0,811880
DPPH(%)	0,288653	0,059957	0,220614	0,883317	0,697168	0,495617	0,309336	0,459007	0,664853	0,921533	0,811880	1,000000

Correlations (Spreadsheet1)												
Marked correlations are significant at $p < .01000$												
N=21 (Casewise deletion of missing data)												
Variable	Brix (%)	humidité	couleur	protéines(mgEBSA/100g)	Flavonoides (mgEACA/100g)	carotennoïdes(mgEABC/100g)	Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	CPT(mgEAG/100g)	ABTS (%)	FRAP (mgEAG/100g)	PR (mgEAG/100g)	DPPH(%)
Brix (%)	1,000000	-0,005376	-0,334974	0,270730	-0,296045	0,237487	-0,166248	-0,591207	0,264274	0,007235	0,063514	0,288653
humidité	-0,005376	1,000000	-0,319021	-0,041714	-0,099940	-0,337649	-0,407241	0,030732	0,110853	-0,035310	-0,112284	0,059957
couleur	-0,334974	-0,319021	1,000000	0,295037	0,689614	0,753965	0,315666	0,246602	0,430200	0,472363	0,507352	0,220614
protéines(mgEBSA/100g)	0,270730	-0,041714	0,295037	1,000000	0,615191	0,693479	0,409523	0,497067	0,714059	0,915134	0,913684	0,883317
Flavonoides (mgEACA/100g)	-0,296045	-0,099940	0,689614	0,615191	1,000000	0,542401	0,458772	0,644673	0,430234	0,843819	0,683415	0,697168
carotennoïdes(mgEABC/100g)	0,237487	-0,337649	0,753965	0,693479	0,542401	1,000000	0,408590	0,126253	0,652163	0,638892	0,734448	0,495617
Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	-0,166248	-0,407241	0,315666	0,409523	0,458772	0,408590	1,000000	0,524239	-0,186560	0,465346	0,337065	0,309336
CPT(mgEAG/100g)	-0,591207	0,030732	0,246602	0,497067	0,644673	0,126253	0,524239	1,000000	0,152681	0,674978	0,542526	0,459007
ABTS (%)	0,264274	0,110853	0,430200	0,714059	0,430234	0,652163	-0,186560	0,152681	1,000000	0,670671	0,796616	0,664853
FRAP (mgEAG/100g)	0,007235	-0,035310	0,472363	0,915134	0,843819	0,638892	0,465346	0,674978	0,670671	1,000000	0,916224	0,921533
PR (mgEAG/100g)	0,063514	-0,112284	0,507352	0,913684	0,683415	0,734448	0,337065	0,542526	0,796616	0,916224	1,000000	0,811880
DPPH(%)	0,288653	0,059957	0,220614	0,883317	0,697168	0,495617	0,309336	0,459007	0,664853	0,921533	0,811880	1,000000

Correlations (Spreadsheet1)												
Marked correlations are significant at $p < .05000$												
N=21 (Casewise deletion of missing data)												
Variable	Brix (%)	humidité	couleur	protéines(mgEBSA/100g)	Flavonoides (mgEACA/100g)	carotennoïdes(mgEABC/100g)	Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	CPT(mgEAG/100g)	ABTS (%)	FRAP (mgEAG/100g)	PR (mgEAG/100g)	DPPH(%)
Brix (%)	1,000000	-0,005376	-0,334974	0,270730	-0,296045	0,237487	-0,166248	-0,591207	0,264274	0,007235	0,063514	0,288653
humidité	-0,005376	1,000000	-0,319021	-0,041714	-0,099940	-0,337649	-0,407241	0,030732	0,110853	-0,035310	-0,112284	0,059957
couleur	-0,334974	-0,319021	1,000000	0,295037	0,689614	0,753965	0,315666	0,246602	0,430200	0,472363	0,507352	0,220614
protéines(mgEBSA/100g)	0,270730	-0,041714	0,295037	1,000000	0,615191	0,693479	0,409523	0,497067	0,714059	0,915134	0,913684	0,883317
Flavonoides (mgEACA/100g)	-0,296045	-0,099940	0,689614	0,615191	1,000000	0,542401	0,458772	0,644673	0,430234	0,843819	0,683415	0,697168
carotennoïdes(mgEABC/100g)	0,237487	-0,337649	0,753965	0,693479	0,542401	1,000000	0,408590	0,126253	0,652163	0,638892	0,734448	0,495617
Proanthocyanidine (mgEACA/100g)	-0,166248	-0,407241	0,315666	0,409523	0,458772	0,408590	1,000000	0,524239	-0,186560	0,465346	0,337065	0,309336
CPT(mgEAG/100g)	-0,591207	0,030732	0,246602	0,497067	0,644673	0,126253	0,524239	1,000000	0,152681	0,674978	0,542526	0,459007
ABTS (%)	0,264274	0,110853	0,430200	0,714059	0,430234	0,652163	-0,186560	0,152681	1,000000	0,670671	0,796616	0,664853
FRAP (mgEAG/100g)	0,007235	-0,035310	0,472363	0,915134	0,843819	0,638892	0,465346	0,674978	0,670671	1,000000	0,916224	0,921533
PR (mgEAG/100g)	0,063514	-0,112284	0,507352	0,913684	0,683415	0,734448	0,337065	0,542526	0,796616	0,916224	1,000000	0,811880
DPPH(%)	0,288653	0,059957	0,220614	0,883317	0,697168	0,495617	0,309336	0,459007	0,664853	0,921533	0,811880	1,000000

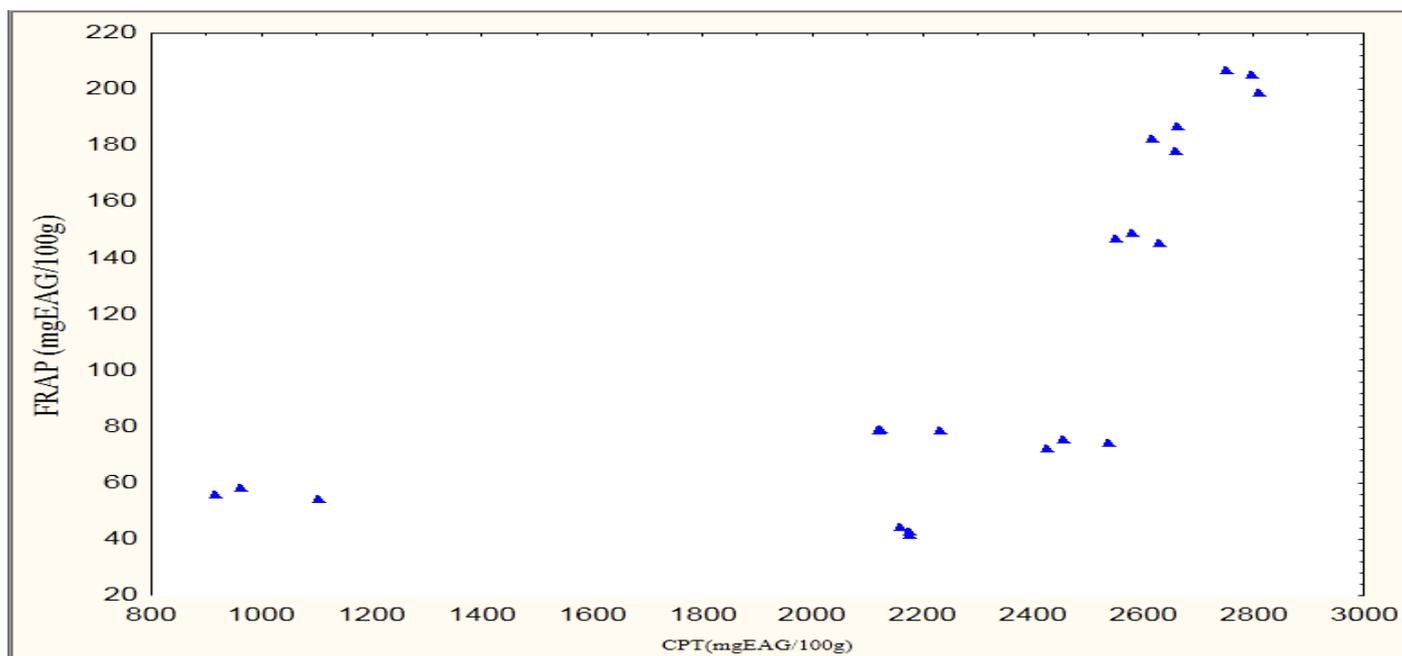
Annexe 04 : Corrélations marquées à $p < 0,001$ des pollens analysés.

Figure 01 : Corrélation entre les composés phénoliques totaux et le test de FRAP ($p < 0,001$) ($r = 0,674978$).

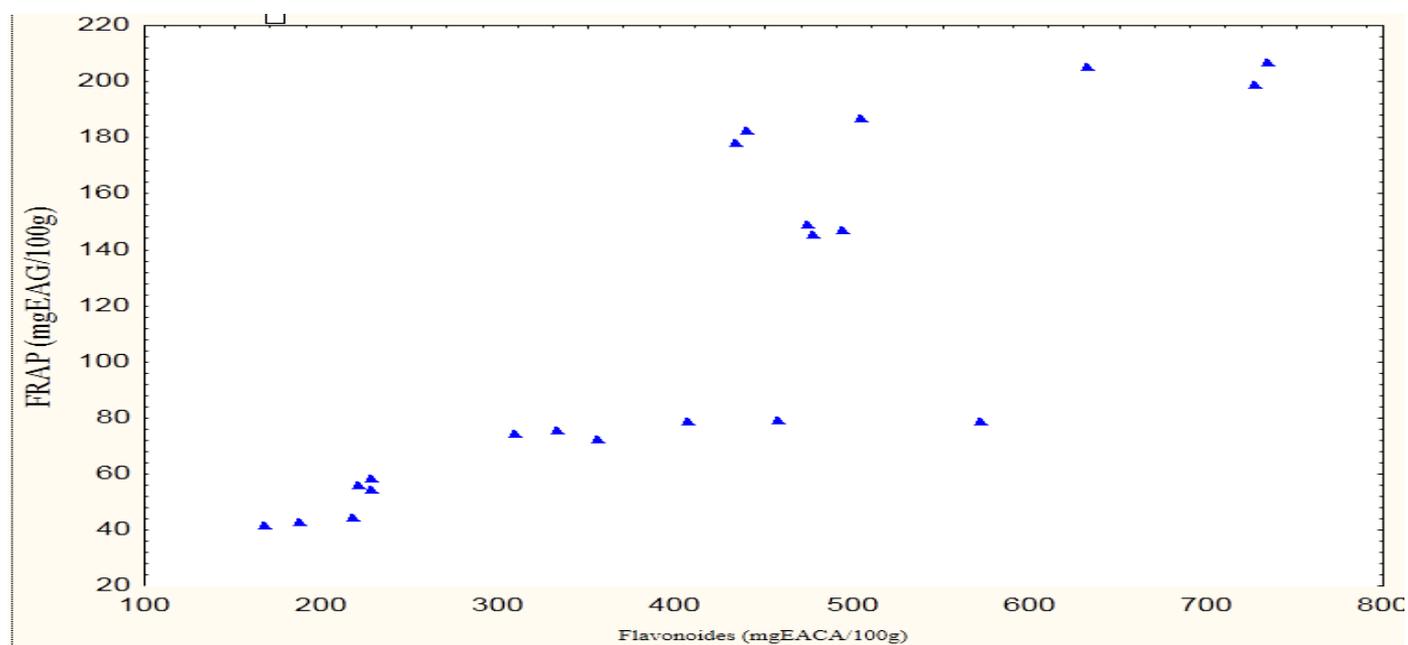


Figure 02 : Corrélation entre les flavonoïdes et le test de FRAP ($p < 0,001$) ($r = 0,843819$).

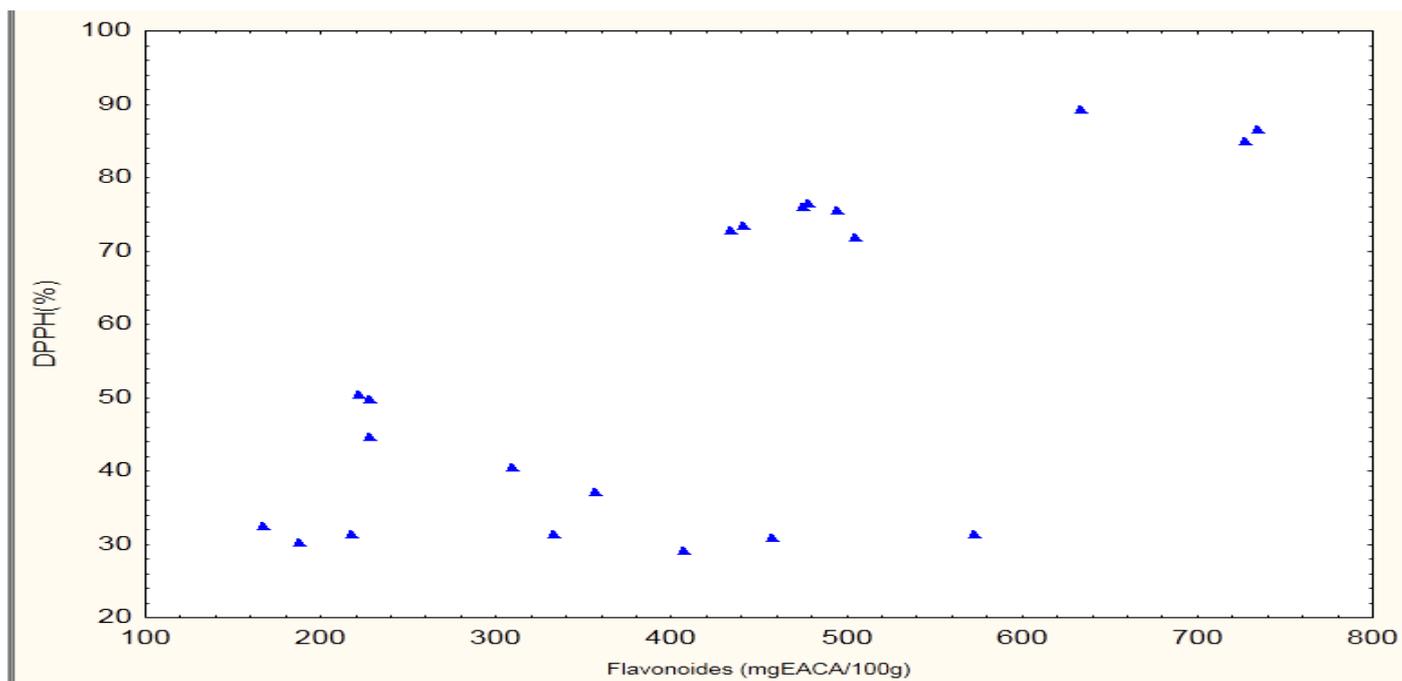


Figure 03 : Corrélation entre les flavonoïdes et l'activité antiradical DPPH ($p < 0,001$) ($r = 0,697168$).

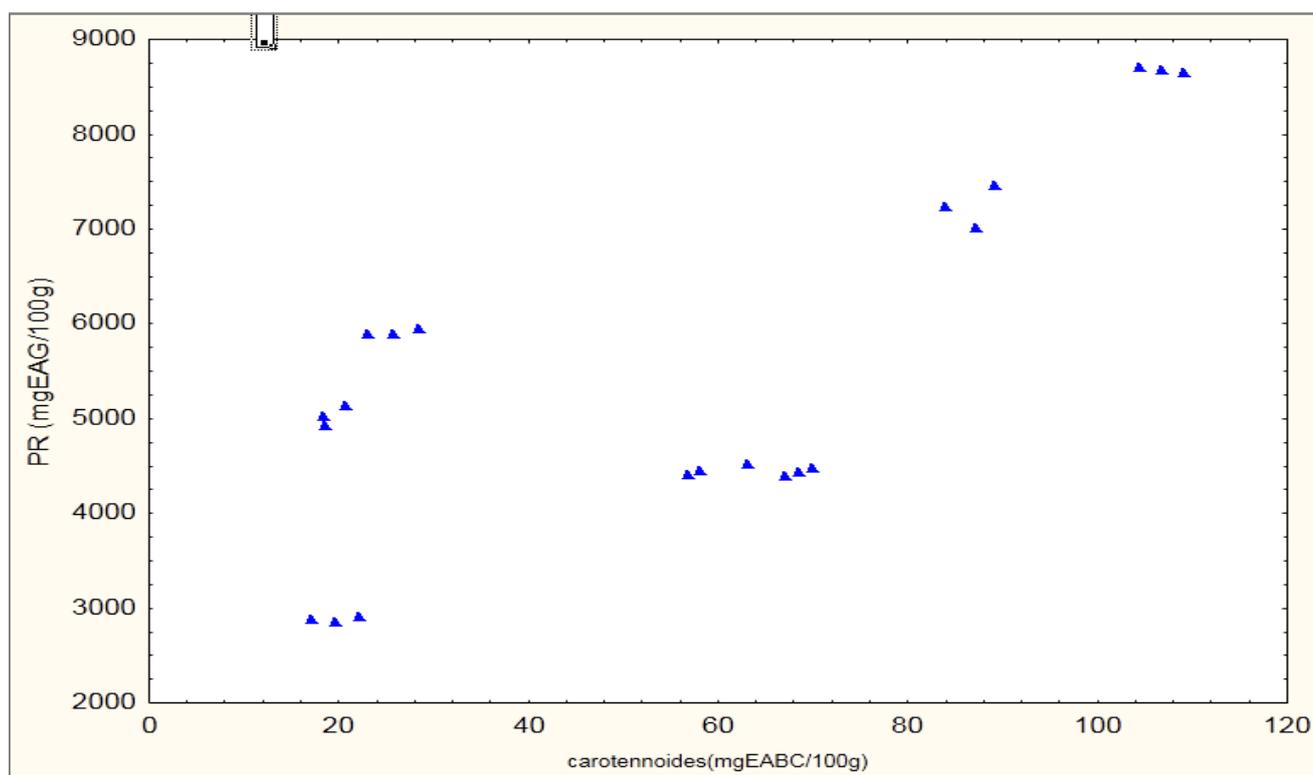


Figure 04 : Corrélation entre les caroténoïdes et le pouvoir réducteur au ferricyanure de potassium ($p < 0,001$) ($r = 0,734448$).

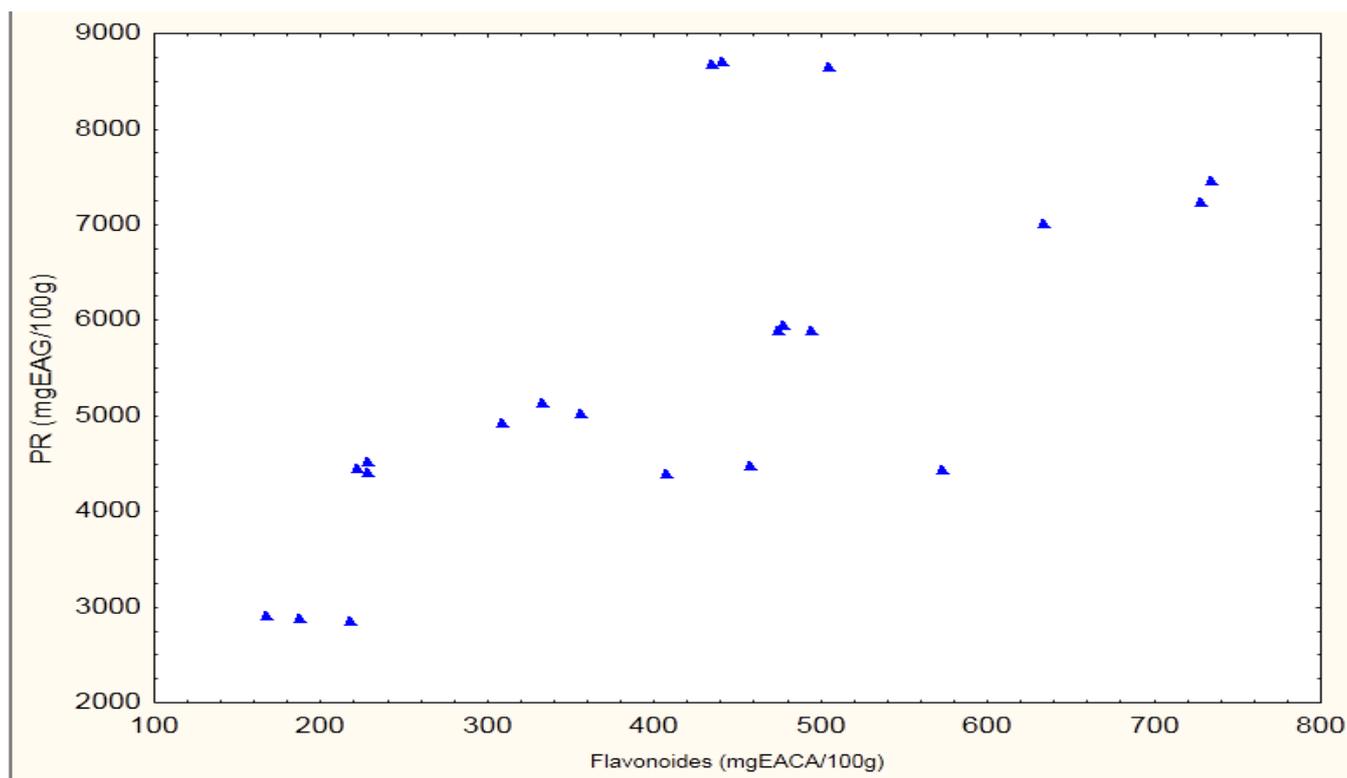
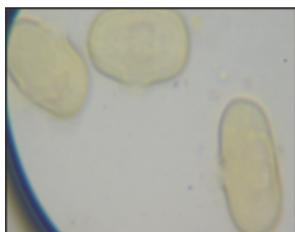
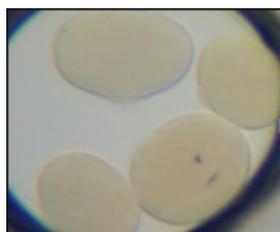


Figure 05 : Corrélation entre les flavonoïdes et le pouvoir réducteur au ferricyannure de potassium ($p < 0,001$) (0,683415).

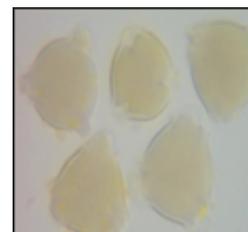
Annexe 05 : Photographie de quelques pollens



Apiaceae



Fabaceae



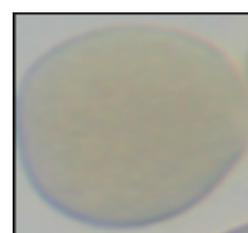
Myrtaceae



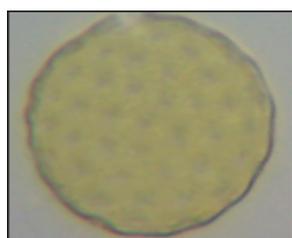
Ericaceae



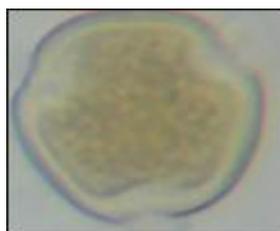
Rhamnaceae



Echium



Chénopodiaceae



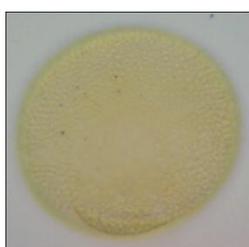
Teliaceae



Asteraceae



Brassicaceae



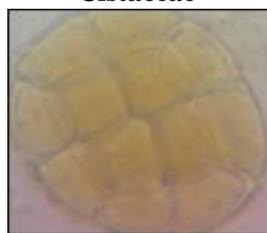
Cistaceae



Rosaceae



Borogonaceae



Mymosaceae



Lamiaceae

Résumé

Le pollen d'abeille a une valeur nutritive grâce à ces composés biochimiques qui lui confère des propriétés thérapeutiques contre différentes maladies (prostate, athérosclérose, amélioration des problèmes cardiovasculaires, système immunitaire et le ralentissement du vieillissement...etc.). Le but de notre travail est de déterminer les composants chimiques ainsi que l'activité antioxydante de sept échantillons de pollen commercialisés collectés à partir de sept wilayas. La teneur en polyphénols a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique, la concentration de ces derniers varie entre 992,57 à 2785,44 mg EAG/100g, tandis que la concentration des flavonoïdes varie entre 190,73 à 698,22 mg /100g. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests suivants : DPPH, ABTS et le test de FRAP, les résultats obtenus varient entre (30,48 à 76,03 %, 27,45 à 52,62%, 74,09 à 203,67 mg EAG/100g) respectivement. L'analyse pollinique des différents échantillons a montré que (P1, P2, P3, P4, P5) sont monofloraux alors que P6 et P7 sont polyfloraux. L'analyse statistique de nos échantillons a montré une positive corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux qui varie selon l'origine botanique des pollens. Les résultats obtenus indiquent que le pollen est une source importante des polyphénols qui sont connus avec leur pouvoir antioxydant.

Mots clé : pollen d'abeille, composés chimiques, activité antioxydante, origine botanique.

Abstract

Bee pollen is considered as the functional food due to its complex biochemical properties and effects in different disease (prostate problems, arteriosclerosis, improving cardiovascular, body immunity and delaying aging ...etc). The aim of this work was to determine chemical composition and antioxidant activity of seven samples of commercial bee pollen collected from different geographic origins in Algeria. Total phenol content was determined by colorimetric assay and their amount varied between 992,57 to 2785,44 mg GAE/100g. Determination of flavonoid was done by Aluminum Chloride method and total flavonoid in bee pollen ranged from 190,73 to 698,22 mg CAE/100g. The antioxidant capacity of pollen extract was assessed through the scavenging effect on DPPH, ABTS and ferrous reducing antioxidant property (FRAP) methods. and its varied between (30,48 to 76,03 %, 27,45 to 52,62%, 74,09 to 203,67 mg GAE/100g) respectively. The origin plants were determined in family according to microscopical analyses showed that all our samples are monofloral except P6 and P7. Statistical analysis demonstrated positive correlations between antioxidant activity and total phenolic compounds which depend in floral origin. The results obtained indicate that bee pollen is an important source of phenols showing antioxidant properties that could be beneficial to human health.

Keywords: bee pollen, antioxidant activity, phenols, floral origin, chemical composition.

ملخص

تعتبر حبوب الطلع من أهم المكملات الغذائية بفضل مركباتها البيوكيميائية التي تعطيها خصائص علاجية ضد الأمراض المختلفة (البروستاتا، تصلب الشرايين، تحسين مشاكل القلب والأوعية الدموية جهاز المناعة وتأخير الشيخوخة... الخ). يكمن هدفنا في تحديد المكونات الكيميائية وخصائصها المضادة للأكسدة من خلال تجارب أقيمت على سبع عينات لحبوب الطلع التي تم شرائها من سبع ولايات مختلفة من الجزائر. تم تحديد محتوى البولي فينول باستخدام طريقة اللونية، وتركيزها تتراوح بين 992,57-2785,44 ملغ EAG / 100G، في حين تركيز مركبات الفلافونويد 190,73-698,22 ملغ / 100G. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام الاختبارات التالية DPPH، ABTS واختبار FRAP، وتراوحت النتائج من (30,48-76,03%، 27,45-52,62%، 74,09-203,67 ملغ EAG / 100G). (G التحليل النباتي لمختلف العينات P1، P2، P3، P4، P5 هي وحيدة الأزهار بينما P6 و P7 متعددة الأزهار وأظهر التحليل الإحصائي للعينات وجود علاقة إيجابية بين النشاط المضاد للأكسدة والمحتوى الكلي للمادة البولي فينول الذي يختلف وفقا للأصل النباتي. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن حبوب الطلع تعتبر مصدراً مهماً لمادة البولي فينول المعروفة بقوتها المضادة للأكسدة

الكلمات المفتاحية: حبوب الطلع، مركبات كيميائية، نشاط مضاد للأكسدة، أصل نباتي.