

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Physico-Chimique

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Fondamentale



Réf.....

Mémoire de fin de cycle
En vue d'obtention du diplôme de
Master

Thème

Optimisation d'extraction des composés phénoliques du
pollen d'abeille par la méthodologie des surfaces de réponse
et activités biologiques

Présenté par

M^{elle} Hamlaoui Hayat et M^{elle} Hammoui Hanane

Soutenu le 12/09/2022

Membres de jury composé de	Grade	
Mr Zaidi Hicham	MCB	Promoteur
Mr Otmani Amar	MAB	Co-Promoteur
Mme Sebaihi-Harzoun Salima	MCB	Président
Mme Bensalem-Bournine Sihem	MCA	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements

A notre promoteur M. Zaidi. H et Co-promoteur M. Otmani. A pour leurs suivi, patience et leurs conseils qui ont été pour nous une source d'encouragement et à leurs disponibilité qui ont contribué efficacement à l'aboutissement de ce mémoire.

Tout d'abord nous tenons à remercier et à présenter nos sincères salutations à l'ensemble du jury. Notamment à sa présidente Mme Sebaihi-Harzoun. S et à l'examinatrice Mme Bensalem-Bournine. S pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant d'évaluer notre travail.

Nous tenons aussi à transmettre notre gratitude la plus sincère aux enseignants, aux ingénieurs des laboratoires ainsi qu'à tout le personnel de notre département sans qui ce travail n'aura jamais vu le jour.

A toutes ces personnes qui nous ont aidés et appris, soutenu, et encouragés, nous avons canalisé en nous votre savoir et votre foi pour aboutir au résultat ci présent.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

À mon père disparu trop tôt, qui m'a toujours encouragé et soutenu. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa fille qui a toujours pensée à lui. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

À ma maman qui m'a soutenu et encouragé et supporter mes humeurs durant ces années d'études.

À ma sœur qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Elle m'a chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

À ma binôme mon amie avant tout, pour son soutiens et sa présence.

À mes meilleures amies

À celle qui a toujours su trouver les bons mots pour m'encourager et me calmer.

À celle par sa folie a toujours était à mes côtés quel que soit les obstacles de la vie.

À mes amis avec qui j'ai partagé pleins de bons moments.

À tous ceux par qui leurs mots, leurs conseils, leurs encouragements ont fait que les choses avancent.

À tous ceux que j'aime.

Hamlaoui Hayat

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé, de me soutenir

Et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mon cher frère, sa femme et mon adorable neveu,

Pour leurs soutiens tout au long de mes études.

A ma chère amie avant d'être binôme,

Pour son entente et sa sympathie.

A mon cher,

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes meilleurs amis,

Pour leurs soutiens moraux.

A mes autres amis,

Pour leurs bonnes humeurs.

A toutes les personnes qui me sont proches du cœur

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Hammoui Hanane

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

AG : Acide gallique

AN : Acétonitrile

BBD : *Box-Behnken*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

CPT : Composés phénoliques totaux

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

HCl : Chlorure d'hydrogène

KH₂PO₄ : Dihydrogénophosphate de potassium

MDA : Malonyldialdéhyde

MSR : Méthode des surfaces de réponse

Na₂HPO₄ : Phosphate disodique

NaCl : Chlorure de sodium

Rpm : Rotations par minute

TBA : Acide thiobarbiturique

TBARS : *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*

TCA : Acide Trichloracétique

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Schéma d'une coupe transversal d'un grain de pollen	4
2	Photographie de l'échantillon de pollen	11
3	Protocole d'extraction des composés phénoliques	14
4	Photographies des grains de pollens identifiés dans l'échantillon	21
5	Teneurs en CPT des extraits des différents solvants	23
6	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différents solvants	23
7	Teneurs en CPT des extraits des différentes concentrations d'acétonitrile	25
8	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes concentrations d'acétonitrile	25
9	Teneurs en CPT des extraits des différents ratios	26
10	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différents ratios	27
11	Teneurs en CPT des extraits des différentes températures	28
12	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes températures	28
13	Teneurs en CPT des extraits des différentes durées d'extraction	29
14	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes durées d'extraction	30
15	Surfaces des réponses montrant les effets des variables d'extraction sur les composés phénoliques totaux (A, C, E) et l'activité antioxydante DPPH (B, D, F)	34
16	Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait final du pollen et la vitamine C	36
17	Pourcentages d'inhibition d'hémolyse par l'extrait final du pollen et de l'aspirine	37

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Classification des différentes familles de composés phénoliques	8
II	Tableau représentant différents types de composés phénoliques du pollen d'abeille	9
III	Différentes expériences réalisées selon la méthode séquentielle	15
IV	Spectre pollinique et pourcentages des familles de pollens identifiés dans l'échantillon	20
V	Résultats des paramètres physico-chimiques de l'échantillon de pollen	21
VI	Plan d'expériences Box-Behnken des variables indépendantes et leurs réponses expérimentales et prévues	31
VII	ANOVA des modèles et défauts d'ajustement pour les composés phénoliques et l'activité antioxydante	32
VIII	Valeurs prévues et expérimentales des composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante DPPH selon les paramètres d'extraction optimisés	35

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique</i>	
<i>I.1. Généralités sur le pollen</i>	
I. Synthèse bibliographique.....	03
I.1. Généralités sur le pollen.....	03
I.1.1. Définition du pollen.....	03
I.1.2. Caractéristiques microscopiques du pollen.....	03
I.1.3. Récolte du pollen	04
I.1.4. Composition chimique du pollen	04
I.1.5. Propriétés biologiques du pollen	06
I.1.6. Allergies au pollen.....	06
<i>I.2. Composés phénoliques du pollen</i>	
I.2. Composés phénoliques du pollen.....	07
I.2.1. Définition des composés phénoliques	07
I.2.2. Différents types de composés phénoliques du pollen	07
I.2.3. Extraction des composés phénoliques	09
<i>Chapitre II : Matériel et méthodes</i>	
II. Matériel et méthodes.....	11
II.1. Echantillon de pollen.....	11
II.2. Analyse pollinique.....	11
II.3. Analyses physico-chimiques du pollen.....	12
II.3.1. Degré de Brix.....	12

II.3.2. Intensité de couleur.....	12
II.3.3. Dosage des protéines.....	12
II.4. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques.....	13
II.4.1. Méthode séquentielle.....	13
II.4.1.1. Extraction des composés phénoliques.....	14
II.4.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux.....	15
II.4.1.3. Activité anti radicalaire DPPH.....	16
II.4.2. Méthodes des surfaces de réponse (MSR).....	16
II.5. Activités biologiques.....	17
II.5.1.1. Peroxydation lipidique.....	17
II.5.1.2. Activité anti-hémolytique	18
II.6. Analyses statistiques.....	19

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Résultats de l'analyse pollinique.....	20
III.2. Résultats des analyses physico-chimiques.....	21
III.2.1. Taux de Brix	21
III.2.2. Intensité de couleur	21
III.2.2. Teneur en protéines	22
III.3. Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques...22	
III.3.1. Méthode séquentielle.....	22
III.3.1.1. Effet de la nature de solvant	22
III.3.1.2. Effet de la concentration du solvant	24
III.3.1.3. Effet du ratio échantillon / solvant	25

III.3.1.4. Effet de la température d'extraction	27
III.3.1.5. Effet du Temps d'extraction.....,,.....	29
III.3.2. Méthodes des surfaces de réponse (MSR).....	30
III.4. Résultats des activités biologiques.....	35
III.4.1. Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique.....	35
III.4.2. Activité anti-hémolytique.....	36
Conclusion	38
Références bibliographiques	39
Annexes	

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, l'Homme a utilisé divers produits de la ruche, à savoir le miel, la propolis, le venin d'abeille, la gelée royale, la cire et le pollen et cela en raison des bienfaits qu'ils apportent au corps humain. Toutefois, l'usage de ces produits apicoles diffère au fil des années, ils passent d'aliment simple de tous les jours à des produits naturels utilisés pour leurs vertus thérapeutiques (**LeBlanc et al., 2009**).

En outre le pollen est utilisé par l'abeille afin d'assurer la pollinisation qui est essentielle à la biodiversité, puisqu'elle maintient le bon déroulement de la survie des plantes (**Thibault, 2017**). Elle fabrique les produits de la ruche dont le pollen d'abeille communément appelé "pain d'abeille". Le pollen d'abeille n'est pas seulement un aliment pour les abeilles et l'Homme mais aussi un produit qui possède maintes propriétés biologiques (antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses,...) (**Thibault, 2017**). Plusieurs études ont rapportées les vertus du pollen d'abeille tel que la prévention des problèmes de prostate, la stimulation de l'appétit, sa capacité à réduire la fatigue et la dépression et également son pouvoir à rajeunir la peau et de la fortifier (**Thibault, 2017**).

Le pollen d'abeille contient plusieurs types de composés phénoliques qui forment l'un des groupes les plus importants des métabolites secondaires produits par les plantes vasculaires et ils sont issus principalement des deux voies de synthèse shikimate et acétate. Les composés phénoliques sont caractérisés par une structure qui porte un noyau benzénique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles qui peuvent être glycosylés, acylés ou méthylés (**Lugasi et al., 2003 ; Macheix et al., 2005 ; Da saliva et al., 2016**).

Pour s'intéresser de plus près aux différentes extractions de ces composés phénoliques à partir de matière organique (fruits et légumes, produits de la ruche...), des techniques modernes d'extraction et d'isolement ont été utilisées comme des techniques alternatives pour réduire considérablement la consommation de solvant et accélérer le processus d'extraction. Pour notre étude on s'est intéressé à l'extraction par solvant organique en l'optimisant par deux méthodes : la méthode séquentielle et la méthode des surfaces de réponse (MSR) (**Garcia-Salas et al., 2010**).

L'objectif de notre étude consiste en l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques totaux (CPT) et de l'activité antioxydante du pollen d'abeille en utilisant la méthode séquentielle et la méthode des surfaces de réponse (MSR), cela à l'aide des dosages des composés phénoliques totaux et l'activité anti-radicalaire (DPPH). Après l'optimisation, des activités biologiques sont évaluées pour l'extrait final.

Notre travail est subdivisé en deux grandes parties : la première est une étude bibliographique qui comprend deux chapitres, dans le premier nous avons commencé par l'origine du pollen, ses caractéristiques microscopiques, sa récolte, sa composition chimique, ses propriétés biologiques et ses allergies. Quant au deuxième chapitre, il représente une étude bibliographique des composés phénoliques du pollen, leur classification, et leur extraction.

La deuxième partie comporte l'étude expérimentale qui est présentée en deux chapitres :

- Le premier a groupé le matériel et les méthodes utilisés dans l'extraction des composés phénoliques du pollen.
- Le deuxième présente les résultats et leurs discussions.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur le pollen

I.1.1. Définition du pollen

Le pollen est un élément mâle des plantes à fleurs et il se présente sous forme de grains microscopiques contenus dans les anthères des étamines (**LeBlanc et al., 2009**). Ces grains permettent à ces plantes de se reproduire grâce à une série de dépôts sur diverses fleurs (**LeBlanc et al., 2009**). Les abeilles récoltent le pollen sur les étamines et forment des pelotes qui sont nécessaires à la survie de la ruche (**LeBlanc et al., 2009**). Les pelotes de pollen connu également chez les apiculteurs sous le nom de "pain d'abeille", vont servir à nourrir la colonie d'abeilles, notamment les larves (**LeBlanc et al., 2009**).

I.1.2. Caractéristiques microscopiques du pollen

Un grain de pollen est spécifique d'un groupe végétal, parfois même de l'espèce, ce qui fait que ses caractéristiques varient, pour cela elles sont décrites comme suit :

I.1.2.1. Taille

La taille du grain de pollen est variable. Le diamètre diffère en fonction de l'origine botanique et de la région géographique (**Thibault, 2017**).

I.1.2.2. Forme

Le pollen a plusieurs formes dû à la diversité de l'exine (membrane externe du grain de pollen). Parmi elles, on trouve les formes sphériques ou ovoïdes plus ou moins déformées (**Thibault, 2017**).

I.1.2.3. Structure

La structure du grain de pollen est formée d'une aperture, d'un noyau de la cellule reproductrice, d'un cytoplasme de la cellule végétative et du noyau de cette dernière. La double paroi du grain de pollen contient généralement :

a) Exine

L'exine est une protection pour le grain de pollen, contient les glycoprotéines responsables des réactions allergiques et elles empêchent la dégradation de ce dernier en le protégeant des dommages et d'autres écrasements (**Prieu, 2015**). C'est grâce à cette couche que les abeilles arrivent à former la pelote en favorisant l'adhésion du pollen au corps des abeilles

et c'est en digérant la cire à sa surface qu'elles fabriquent le pain d'abeille et la gelée royale (Priou, 2015).

b) Intine

L'intine est plus sensible que l'exine, elle a plusieurs propriétés polliniques et dotée de matières grasses gélifiées et colorées contenant une très forte quantité de caroténoïdes, arômes, polyphénols, flavonoïdes, vitamines et antioxydants liposolubles (Priou, 2015). Elle est d'origine pecto-cellulosique, elle englobe la cellule végétale qui emmagasine les réserves nécessaires pour la croissance du tube pollinique (Priou, 2015).

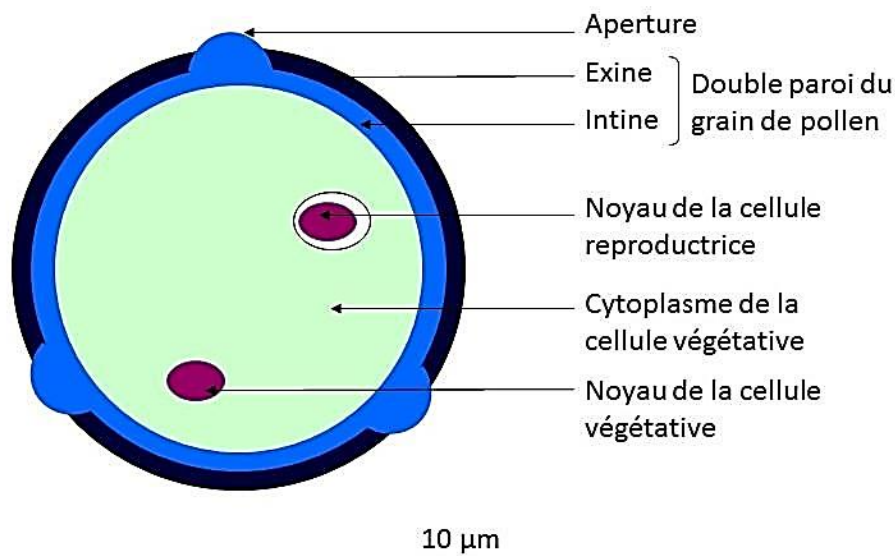


Figure 1 : Schéma d'une coupe transversal d'un grain de pollen (Priou, 2015).

I.1.3. Récolte du pollen

Les abeilles récoltent le pollen dès le réveil de la ruche au printemps et le choix du pollen varie selon la région (Louveaux, 1958). Les abeilles récupèrent le pollen en se collant aux anthères pendantes des fleurs et ainsi le pollen se fixe aux poils des pattes du corps de l'abeille qui sont favorables à la retenue du pollen sec et poudreux (Louveaux, 1958). Le pollen se présente généralement sous forme d'une fine poussière plus au moins jaunâtre (Louveaux, 1958).

I.1.4. Composition chimique du pollen

La composition chimique du pollen change en fonction de son origine botanique donc les pourcentages donnés peuvent varier d'une région à l'autre (Thakur et Nanda, 2020).

I.1.4.1. Eau

La teneur en eau est variable de 3 à 10 %. Le pollen frais contient une teneur en eau plus élevée que celle du pollen séché tout dépend des conditions de conservation (**Campos et al., 2008**).

I.1.4.2. Lipides

Il existe peu d'études sur les lipides du pollen. La composition en graisses du pollen présente des différences considérables selon l'origine botanique. On y trouve principalement des graisses polaires et neutres ainsi que des petites quantités d'acides gras et peuvent varier de 1 à 13 %. Les lipides sont des constituants importants du pollen d'abeille (**Thakur et Nanda, 2020**).

I.1.4.3. Glucides

Les glucides sont l'un des composants principaux du pollen avec un taux de de 13 à 55 %. Ils sont principalement des polysaccharides (**Thakur et Nanda, 2020**).

I.1.4.4. Protéines

Les protéines sont les composants les plus importants du pollen après les glucides. Ils répondent aux besoins nutritionnels des abeilles. Elles varient fortement dans le pollen collecté à partir de diverses sources végétales et le taux d'acides aminés dans le pollen est important. Le taux des protéines est de 10 à 40 % qui sont indispensables au fonctionnement de l'organisme humain (**Thakur et Nanda, 2020**).

I.1.4.5. Vitamines

Le pollen est un aliment riche qui contient différentes vitamines qui varient entre 7 à 10 %. Elles peuvent être trouvées sous leur forme originale dans la nature ou exister en tant que précurseurs ou pro-vitamines. Le pollen d'abeille contient généralement une plus grande quantité de vitamines hydrosolubles et de caroténoïdes (**Campos et al., 2008**).

I.1.4.6. Composés Phénoliques

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs. Les valeurs présentes dans le pollen varient de 0,50 à 213 mg EAG/g et ont un effet antioxydant. Le niveau des composés phénoliques varie en fonction des conditions climatiques et de l'origine géographique de la récolte du pollen (**Thakur et Nanda, 2020**).

I.1.4.7. Autres composés

Autres oligoéléments comme les minéraux qui sont présents sous forme de traces (**Campos et al., 2008**).

I.1.5. Propriétés biologiques du pollen

Le pollen d'abeilles est très riche en antioxydants qui jouent un rôle important dans la prévention contre le cancer, la protection contre le vieillissement prématuré des cellules et le renforcement du système immunitaire. En plus de ces propriétés antioxydantes, les flavonoïdes et les caroténoïdes confèrent au pollen, une activité anti-inflammatoire notable. Ces effets anti-inflammatoires ont été confirmés lors des tests cliniques dans le cas d'hypertrophie bénigne de la prostate. Il posséderait également des propriétés antibactériennes le rendant intéressant pour lutter contre les infections ou les prévenir. Son efficacité aurait entre autre été prouvée contre les bactéries *Salmonella* responsables de la salmonelle et *Staphylococcus aureus* responsables d'empoisonnements alimentaires et de multiples infections de la peau. Il aiderait également à lutter contre la constipation et les problèmes du transit (**Thibault, 2017**).

Le pollen d'abeille contribue au bon fonctionnement du rythme cardiaque et protège les cellules contre le stress oxydatif et cela par le biais des composés bioactifs et des vitamines qu'il contient. En plus, c'est un aliment hypercalorique et hyperprotéiné qui est capable de lutter contre l'obésité et de réduire par conséquence le risque des maladies cardiovasculaires. Il a également un effet antidépresseur en partie grâce à sa teneur en tryptophane qui est le précurseur de la production de la sérotonine. Cette dernière joue un rôle important dans la régulation de l'anxiété, de l'appétit, du sommeil et de l'humeur en générale (**Thibault, 2017**).

I.1.6. Allergies au pollen

Le pollen d'abeille est un pollen dit entomophile. Contrairement au pollen anémophile, qui est transporté d'une plante à une autre par le vent, l'entomophile est transporté par les insectes butineurs. Il n'est pas allergisant ou alors dans des cas très rares. Une étude menée par **Jarlot-Chevaux et al. (2022)** a rapporté que les rares réactions allergiques au pollen d'abeille peuvent s'expliquer par la réactivité croisée entre des épitopes communs des pollens entomophiles et anémophiles ou par la contamination du pollen d'abeille par le pollen anémophile.

Afin de réduire le risque d'allergie, la consommation d'un pollen d'abeille mono- ou bi-floral est la plus recommandée, car les pollens allergisants sont le plus souvent absents. De plus, la consommation d'un pollen récolté lors du pic de pollinisation diminue le risque de contamination par des pollens allergisants (**Jarlot-Chevaux et al., 2022**).

I.2. Composés phénoliques du pollen

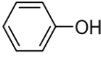
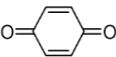
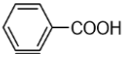
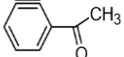
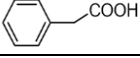
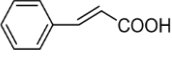
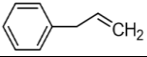
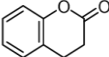

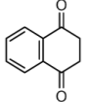
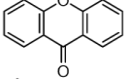
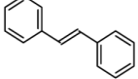
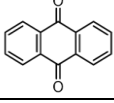
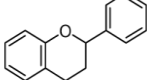
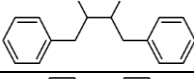
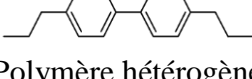
I.2.1. Définition des composés phénoliques

Les composés phénoliques ou métabolites secondaires des végétaux ont une grande diversité structurale dans la nature. Ils peuvent se complexer aux sucres pour donner des formes glycosylées ou à des dérivées fonctionnelles telles que des esters ou des esters méthyliques. Ils jouent un rôle dans la qualité organoleptique et nutritive des fruits en termes de couleur, de goût, d'arôme et de saveur et aussi dans les goûts astringents et amer. Ces polyphénols bioactifs ont une action de retarder ou d'inhiber l'auto-oxydation des lipides en agissant comme des piègeurs de radicaux libres donc c'est des antioxydants qui protègent la propagation de la chaîne oxydative et c'est ce qui fait qu'ils sont des facteurs de protection de la santé (**Garcia-Salas et al., 2010**).

Les polyphénols se présentent dans l'alimentation sous forme d'acides phénoliques et de flavonoïdes. La première forme se trouve sous différents types dans les plantes et ils présentent une aptitude variable pour différentes conditions d'extraction et varient dans leur sensibilité à la dégradation. Par contre la deuxième forme est un hétérocycle oxygéné. Les flavonoïdes se trouvent généralement sous la forme glycosylée (**Garcia-Salas et al., 2010**).

Dans la nature, différents types de composés phénoliques sont présents, et ils peuvent être classés selon la complexité et les liaisons possibles du squelette de base avec d'autres molécules.

Tableau I : Classification des différentes familles de composés phénoliques (Garcia-Salas et al., 2010).

Nombre de carbone	Classe	Structure de base
C ₆	Phénols simples	
	Benzoquinones	
C ₆ -C ₁	Acides benzoïques	
C ₆ -C ₂	Acétophénonnes	
C ₆ -C ₃	Acide phénylacétique	
	Acide cinnamique	
	Phénylpropène	
	Coumarines	
	Chromones	
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénes	
	Anthraquinones	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignans, neolignans	
(C ₆ -C ₁) _n	Tanins hydrosolubles	 Polymère hétérogène

I.2.2. Différents types de composés phénoliques du pollen

Dans le pollen d'abeille on trouve différents types de composés phénoliques spécifiquement ceux présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Tableau représentant différents types de composés phénoliques du pollen d'abeille (Anjos *et al.*, 2019).

Probable compound
coumaroyl quinic acid
myricetin- <i>O</i> -rutinoside
luteolin- <i>O</i> -dihexoside
quercetin- <i>O</i> -dihexoside
myricetin- <i>O</i> -hexoside
myricetin- <i>O</i> -(malonyl)rutinoside
isorhamnetin- <i>O</i> -dihexoside
quercetin- <i>O</i> -hexosyl-pentoside
quercetin- <i>O</i> -rutinoside isomer 1
myricetin- <i>O</i> -(malonyl)hexoside
quercetin- <i>O</i> -rutinoside isomer 2
luteolin-di- <i>O</i> -hexosyl-rhamoside
quercetin- <i>O</i> -(malonyl)rutinoside
isorhamnetin- <i>O</i> -rutinoside
hydroxybenzoyl myricetin
quercetin- <i>O</i> -(malonyl)hexoside
quercetin derivative
quercetin- <i>O</i> -rhamnoside
isorhamnetin- <i>O</i> -(malonyl)hexoside isomer 1
luteolin- <i>O</i> -(malonyl)hexoside
myricetin
isorhamnetin- <i>O</i> -(malonyl)hexoside isomer 2
myricetin- <i>O</i> -dihydroferuloyl protocatechuic acid
myricetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl protocatechuic acid-isomer 1
myricetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl protocatechuic acid isomer 2
quercetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl protocatechuic acid isomer 1
myricetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl hydrobenzoic acid isomer 2
quercetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl hydrobenzoic acid isomer 1
quercetin- <i>O</i> -acetyl hydroxybenzoyl hydrobenzoic acid isomer 2
<i>O</i> -dihydroxybenzoyl acetyl malonyl coumaric acid flavonoid derivative

I.2.3. Extraction des composés phénoliques

Les prétraitements des échantillons sont importants dans l'étape de l'extraction. Ça consiste à une séparation ou distribution d'un composé phénolique (**Garcia-Salas et al., 2010**). La procédure d'extraction est séquentielle et réalisée à l'aide d'un solvant organique aqueux (**Garcia-Salas et al., 2010**). Il y a plusieurs méthodes d'extraction et différents solvants qui sont utilisés comme l'éthanol, l'acétone, méthanol ou un mélange entre solvant organique et eau (**Garcia-Salas et al., 2010**).

Le but ultime de la préparation des échantillons est d'éliminer ou de réduire les interférences potentielles de la matrice (**Garcia-Salas et al., 2010**). L'extraction doit être réalisée avec le solvant approprié et dans les meilleures conditions prédéterminées de température et de pH (**Garcia-Salas et al., 2010**). De plus, il est essentiel de prendre en compte la structure polyphénolique car ces composés peuvent avoir de multiples groupements hydroxyles pouvant être conjugués à des sucres, des acides ou des groupements alkyles (**Garcia-Salas et al., 2010**). Ainsi, les polarités des composés phénoliques varient considérablement et il est difficile de développer une méthode unique pour une extraction optimale de tous les composés phénoliques (**Garcia-Salas et al., 2010**). En outre, l'optimisation de la procédure d'extraction est essentielle pour un dosage précis des composés phénoliques de différentes matrices alimentaires (**Garcia-Salas et al., 2010**).

L'étape d'extraction est extrêmement importante, car son résultat déterminera la libération de composés phénoliques de la matrice de l'échantillon dans le milieu, ce qui permettra à son tour la détermination quantitative de l'extrait (**Garcia-Salas et al., 2010**).

Matériel
et
méthodes

II. Matériel et méthodes

A l'instar des études effectuées sur le pollen auparavant, notre étude consiste en l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques totaux (CPT) et de l'activité antioxydante du pollen d'abeille en utilisant la méthode des surfaces de réponse (MSR). Pour avoir un intervalle pour les expériences réalisées avec la (MSR), des extractions basées sur la méthode séquentielle ont été effectuées et cela à l'aide des dosages des composés phénoliques totaux et l'activité de piégeage du radical libre DPPH. Après l'optimisation, des activités biologiques ont été évaluées pour l'extrait final.

II.1. Echantillon de pollen

L'étude a été faite sur un échantillon de pollen d'abeille, récolté en 2022 depuis la région de Toudja à la wilaya de Bejaïa. L'échantillon a été conservé à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le pollen a été pesé et ensuite broyé à l'aide d'un mortier avant d'être mélangé avec le solvant.



Figure 2 : Photographie de l'échantillon de pollen

II.2. Analyse pollinique

L'analyse pollinique est une méthode qui sert à différencier et identifier les grains de pollen constituant les pelotes du pollen d'abeille et ainsi leur origine botanique à l'aide d'observation des échantillons sous microscope optique.

L'analyse pollinique a été réalisée selon la méthode de **Louveaux et al. (1978)**. Une quantité de 1g de pollen a été dissoute dans 50 ml d'eau distillée et le mélange a été homogénéisé sur une plaque agitatrice jusqu'à dissolution totale (environ 20 min). Un volume de 60 μ l de la solution a été déposé sur une lame et séché puis recouvert avec une lamelle, les bords ont été scellés avec du verni à angle. La lecture de la lame a été faite avec un microscope optique au grossissement (x40) en se référant à une banque de données numériques de **CETAM (Centre d'Études Techniques Apicoles de Moselle, France)**.

II.3. Analyses physico-chimiques

II.3.1. Degré de Brix

Le degré de Brix est la mesure du pourcentage en poids de tous les solides solubles dans les solutions qui ne sont généralement pas du saccharose pur. Ce taux est mesuré à l'aide d'un réfractomètre.

Une quantité de 1 g de broyat de pollen a été dissoute dans 10 ml d'eau distillée. Après homogénéisation et filtration avec un papier Whatman N°4, une goutte de la solution a été étalée en couche mince sur la platine du prisme d'un réfractomètre Abbe. La lecture de brix a été faite à travers l'oculaire du réfractomètre suite à une ligne verticale qui coupe une échelle graduée en pourcentage de brix.

II.3.2. Intensité de couleur

L'intensité de couleur de l'échantillon du pollen a été déterminée par la méthode de **Bath et Singh (1999)**. Une quantité de 0,014 g de pollen a été dissoute dans 2 ml d'éthanol, Après homogénéisation et filtration avec du papier filtre, la densité optique du filtrat a été mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm.

II.3.3. Dosage des protéines

La solution du pollen a été préparée par la dissolution de 0,5 g de pollen dans 70 ml d'éthanol. Après homogénéisation pendant 2 h sur une plaque agitatrice, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman N°4.

La teneur en protéines du pollen a été déterminée par la méthode de Bradford. Cette méthode colorimétrique consiste en changement de couleur du colorant «bleu de coomassie G250» de la couleur verte en milieu acide en bleu par sa fixation aux groupements NH_3^+ des protéines.

Le protocole consiste à mettre dans chaque tube un volume de 100 μl de filtrat et ajouter ensuite 5 ml de réactif de Bradford. Après incubation du mélange pendant 2 min, l'absorbance a été lue avec un spectrophotomètre à 595 nm (**Azeredo et al., 2003**). Le résultat de la teneur en protéine a été exprimé en mg équivalent d'albumine de sérum bovin (BSA) par g de pollen en se référant à la courbe d'étalonnage de la BSA ($y = 0,25x - 0,22$; $R^2=0,989$) annexe 2.

II.4. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

II.4.1. Méthode séquentielle

La méthode séquentielle repose sur la variation d'un seul facteur, tandis que les autres facteurs demeurent constants dans chaque expérimentation indépendante. Cette méthode permet de trier les conditions d'extraction appropriées, comme la nature et la concentration du solvant, le ratio échantillon/solvant, la température et le temps d'extraction.

II.4.1.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques a été effectuée selon le protocole décrit dans la figure 3.

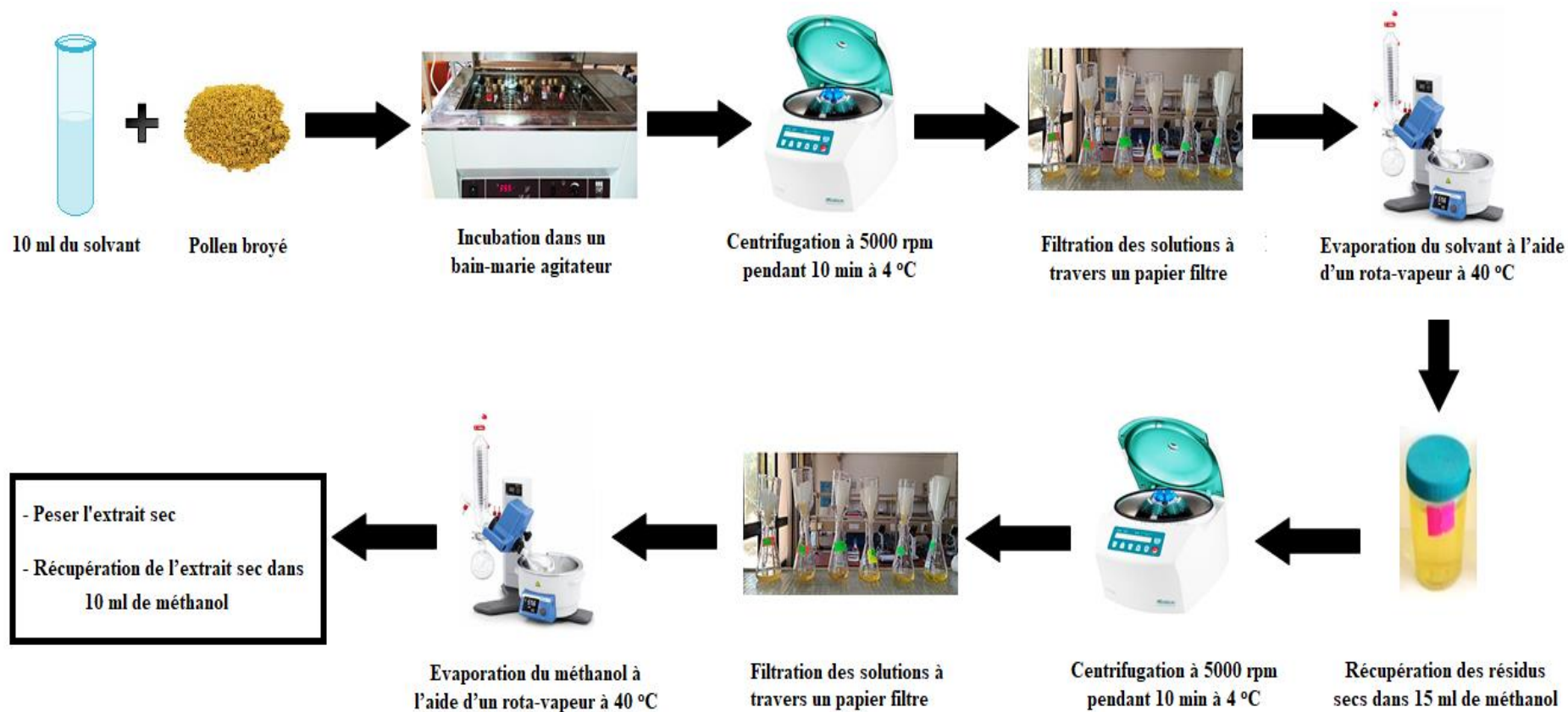


Figure 3 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (Yahiaoui et al., 2022).

Les différentes expériences sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau III : Différentes expériences réalisées selon la méthode séquentielle.

N°	Facteur	Expérience indépendante
I	Nature du solvant (X ₁)	1g du pollen broyé a été mélangé avec 10 ml de solvant (eau distillée, acétone 50 %, éthanol 50 %, méthanol 50%, 2-butanol 50 % et acétonitrile 50 %) et l'extraction a été faite à température ambiante pendant 1 h.
II	Concentration du solvant (X ₂)	1g du pollen broyé a été mélangé avec 10 ml du solvant X ₁ avec des concentrations de 15, 30, 45, 60, 75 et 100 % et l'extraction a été faite à température ambiante pendant 1 h.
III	Ratio échantillon/solvant (X ₃)	Des quantités du pollen broyé (0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,25 ; 1,5 ; 1,75 g) ont été mélangé avec 10 ml du solvant X ₁ avec une concentration de X ₂ et l'extraction a été faite à température ambiante pendant 1 h.
IV	Température (X ₄)	X ₃ g du pollen broyé a été mélangé avec 10 ml du solvant X ₁ avec une concentration de X ₂ et l'extraction a été faite à température (25, 35, 45, 55, 65 et 75 °C) pendant 1 h.
V	Temps (X ₅)	X ₃ g du pollen broyé a été mélangé avec 10 ml du solvant X ₁ avec une concentration de X ₂ et l'extraction a été faite à température X ₄ pendant (60, 90, 120, 150, 180 min).

II.4.1.2. Dosage des composés phénoliques totaux

Le protocole suivi pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux a été celui de **Naithani et al. (2006)**. Un volume de 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (50 % ; v/v) a été mélangé avec 100 µl de l'extrait et 2 ml de carbonate de sodium (2 % ; p/v). Après homogénéisation et ensuite incubation du mélange à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance a été lue au spectrophotomètre à 750 nm. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1g de pollen (mg EAG/g de pollen) en utilisant la courbe d'étalonnage d'acide gallique ($y = 3,34x + 0,025$; $R^2=0,98$) annexe 2.

II.4.1.3. Activité anti-radicalaire DPPH

L'activité inhibitrice du radical DPPH a été déterminée selon la méthode décrite par **Meda et al. (2005)**. Un volume de 1 ml de la solution méthanolique du radical DPPH (6×10^{-5} M) a été ajouté à 0,1 ml de la solution d'extrait. Après incubation pendant 15 min, la lecture a été faite à 517 nm et le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

Où :

AC : Absorbance du contrôle.

AE : Absorbance de l'échantillon.

II.4.2. Méthode des surfaces de réponse (MSR)

La méthode des surfaces de réponse est un ensemble de techniques mathématiques qui se base sur la conception expérimentale afin de déterminer le rapport entre des variables d'entrée indépendantes et la réponse. En utilisant des modèles mathématiques basés sur des expériences effectuées, cette méthode permet de déterminer une relation d'approximation entre les réponses de sortie et les variables d'entrée pour optimiser les paramètres du procédé afin d'atteindre des réponses souhaitables (**Baroth et al., 2011**).

Un total de trois paramètres a été choisi pour une optimisation par surface de réponse suivant le modèle de Box-Behnken et cela en se basant sur les résultats obtenus avec la méthode séquentielle. Ces paramètres ont été la concentration du solvant x_1 (Acétonitrile %), la température d'extraction x_2 (°C) et le temps d'extraction x_3 (min). Les réponses de sortie ont été les composés phénoliques totaux (Y_1) et l'activité antioxydante estimée par l'inhibition du radical libre DPPH (Y_2). Les trois variables indépendantes ont été prescrites en 3 niveaux et elles ont été codées comme suit : valeurs faibles (-1), valeurs intermédiaires (0) et valeurs élevées (+1). Les réponses ont été données sous la forme d'un modèle polynomial du second degré suivant l'équation :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \dots \dots \dots (i \neq j) \text{ EQ 1}$$

Y : réponse ; β_0 : coefficient constant ; β_i : coefficient linéaire ; β_{ii} : coefficient quadratique ; β_{ij} : coefficient d'interaction.

II.5. Activités biologiques

En sachant que le pollen d'abeille contient une quantité assez importante en antioxydants et suite à une confirmation par l'optimisation de leur extraction, l'extrait final a été évalué pour ses propriétés biologiques en l'occurrence de l'activité antioxydante par le test de la peroxydation lipidique. Aussi, de l'activité anti-hémolytique.

Les échantillons de sang ont été prélevés de quatre individus au niveau du laboratoire d'analyse hématologique Dr Kebbiche Hamid à la wilaya de Bejaia. Les volontaires ont été de sexe masculin et féminin en bonne santé, non-fumeurs, ne prenant aucun traitement médicamenteux et aucun complément alimentaire. Les échantillons ont été stockés à 4° C jusqu'à utilisation.

II.5.1. Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été mesurée par la méthode colorimétrique TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance Assay). Cette méthode permet d'évaluer le taux de MDA (malonyldialdéhyde) dans le sérum du sang. Le MDA est un des produits finaux de couleur rose de la peroxydation lipidique des lipides par des radicaux libres (Tsikas, 2016).

Le test d'inhibition de la peroxydation lipidique a été réalisé selon le protocole de Costa et al. (2006) avec des modifications mineures. Dans des Eppendorf, un mélange de 500 µl de plasma sanguin et 250 µl de l'extrait final du pollen a été préparé. Cependant, le contrôle a été préparé avec 500 µl de plasma et 250 µl d'eau distillée. La vitamine C a été utilisée comme inhibiteur de référence. Après incubation pendant 5 min à 37° C, un volume de 1 ml de la solution stock a été ajouté au milieu réactionnel. Le mélange a été ensuite incubé au bain marie à 95° C pendant 15 min et celui-ci a été transféré dans un bain de glace pendant 5 min pour stopper la réaction. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, l'absorbance du surnageant a été lue avec un spectrophotomètre à 535 nm. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition de la peroxydation lipidique (\%)} = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

Où :

AC : Absorbance de contrôle,

AE : Absorbance de milieu réactionnel avec l'échantillon.

II.5.2. Activité anti-hémolytique

L'hémolyse est un phénomène qui consiste en la destruction des hématies, qui libèrent l'hémoglobine dans le plasma (**Bonarska-Kujawa et al., 2011**).

Cependant l'action anti-hémolytique des polyphénols empêche la lyse des globules rouges présents dans le sang. L'hémoglobine n'est pas libérée et la coloration du sérum et plasma reste intacte sans changement. En faisant une action de stabilisation de la membrane des globules rouges, les polyphénols forment un bouclier de protection (**Bonarska-Kujawa et al., 2011**).

L'activité anti-hémolytique de l'extrait phénolique du pollen a été évaluée selon la méthode de **Shinde et al. (1999)**. Le sang frais des quatre individus a été centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min. Le culot du sang a été ensuite récupéré et soumis à 3 lavages successifs avec un tampon phosphate isotonique (10 mM, 154 mM NaCl, pH= 7,4). Dans des tubes à essai, un volume de 5 ml de l'extrait de pollen a été mélangé avec 1 ml de la suspension érythrocytaire (10 %) et 5 ml de la solution hypotonique (50 mM). Le mélange de 5 ml d'eau distillée, 1 ml de la suspension érythrocytaire et 5 ml de la solution hypotonique a été utilisé comme contrôle, tandis que l'aspirine a été utilisée comme inhibiteur de référence. Après incubation pendant 10 min et centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, l'absorbance du surnageant a été lue avec spectrophotomètre à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'activité hémolytique a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition de l'activité hémolytique (\%)} = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

Où :

AC : Absorbance de contrôle.

AE : Absorbance de milieu réactionnel avec l'échantillon.

II.6. Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été présentés sous forme de moyenne \pm écart type de trois essais ($n=3$) et ils ont été calculés avec le programme Microsoft office Excel 2016. La normalité et l'homogénéité des variables étudiés ont été vérifiées avec les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Levene, respectivement.

L'analyse de variance à un seul critère de classification (ANOVA) a été réalisée avec le logiciel STATISTICA 7.1 pour traiter statistiquement les résultats d'optimisation par la méthode séquentielle. Le but a été de déterminer les différences significatives des teneurs en composés phénoliques et des activités antioxydantes entre les différents échantillons, ainsi que le test post-hoc HSD Tukey a été réalisé pour la comparaison des moyennes. Cependant l'ANOVA de Kruskal-Wallis a été appliqué aux variables non gaussiennes et/ou les variables avec des variances non homogènes.

Le traitement des données obtenues avec la méthode des surfaces de réponse a été effectué à l'aide du logiciel JMP Pro 10.0.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats de l'analyse pollinique

L'origine botanique de l'échantillon de pollen a été déterminée par l'analyse pollinique. Les différents grains de pollen ont été identifiés selon la taille, la forme, la particularité de l'exine et les ouvertures ou apertures (Louveaux et al., 1978).

Les grains de pollens révélés par l'analyse pollinique ont été classés en fonction de leurs fréquences dans les catégories suivantes : pollens prédominants (> 45 %) ; pollens secondaires (16-45 %) ; pollens minoritaires (3-15 %) et pollens très minoritaires (< 3 %) (Ouchmoukh et al., 2007).

Les résultats de l'analyse pollinique illustrés dans le tableau IV montrent que l'échantillon du pollen analysé a été monofloral et le pollen dominant appartient à la famille des *Asteraceae* avec une fréquence de 58 % en se référant aux photographies illustrées dans la figure 4. Cela s'explique par la zone géographique de récolte et le large éventail d'espèces de cette famille, qui représente une grande famille de plantes. Selon la littérature, au cours d'un vol pour collecter du pollen, les abeilles préfèrent les fleurs d'une espèce végétale unique et généralement leur charge en pollen est monofloral (Atanassova et Lazarova, 2010).

Selon toujours les résultats obtenus, le pollen des *Fabaceae* a été détecté comme pollen secondaire, suivi par celui des *Rosaceae*, *Cucurbitaceae* et *Fagaceae* qui ont été identifiés comme des pollens minoritaires. En revanche, le pollen des *Fumariaceae* a été repéré comme très minoritaire.

Tableau IV : Spectre pollinique et pourcentages des familles de pollens identifiés dans l'échantillon.

Echantillon	Pollens prédominants (>45%)	Pollens secondaires (16-45%)	Pollens minoritaires (3-15%)	Pollens très minoritaires (<3%)
Pollen	<i>Asteraceae</i> 58 %	<i>Fabaceae</i> 19 %	<i>Rosaceae</i> 13 % <i>Cucurbitaceae</i> 4 % <i>Fagaceae</i> 4 %	<i>Fumariaceae</i> 2 %

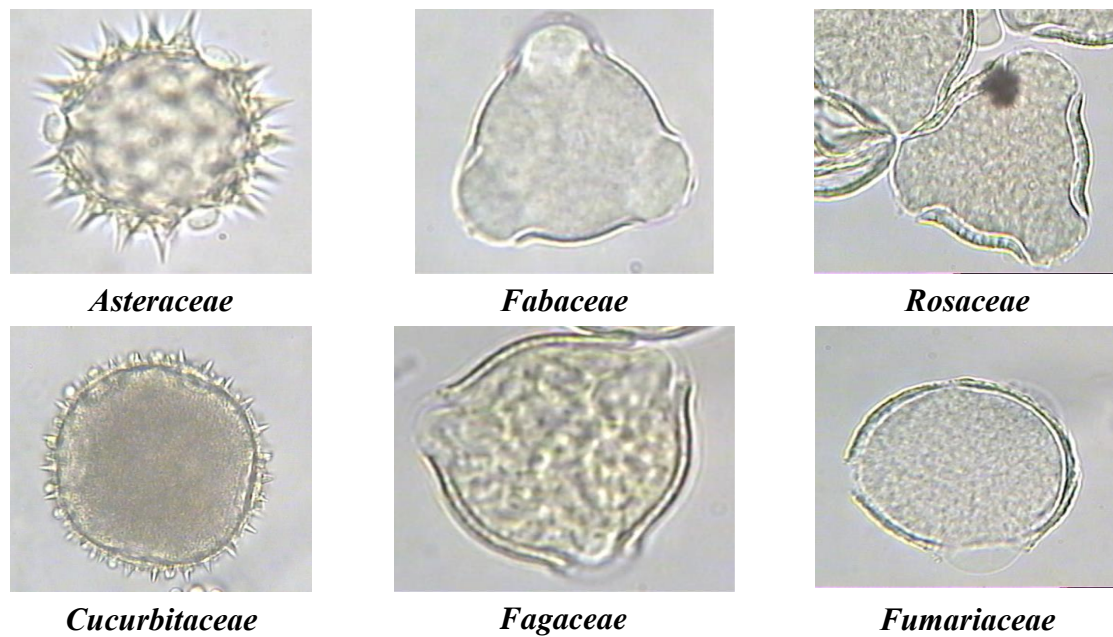


Figure 4 : Photographies des grains de pollens identifiés dans l'échantillon (CETAM (Centre d'Études Techniques Apicoles de Moselle, France)).

III.2. Résultats des analyses physico-chimiques

Le tableau ci-dessous représente les résultats des analyses physico-chimiques obtenus.

Tableau V : Résultats des paramètres physico-chimiques de l'échantillon de pollen.

Echantillon	Brix (%)	Couleur	Protéines (mg EBSA/100 g)
Pollen	6,2 ± 0,3	0,35 ± 0,02	27 305,98 ± 915,52

Les valeurs représentent la moyenne ± écart-type.

III.2.1. Taux de Brix

La valeur du degré de Brix obtenue est représentée dans le tableau V. Cette valeur a été de 6,2 %, ce qui est beaucoup plus inférieur comparé à celles rapportées par **Adaskeviciute et al. (2019)** avec des degrés de Brix qui varient de 22,56 à 31,83 %. Cette dissimilitude peut être expliquée par la différence de l'origine botanique du pollen.

III.2.2. Intensité de couleur

L'intensité de couleur obtenue est représentée dans le tableau V avec une valeur de 0,35. Selon **Ouchmoukh et al. (2007)**, la couleur du pollen peut varier en fonction de sa composition

chimique précisément la teneur en composés phénoliques, plus la teneur est importante plus la couleur est sombre.

III.2.3. Teneur en protéines

La teneur en protéines de l'échantillon du pollen étudié est représentée dans le tableau V. La valeur obtenue est de 27 305,98 mg EBSA/100 g est très proche de celles rapportée par **Yang et al. (2013)** avec un intervalle qui oscille entre 14860 et 28960 mg EBSA/100 g. Cette différence peut être expliquée par la correspondance de l'échantillon à la standardisation du taux de protéines dans le pollen qui varie de 10 à 40 %.

III.3. Résultats de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques

III.3.1. Méthode séquentielle

III.3.1.1. Effet de la nature du solvant

Les résultats de l'effet de la nature du solvant sur l'extraction des polyphénols totaux et l'activité antioxydante du pollen sont représenté dans les figures 5 et 6. A première vue des histogrammes ci-dessous, les composés phénoliques et le test du radical DPPH ont été significativement affectés par les différents solvants. La meilleure teneur en composés phénoliques et la meilleure activité inhibitrice du radical DPPH reviennent à l'extrait d'acétonitrile avec des valeurs respectives de 22,13 mg EAG/g et de 77,66 %. Cependant, l'extrait aqueux a montré quant à lui la plus faible valeur en polyphénols avec 13,51 mg EAG/g et le faible pouvoir inhibiteur du radical DPPH avec 54,11 %.

L'analyse de la variance de l'effet de la nature du solvant a montré un groupe homogène pour les composés phénoliques totaux (BU, MET, ETH et ACT) et un groupe homogène pour le test anti-radicalaire DPPH (ETH et ACT). Cependant, le reste des échantillons ont été statistiquement différents à $p < 0,05$.

Naczk et al. (2006) ont rapporté que la faible capacité d'extraction par l'eau peut être expliquée par la faible solubilité des composés phénoliques dans l'eau suite à leurs liaisons aux protéines. Toutefois, **Zarzycki et al. (2010)** ont rapporté que le meilleur pouvoir d'extraction de l'acétonitrile réside dans sa capacité a modifié de polarité et a effectué des interactions électrostatiques en présence d'eau. Cette caractéristique signifie qu'il peut être utilisé pour des techniques de préparation d'échantillons, y compris la déprotéinisation d'échantillons bruts,

comme pour cette étude, où les composés phénoliques ont été obtenus après leur séparation des protéines.

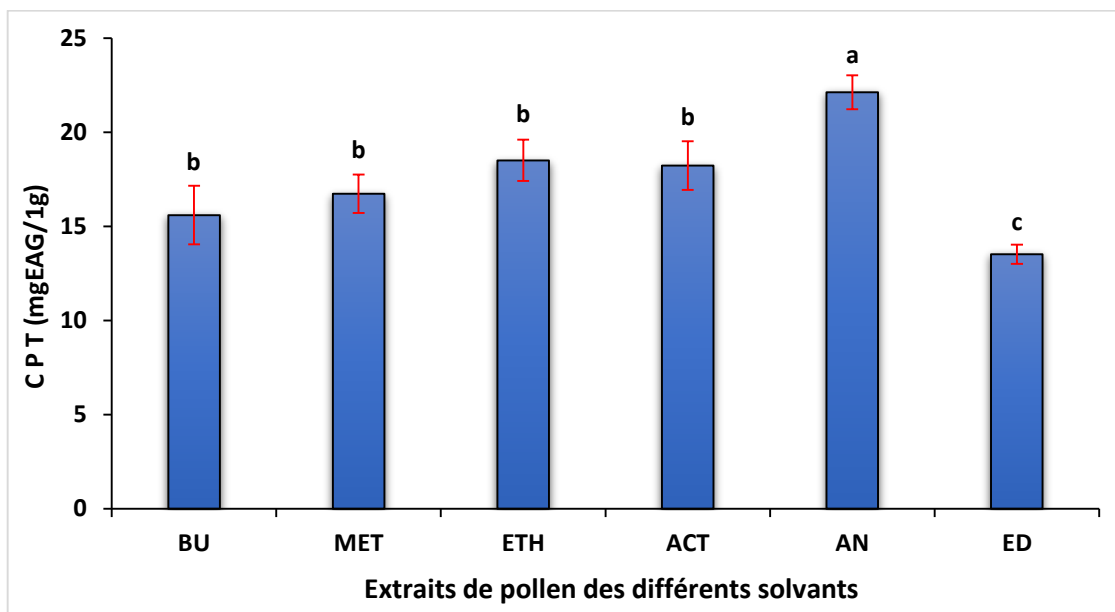


Figure 5 : Teneurs en CPT des extraits des différents solvants.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type (n=3). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). CPT : composés phénoliques totaux ; BU : 2-butanol ; MET : méthanol ; ETH : éthanol ; ACT : acétone ; AN : acétonitrile ; ED : eau distillée.

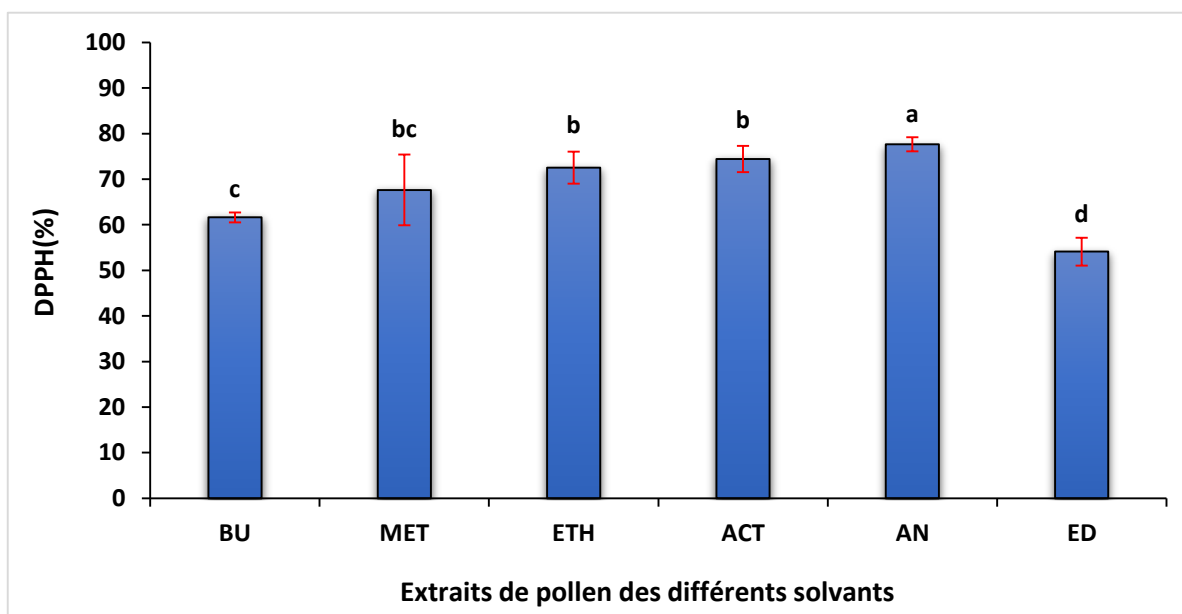


Figure 6 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des différents solvants.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type (n=3). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). BU : 2-butanol ; MET : méthanol ; ETH : éthanol ; ACT : acétone ; AN : acétonitrile ; ED : eau distillée.

III.3.1.2. Effet de la concentration du solvant

Les résultats des teneurs en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits du pollen en fonction des différentes concentrations du solvant sont illustrés dans les figures 7 et 8. L'analyse statistique ANOVA a montré que les composés phénoliques totaux et l'activité anti-radicalaire DPPH ont été significativement affectés par les concentrations de l'acétonitrile. En effet, la meilleure teneur en composés phénoliques a été enregistrée par l'extrait d'acétonitrile de 75 % avec 48,7 mg EAG/g suivi par les extraits d'acétonitrile de 60, 15, 30 et 45 %, tandis que la faible valeur a été de 2,40 mg EAG/g obtenue avec l'extrait d'acétonitrile 100 %.

La même tendance a été observée pour l'activité inhibitrice du radical DPPH dont l'activité la plus élevée a été marquée par l'extrait d'acétonitrile à 75 % avec un pourcentage d'inhibition de 75,2 % suivi par les extraits d'acétonitrile à 60, 30, 15 et 45 %. En revanche, le pourcentage d'inhibition le plus faible a été enregistré par l'extrait d'acétonitrile 100 % avec une valeur de 4,18 %

L'analyse statistique a montré un groupe homogène (C2 et C3) pour les composés phénoliques et un autre groupe homogène (C1, C2 et C3) pour l'activité anti-radicalaire DPPH. Cependant, les autres échantillons ont présentés une différence significative à $p < 0,05$.

Selon **Zarzycki et al. (2010)**, L'acétonitrile 100 % possède une polarité extrêmement faible voir apolaire, donc saturé, ce qui empêche sa liaison avec les composés phénoliques. En revanche, l'acétonitrile 75 % possède la polarité la plus adéquate pour l'extraction des composés phénoliques du pollen.

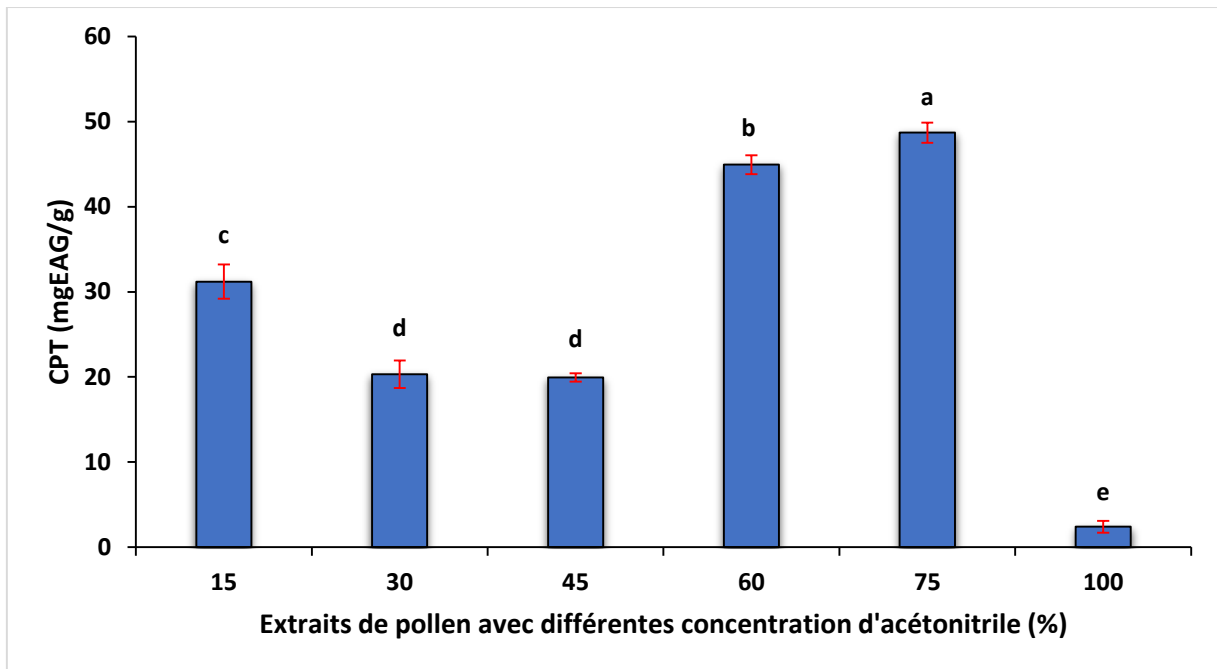


Figure 7 : Teneurs en CPT des extraits des différentes concentrations d'acétonitrile.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type (n=3). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). CPT : composés phénoliques totaux. C1, C2, C3, C4, C5 et C6 : concentrations d'acétonitrile par ordre croissant.

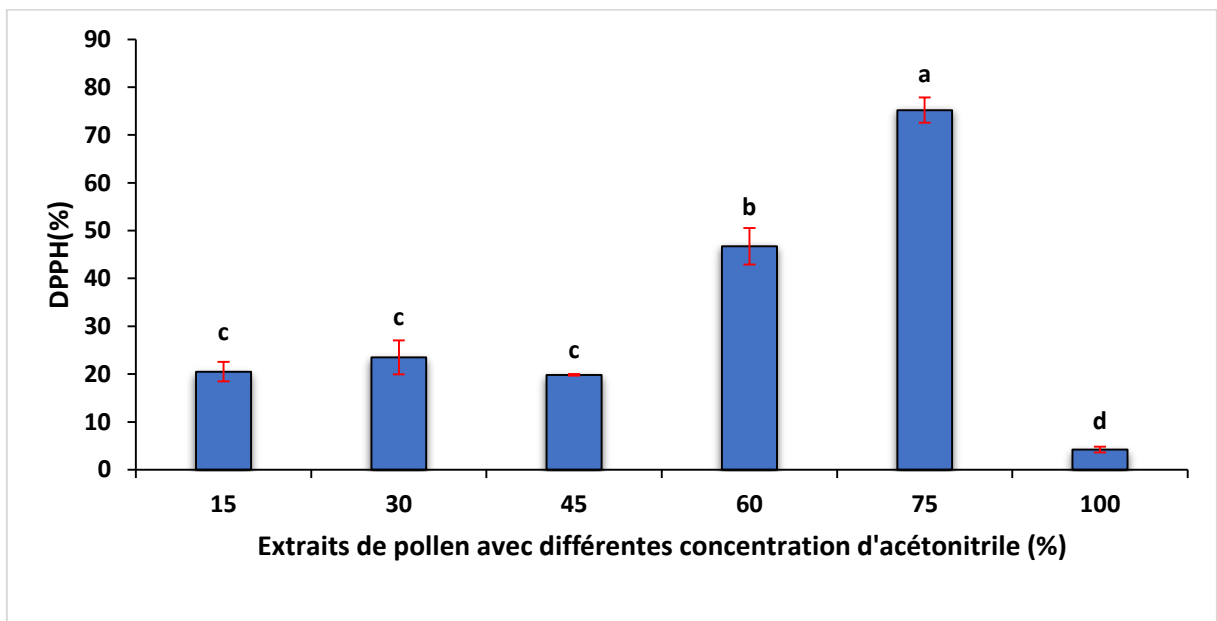


Figure 8 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes concentrations d'acétonitrile.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type (n=3). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). C1, C2, C3, C4, C5 et C6 : concentrations d'acétonitrile par ordre croissant.

III.3.1.3. Effet du ratio échantillon / solvant

L'effet du ratio échantillon/solvant sur l'extraction des polyphénols totaux du pollen est représenté dans les figures 9 et 10. Les résultats obtenus ont montré que les composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire DPPH sont affectés par les différents ratios. Les meilleures valeurs ont été enregistrées par l'extrait de 1 g de pollen avec une teneur de 264,40 mg EAG/g pour les polyphénols et un pourcentage d'inhibition de 79,33 % pour le test du radical DPPH. La plus faible valeur en composés phénoliques a été enregistrée par l'extrait de 1,5 g tandis que la faible activité antioxydante a été obtenue par l'extrait de 0,5 g avec des valeurs de 37,80 mg EAG/g et de 4,18 %, respectivement.

L'analyse de la variance a révélé que les échantillons S1, S2 et S5 pour les polyphénols totaux et les échantillons S4 et S5 pour le test du radical DPPH n'ont pas présentés de différence significative. En revanche, les autres échantillons ont été statistiquement différents à $p < 0,05$.

Les résultats obtenus pouvant être expliqués par le principe du transfert de la matière. Selon la loi de **Fick**, il existe une relation linéaire entre le flux massique dispersif du soluté et le gradient de concentration existant entre le solvant et la matrice solide. Cependant, La diminution de la teneur en polyphénols et de l'activité antiradicalaire DPPH à partir de 1 g de pollen peut être expliquée par le phénomène de saturation du solvant (**Khamtache-Abderrahim et al., 2021**).

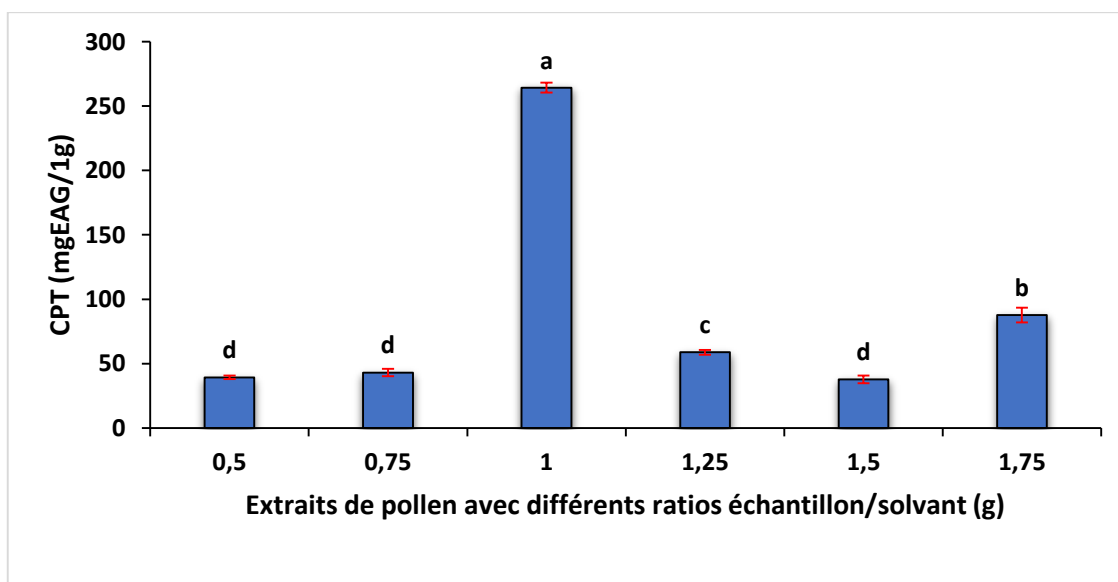


Figure 9 : Teneurs en CPT des extraits des différents ratios.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type ($n=3$). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). CPT : composés phénoliques totaux. S1, S2, S3, S4, S5 et S6 : ratios échantillon/solvant par ordre croissant.

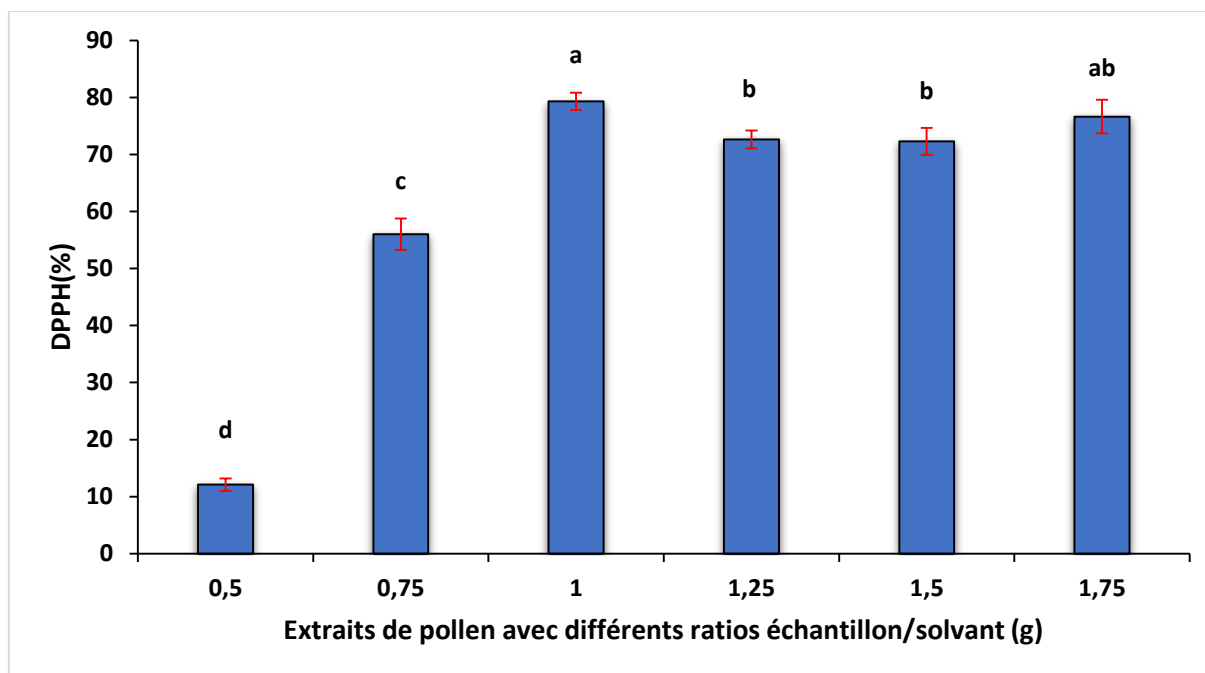


Figure 10 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différents ratios.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type ($n=3$). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). S1, S2, S3, S4, S5 et S6 : ratios échantillon/solvant par ordre croissant.

III.3.1.4. Effet de la température d'extraction

Les résultats du dosage des polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits de pollen à différentes températures sont représentés dans les figures 11 et 12. L'extrait du pollen obtenu à 35° C a montré la plus grande teneur en composés phénoliques avec 59,95 mg EAG/g et la meilleure activité inhibitrice du radical DPPH avec une valeur de 77,64 %. Cependant, l'extrait obtenu à 45° C a affiché la plus faible teneur en polyphénols totaux avec 20,07 mg EAG/g et le faible pouvoir inhibiteur du radical DPPH avec 35,97 %.

L'analyse statistique a révélé que tous les échantillons ont été statistiquement différents ($p < 0,05$) à l'exception de T1, T4 et T6 pour les composés phénoliques et T4 et T6 pour l'activité antioxydante, qui n'ont pas présentés de différence significative.

Les résultats obtenus ont montrés des variations des teneurs en polyphénols et de l'activité antioxydante de l'extrait de pollen en fonction de la température. Cela peut être expliqué par la différence des types de composés phénoliques présents dans chaque extrait bien que c'est le même échantillon, et cela par rapport aux propriétés physico-chimiques de chaque type de composés phénoliques où la température augmente la solubilité et le coefficient de

diffusion sauf que c'est différent pour chaque type de composés phénoliques (Bachir-Bey et al., 2013).

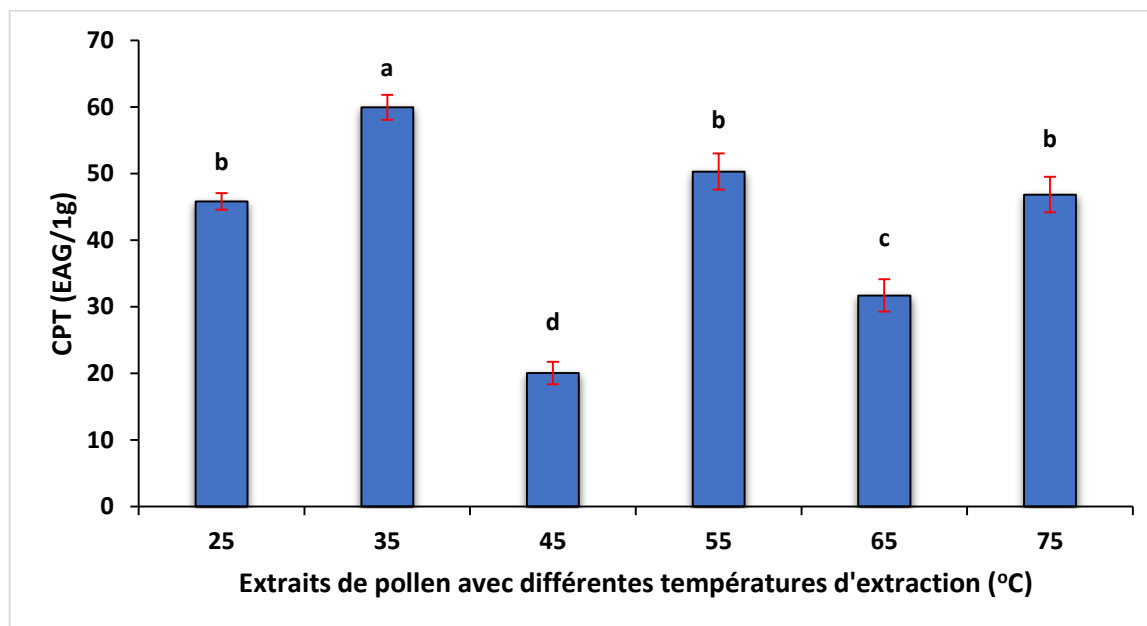


Figure 11 : Teneurs en CPT des extraits des différentes températures.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type ($n=3$). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). CPT : composés phénoliques totaux. T1, T2, T3, T4, T5 et T6 : températures d'extraction par ordre croissant.

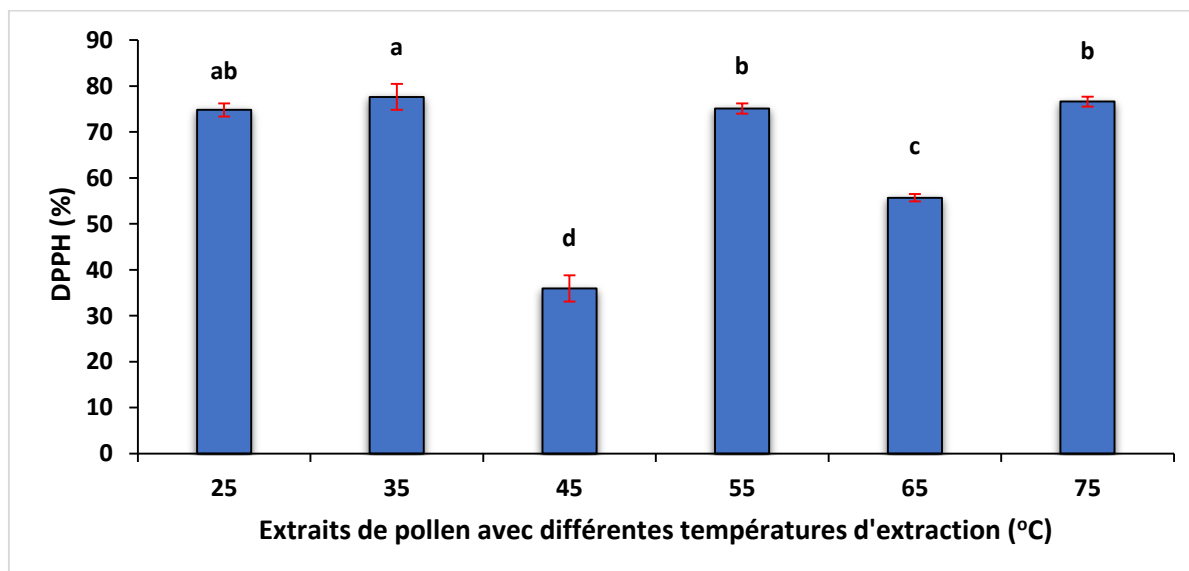


Figure 12 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes températures.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type ($n=3$). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). T1, T2, T3, T4, T5 et T6 : températures d'extraction par ordre croissant.

III.3.1.5. Effet du temps d'extraction

Les résultats présentés dans les figures 13 et 14 ont montré un effet significatif du temps sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante du pollen. La teneur la plus élevée en polyphénols et la forte activité anti-radicalaire DPPH ont été obtenues à 180 min avec des valeurs de 57,61 mg EAG/g et de 75,95 %, respectivement. La faible valeur en polyphénols totaux a été enregistrée à 120 min avec 46,05 mg EAG/g tandis que la faible valeur de l'activité inhibitrice du radical DPPH a été obtenue à 90 min avec 72,74 %.

L'analyse ANOVA a montré qu'entre 60 à 150 min y a pas eu de différences significatives. Cela signifie que le temps n'a pas eu d'effet sur la nature des composés phénoliques ni leur extraction à t2, t3 et t4, donc la présence des composés phénoliques dans l'acétonitrile n'a pas d'effet dénaturant sur ces derniers.

La durée de contact entre le solvant et le soluté est un paramètre très important dans l'extraction des composés phénoliques. La deuxième loi de diffusion (loi de **Fick**) suggère qu'il y a un transfert de la matière de la matrice vers le solvant et qu'après une certaine durée d'extraction, un équilibre final s'établi entre les concentrations de soluté dans la matrice végétale et dans le solvant d'extraction (**Silva et al., 2007 ; Chew et al., 2011**).

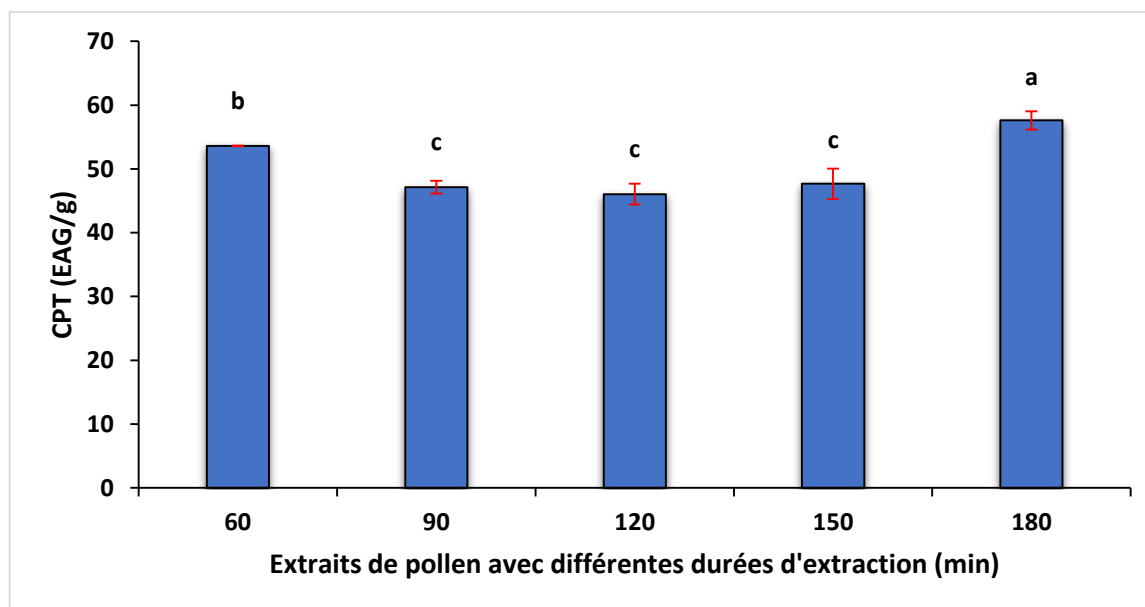


Figure 13 : Teneurs en CPT des extraits des différentes durées d'extraction.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type (n=3). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). CPT : composés phénoliques totaux. t1, t2, t3, t4 et t5 : durées d'extraction par ordre croissant.

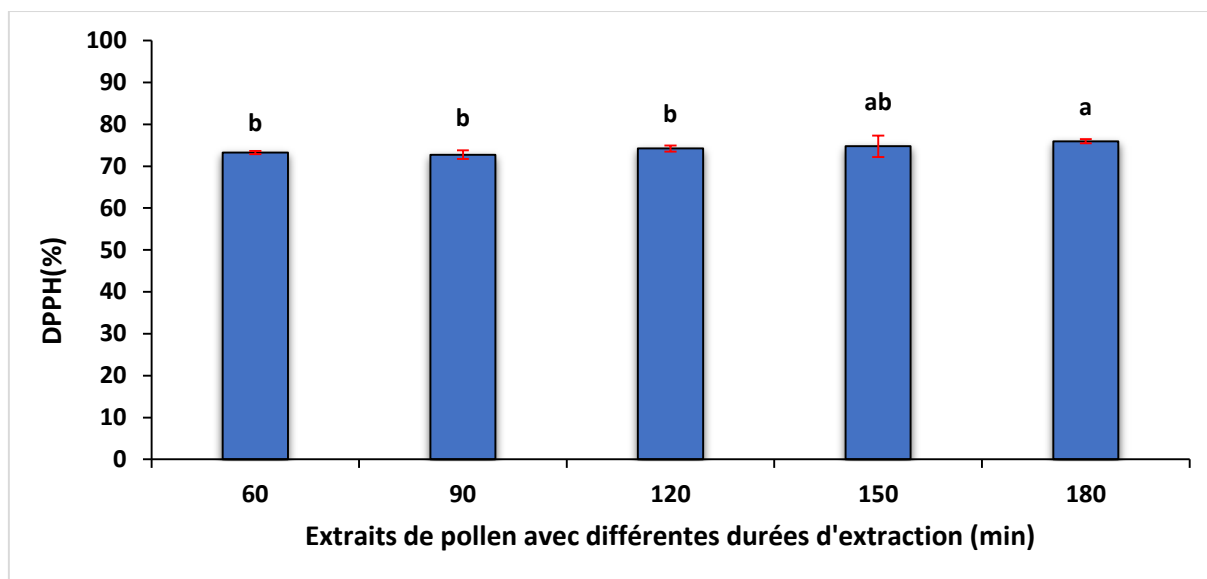


Figure 14 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits des différentes durées d'extraction.

Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type ($n=3$). Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différentes ($p > 0,05$) ($a < b < c < d$). t1, t2, t3, t4 et t5 : durées d'extraction par ordre croissant.

II.3.2. Méthode des surfaces de réponse (MSR)

Après avoir déterminé les meilleures conditions d'extraction avec la méthode séquentielle, des intervalles de valeurs pour chaque variable ont été sélectionnés comme suit : X_1 (60, 75 et 90 %), X_2 (25, 35 et 45°C) et X_3 (180, 195 et 210 min). Une série de 15 expériences a été suggérée par le logiciel JMP en utilisant le plan d'expériences Box-Behnken avec trois points centraux.

Le tableau VI montre que les valeurs expérimentales et les valeurs prévues des teneurs en composés phénoliques et de l'activité antioxydante ont été étroitement liées à $p < 0,05$. Dans la présente étude, les coefficients de détermination (R^2) ont été respectivement de 0,94 % pour les composés phénoliques et de 0,95 pour le test anti-radicalaire DPPH (Annexe 3). Ainsi, seulement 6 et 5 % des variations restent inexpliquées par les modèles. Cela indique que le modèle obtenu a été de bonne qualité et possède un fort pouvoir explicatif.

Tableau VI : Plan d'expériences Box-Behnken des variables indépendantes et leurs réponses expérimentales et prévues.

N°	Variables			Valeurs expérimentales		Valeurs prévues	
	Concentration (%)	Température (°C)	Temps (min)	CPT (mg EAG/1g)	DPPH (%)	CPT (mg EAG/1g)	DPPH (%)
1	90	45	195	82,54	73,19	87,01	79,51
2	75	35	195	57,53	57,05	59,11	57,79
3	75	35	195	60,69	59,12	59,11	57,79
4	60	35	180	34,68	34,28	45,92	45,81
5	90	25	195	82,3	79,58	80,36	86,95
6	60	35	210	34,64	37,58	45,75	46,21
7	75	45	180	46,51	53,54	53,15	55,85
8	75	35	195	59,11	57,21	59,11	57,79
9	75	25	180	77,57	80,66	70,80	75,45
10	60	45	195	39	35,78	43,84	67,37
11	60	25	195	58,81	67,69	54,34	61,37
12	75	25	210	60,97	62,26	54,33	59,95
13	75	45	210	61,36	72,9	68,13	78,11
14	90	35	180	92,18	70,33	81,08	61,70
15	90	35	210	91	79,56	79,76	68,04

Les résultats de l'analyse de la variance et du manque d'ajustement sont présentés dans le tableau VII. La somme des carrés des modèles a été significativement plus élevée que la somme des carrés des résidus pour les composés phénoliques et l'activité antioxydante, ce qui signifie que les variances des modèles obtenus ont été plus élevées que celles des résidus. L'analyse ANOVA montre que les probabilités (p) des deux modèles ont été inférieures à 0,05. Ce résultat montre que les deux modèles ont été hautement significatifs.

La valeur de rapport F (rapport de carrés des moyennes de défaut d'ajustement et de l'erreur pure) a été de 38,66 pour les composés phénoliques et de 45,09 pour l'activité antioxydante et qui correspondent aux probabilités de 0,253 et 0,218, respectivement. Les probabilités obtenues ont été supérieures à 0,05 ce qui indique que les défauts d'ajustement des deux modèles n'ont pas été significatifs ($p > 0,05$). Ce résultat révèle que les deux modèles ont été de bonne qualité. **Goupy, (2006)** a rapporté qu'un modèle est considéré bon si le résultat de défaut d'ajustement n'est pas significatif et dans le cas contraire le modèle est rejeté.

Tableau VII : ANOVA de modèles et défauts d'ajustement pour les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Teneur en composés phénoliques					
Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyens	Rapport F	Prob. > F
<i>Modèle</i>	9	4833,99	537,11	9,12	0,013*
résidus	5	294,56	58,91		
Total	14	5128,55			
<i>Défaut d'ajustement</i>	3	289,57	96,52	38,66	0,253
Erreur pure	2	4,99	2,5		
Erreur totale	5	294,56			
Activité antioxydante (DPPH)					
Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyens	Rapport F	Prob. > F
<i>Modèle</i>	9	3303,19	367,02	10,08	0,010*
Résidus	5	182,08	36,42		
Total	14	3485,27			
<i>Défaut d'ajustement</i>	3	179,42	59,81	45,09	0,218
Erreur pure	2	2,65	1,33		
Erreur totale	5	182,07			

Les résultats de l'estimation des paramètres des composés phénoliques et de l'activité antioxydante sont présentés dans Annexe 4. Les résultats obtenus ont montré que les composés phénoliques ont été influencés par l'effet linéaire de la concentration du solvant X_1 ($p=0,0004$) alors que le radical DPPH a été influencé par deux effets linéaires et deux effets quadratiques : concentration (X_1) ($p=0,0007$), température (X_2) ($p=0,023$), température*temps (X_2*X_3) ($p=0,026$) et température*température (X_2^2) ($p=0,034$).

Les modèles quadratiques ajustés pour la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante considérant les termes significatifs ont été donnés dans les équations 2 et 3, respectivement :

$$\text{CPT (mg EAG/1g)} = 59,11 + 22,61 X_1 \dots \dots \dots \text{Eq (2)}$$

$$\text{DPPH (\%)} = 57,79 + 15,92 X_1 - 6,85 X_2 + 9,08 X_2^2 + 9,44 X_2 X_3 \dots \dots \dots \text{Eq (3)}$$

La figure 15 illustre les tracés des surfaces de réponse présentées dans un plan tridimensionnel. Ces surfaces ont été générées par le logiciel JMP afin de déterminer l'effet des trois facteurs (X_1 , X_2 , X_3) sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits phénoliques du pollen.

Les résultats obtenus dans la figure 15 (A, B, C, D) ont montré que les tracés des composés phénoliques et de l'activité inhibitrice du radical DPPH ont été proches. La concentration de l'acétonitrile a montré un effet linéaire significatif sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante avec des valeurs proportionnelles à la concentration de l'acétonitrile. Ce résultat peut être expliqué par l'absence de la valeur optimale de la concentration du solvant.

La figure 15 (E, F) a montré un effet quadratique de temps et de température. La signification statistique du terme quadratique pour ces deux facteurs indique que les composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire DPPH augmentent avec le temps et la température jusqu'aux valeurs optimales puis les réponses diminuent. Selon les tracés obtenus (E et F), les composés phénoliques et l'activité antioxydante augmentent jusqu'à atteindre les valeurs optimales pour la température 25° C et le temps 180 min et ensuite les réponses redescendent vers un effet quadratique négatif.

L'effet quadratique négatif du temps et de la température sur l'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante peut s'expliquer par la thermo-sensibilité de certains composés phénoliques qui perdent leur pouvoir antioxydant lorsqu'ils sont exposés à des températures élevées et prolongées dans le temps.

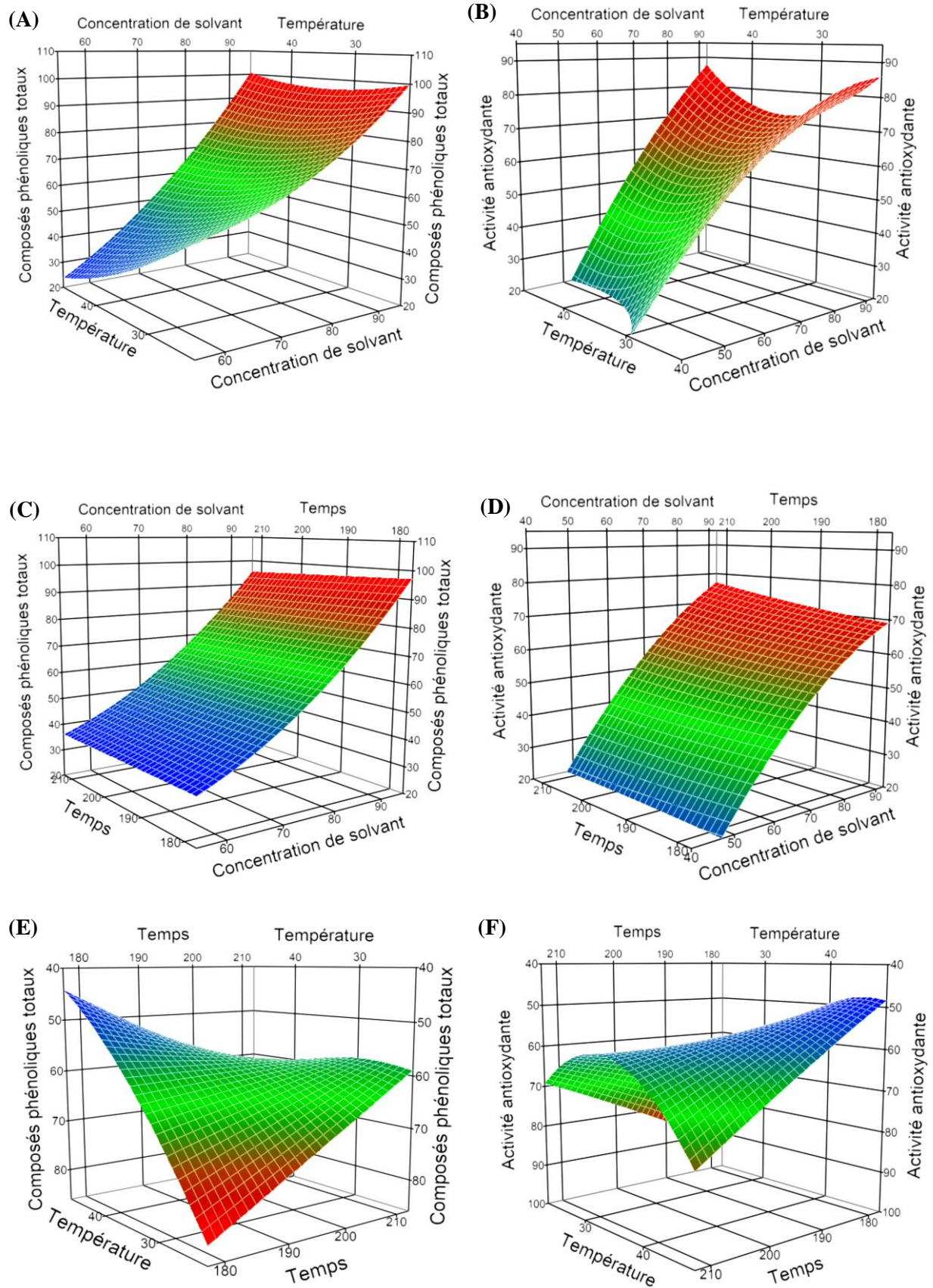


Figure 15 : Surfaces des réponses montrant les effets des variables d'extraction sur les composés phénoliques totaux (A, C, E) et l'activité antioxydante DPPH (B, D, F).

Les paramètres d'extraction optimisés et les valeurs prévues et expérimentales des composés phénoliques et de l'activité anti-radicalaire DPPH sont présentés dans le tableau VIII.

Les résultats obtenus ont menés à une optimisation des conditions d'extraction pour l'optimum des composés phénoliques et de l'activité anti-radicalaire DPPH et cela en maximisant la désirabilité des valeurs prévues. Afin de tester l'efficacité du modèle, trois expériences de validation ont été effectuées en utilisant les conditions optimales obtenues. Les valeurs des variables d'optimisation sont déterminées ainsi : concentration (90 %), température (25° C), temps (180 min) avec une prédiction de 98,04 mg EAG/g de composés phénoliques totaux et 87,18 % de l'inhibition du radical DPPH. Les valeurs expérimentales obtenues après l'optimisation ont été très proches des valeurs prévues avec une teneur en composés phénoliques de 90,63 mg EAG/g et une activité antiradicalaire DPPH de 80,34 %. Ce résultat confirme la validité du modèle obtenu.

Tableau VIII : Valeurs prévues et expérimentales des composés phénoliques totaux et de l'activité antioxydante DPPH selon les paramètres d'extraction optimisés.

Paramètres optimisés		Réponses			
Facteurs	Conditions optimales	Valeurs prédites		Valeurs expérimentales	
		CPT (mg EAG/g)	DPPH (%)	CPT (mg EAG/g)	DPPH (%)
Concentration (%)	90	98,04	87,18	90,63	80,34
Température (°C)	25				
Temps (min)	180				

III.4. Résultats des activités biologiques

III.4.1. Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique

Les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait final optimisé de l'échantillon de pollen sont donnés dans la figure 16. Les résultats obtenus par l'extrait de pollen ont été similaires à ceux obtenus avec la vitamine C (inhibiteur de référence) et cela pour tous les individus à l'exception de l'individu 4. Ce dernier a montré une inhibition plus prononcée obtenue avec l'extrait avec 79,96 % par rapport à celle obtenue avec la vitamine C qui a été de 57,04 %.

Le résultat obtenu pour l'individu 4 peut être expliqué par la différence du système d'antioxydant présent chez chaque individu. Les MDA peuvent ne pas être les seuls présents dans le plasma donc la vitamine C et l'extrait présentant des propriétés de liaisons différentes peut mener à une affinité pour la liaison avec les molécules présentes dans l'extrait qu'avec la vitamine C.

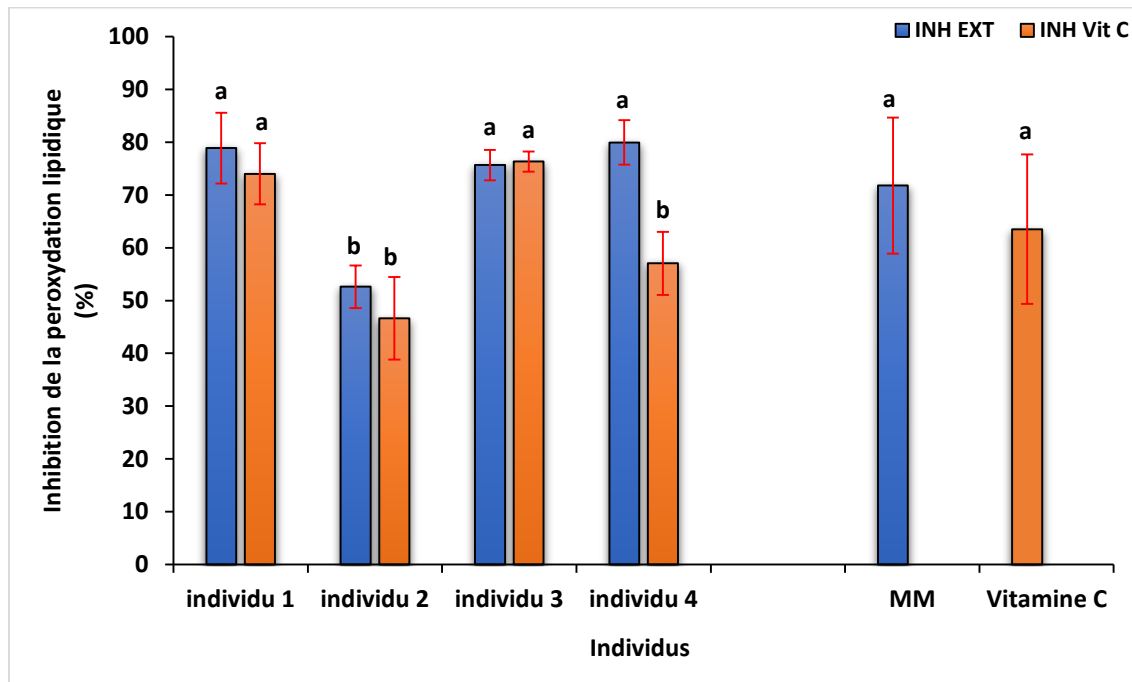


Figure 16 : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait final de pollen et la vitamine C.

INH EXT : inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait final optimisé de pollen.

INH Vit C : inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine C.

MM : moyenne des moyennes d'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait final optimisé de pollen.

Vitamine C : moyenne des moyennes d'inhibition de la peroxydation lipidique par la vitamine C.

III.4.2. Activité anti-hémolytique

La figure 17 explique l'activité anti-hémolytique de l'extrait de pollen et l'inhibiteur de référence qui a été l'aspirine en présence de la solution hypotonique. La suspension érythrocytaire traitée avec la solution hypotonique seule a provoquée 100 % d'hémolyse. Lorsque la suspension érythrocytaire a été traitée avec l'extrait seul (tampon isotonique), une très faible valeur d'hémolyse a été obtenue, ce qui explique le comportement non toxique de l'extrait de pollen sur les érythrocytes humains.

Il a été constaté que lorsque la suspension érythrocytaire a été traitée avec l'extrait et la solution hypotonique, une augmentation marquée de l'inhibition d'hémolyse a été observée chez les quatre individus par rapport à la suspension érythrocytaire traitée avec la solution hypotonique seule. Selon **Chakraborty et chah, (2011)**, cela peut être dû à l'activité de piégeage des radicaux libres des composés phénoliques présents dans l'extrait de pollen.

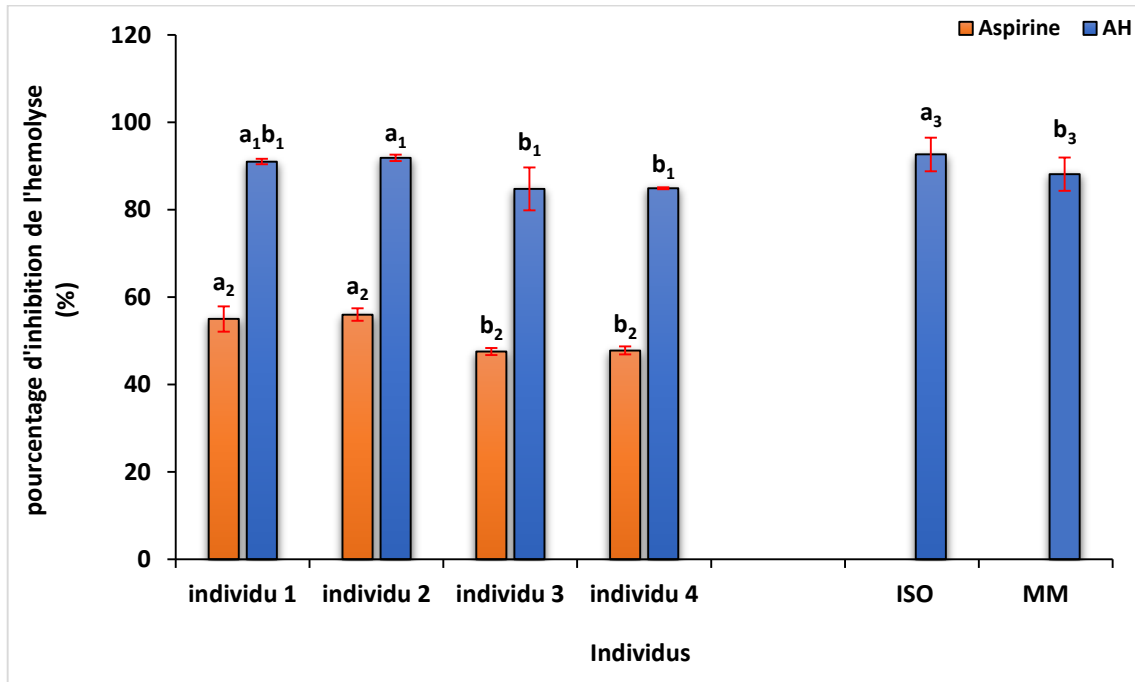


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition d'hémolyse par l'extrait final de pollen et l'aspirine.

ISO : tampon isotonique.

MM : moyenne des moyennes d'inhibition de d'hémolyse par l'extrait final optimisé de pollen.

AH : activité anti hémolytique.

Conclusion

Conclusion

L'analyse pollinique a montré que l'échantillon de pollen a été de type monofloral avec une prédominance d'un seul type de grains de pollen qui appartient à la famille des *Asteraceae*.

L'optimisation par la méthode séquentielle a montré que les meilleures conditions pour l'extraction des composés phénoliques du pollen ont été : la nature du solvant (Acétonitrile), concentration du solvant (75 %), ratio échantillon/solvant (1 g), température d'extraction (35° C) et temps d'extraction (180 min).

Les variables choisies pour MSR, la température et le temps ont montré un effet quadratique sur les composés phénoliques et l'activité antioxydante tandis que la concentration du solvant a révélé un effet linéaire sur les deux réponses. Les conditions optimales obtenues par la méthode des surfaces de réponse pour l'extraction des composés phénoliques ont été : le solvant d'extraction a été l'acétonitrile, la concentration du solvant a été de 90 %, la température d'extraction a été de 25° C et le temps d'extraction a été de 180 min. Les valeurs maximales obtenues pour les composés phénoliques et l'activité inhibitrice du radical DPPH ont été de 90,63 mg EAG/g et de 80,34 %, respectivement.

Le pollen d'abeille est connu par sa richesse en antioxydants et cela a été confirmé lors de l'optimisation. Les propriétés bioactives de l'extrait final optimisé ont été évaluées par deux tests : la peroxydation lipidique qui a montré son effets antioxydant avec un potentiel de 71,78 % d'inhibition de la peroxydation des lipides du sérum sanguin et l'activité anti-hémolytique qui a démontré que les extraits étudiés protègent les globules rouges de l'hémolyse, mais également l'hémoglobine de la dégradation avec un résultats très satisfaisant.

Des recherches plus approfondies sont requises pour examiner des conditions d'extraction plus adéquates dans l'intervalle de 90 à 100 % de concentration du solvant et pour établir les propriétés thérapeutiques (activité antibactérienne) de l'extrait d'acétonitrile du pollen d'abeille.

Références bibliographiques

A

Adaškevičiūtė, V., Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Barčauskaitė, K., Maruška, A. (2019). Comparison of Physicochemical Properties of Bee Pollen with Other Bee Products. *Biomolecules*, 9 (12), 819.

Anjos, O., Fernandes, R., Cardoso, S.M., Delgado, T., Farinha, N., Paula, V., Estevinho, L.M., Carpes, S.T. (2019). Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. *Food Science and Technology*, 111, 869–875.

Atanassova, J., Lazarova, M. (2010). Pollen analysis of bee pollen loads from the region of the town of shumen (ne bulgaria). *Bulgarian Academy of Sciences*, 63 (3), 369-374.

Azeredo, L. da C., Azeredo, M.A.A., de Souza, S.R., Dutra, V.M.L. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, 80, 249–254.

B

Baroth, J., Schoefs, F., Breysse, D. (2011). Fiabilité des ouvrages : Sûreté, variabilité, maintenance, sécurité. Lavoisier.

Bath, P.K., Singh, N. (1999). A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*, 67, 389–397.

Bey, M.B., Louaileche, H., Zemouri, S. (2013). Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity of light and dark dried fig (*Ficus carica* L.) varieties. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1613–1619.

Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., Kleszczyńska, H. (2011). Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*, 6, 58–67.

C

Campos, M.G.R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47, 154–161.

Chakraborty, D., Shah, B. (2011). Antimicrobial, anti-oxidative and anti-hemolytic activity of piper betel leaf extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 193-199.

Costa, C. M. D., dos Santos, R. C., & Lima, E. S. (2006). A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial*, 42, 345-350.

D

Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.

G

Goupy, J. (2006). Plans d'expériences. *Ed. Techniques Ingénieur*.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813–8826.

J

Jarlot-Chevaux, S., Dumond, P., Tscheiller, S., Pirson, F., Renaudin, J.M. (2022). Anaphylaxie alimentaire aux produits de la ruche : à propos de 32 cas déclarés au Réseau d'Allergo-Vigilance®. *Revue Française d'Allergologie*, 62, 158–165.

K

Khamtache-Abderrahim, S., Yahiaoui, S., Otmani, A., & Bachir-Bey, M. (2021). Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity from *Fumaria officinalis* L. using response surface methodology. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology*, 45(2), 117-133.

L

LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLuca, A., Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115, 1299–1305.

Louveaux, J. (1958). Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L). *Annales de l'Abeille*, 1, 113–188.

Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World* 59, 139–157.

Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., & Bíró, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 119-125.

M

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Allemand. C. J. Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne*, 2005.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577.

N

Naczk, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542.

Naithani, V., Nair, S., Kakkar, P. (2006). Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. *Food Research International*, 39, 176–181.

O

Ouchemoukh, S., Louaileche, H., Schweitzer, P. (2007). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. *Food Control*, 18, 52–58.

P

Prieu, C. (2015). Evolution et développement des grains de pollen chez les Angiospermes. (*Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (Communauté d'Universités et d'Etablissements)*).

S

Shinde, U.A., Phadke, A.S., Nair, A.M. (1999). Membrane stabilizing activity a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70, 251-257.

Silva, E., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381-387.

T

Thakur, M., Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82–106.

Thibault, M. (2017). Le pollen apicole : ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques (Doctoral dissertation, Université de Lorraine). *Sciences pharmaceutiques*.

Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13–30.

Y

Yahiaoui, S., Kati, D.E., Bachir-bey, M., Otmani, A., El Cheikh, K., Morere, A., Menut, C., Nadir Bettache, N., Chaalal, M. (2022). The Change of Nutrient Components Contained in the Acerola Fruit (*Malpighia emarginata*) Cultivated in Okinawa, Japan. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science*, 60 (2), 1-14.

Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., Sun, P. (2013). Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *J. Agric. Food Chemistry*, 61, 708–718.

Z

Zarzycki, P. K., Zarzycka, M. B., Ślaczka, M. M., & Clifton, V. L. (2010). Acetonitrile, the polarity chameleon. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(3), 905-908.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau I : préparation des solutions utilisées.

Solution	Préparation
Solution de Bradford	Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G250 dans 50 ml de l'éthanol et ajouter 100 ml de H ₃ PO ₄ . Après homogénéisation, la solution est ajustée à 1000 ml avec l'eau distillée.
Solution de DPPH (6*10⁻⁵ M)	Une quantité de 0,024g de la poudre de DPPH est dissoute dans 10 ml. Après homogénéisation, Un volume de 1 ml de la solution mère est dilué dans 100 ml d'éthanol pour avoir une concentration de 6*10 ⁻⁵ M.
Solvants d'extraction	Les 5 solvants (Ethanol, Méthanol, Acétone, 2-Butanol, Acétonitrile) sont préparés à une dilution de 50 % avec l'eau distillée en suivant la table de Gay-Lussac.
Solution stock de TBA	Un volume de 2 ml d'acide chlorhydrique est dilué dans 100 ml d'eau distillée. Solution TBA : 15 % d'acide Trichloracétique (TCA) + 100 ml de la solution HCl préparée + 0,375 % d'acide thiobarbiturique (TBA).
Solution de tampon phosphate, isotonique et hypotonique	- Acide : une quantité de 0,008g de KH ₂ PO ₄ est dissoute dans 100 ml d'eau distillée. - Base : une quantité de 0,0482 g de Na ₂ HPO ₄ est dissoute dans 100 ml d'eau distillé. - Solution isotonique : 50 ml de la solution de Na ₂ HPO ₄ + 50 ml de Solution de KH ₂ PO ₄ + 0,9 g de NaCl. - Solution hypotonique : 50 ml de la solution Na ₂ HPO ₄ + 50 ml de la solution de KH ₂ PO ₄ + 0,29 g de NaCl.

Annexe 2

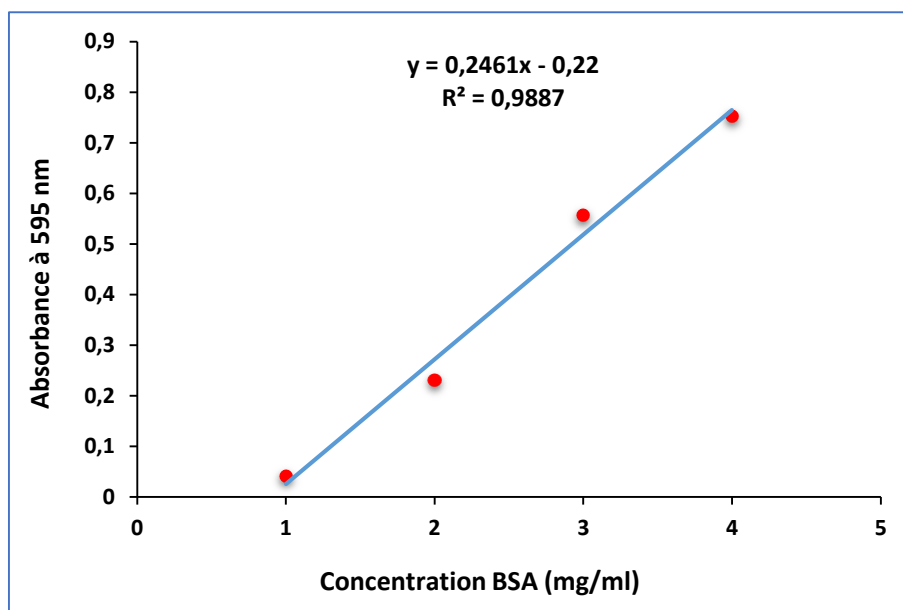


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des protéines.

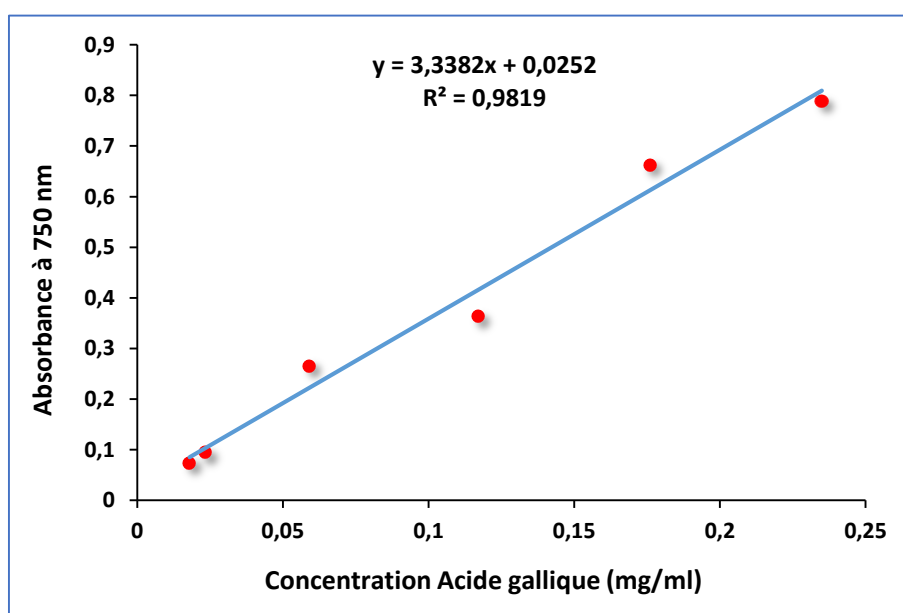


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux.

Annexe 3

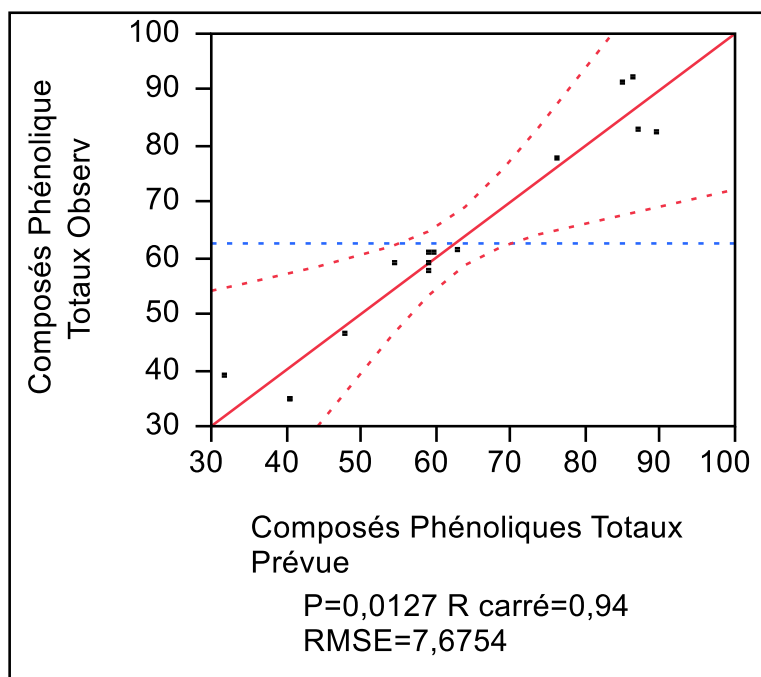


Figure 3 : Corrélation des valeurs observées des composés phénoliques totaux en fonction des valeurs prévues.

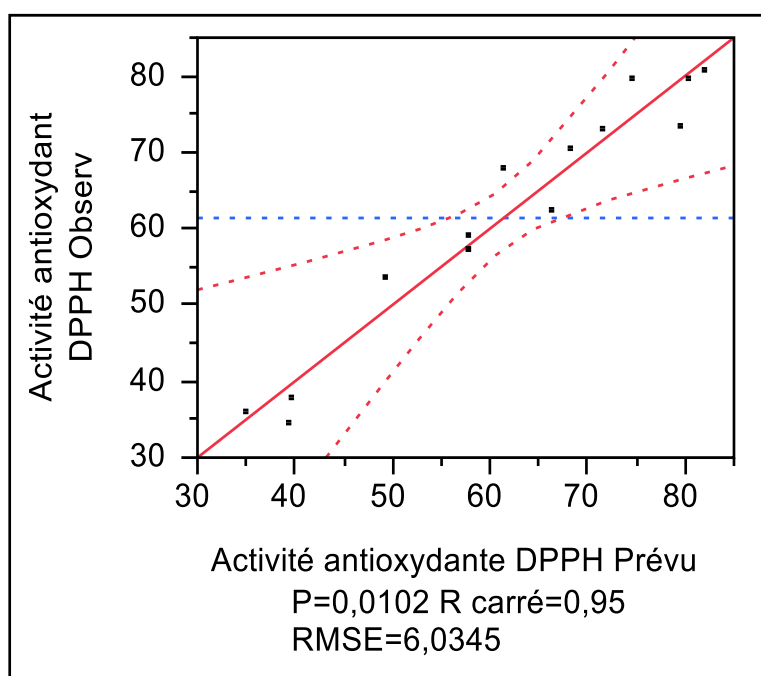


Figure 4 : Corrélation des valeurs observées de l'activité antioxydante en fonction des valeurs prévues.

Annexe 4

Tableau II : Estimation des paramètres des modèles pour les composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante.

Composés phénoliques totaux				
Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante	59,11	4,431405	13,34	<,0001*
X ₁	22,61125	2,71367	8,33	0,0004*
X ₂	-6,28	2,71367	-2,31	0,0685
X ₃	-0,37125	2,71367	-0,14	0,8965
X ₁ *X ₂	5,0125	3,837709	1,31	0,2484
X ₁ *X ₃	-0,285	3,837709	-0,07	0,9437
X ₂ *X ₃	7,8625	3,837709	2,05	0,0958
X ₁ ²	4,0375	3,994415	1,01	0,3585
X ₂ ²	2,515	3,994415	0,63	0,5566
X ₃ ²	-0,0225	3,994415	-0,01	0,9957
Activité antioxydante (DPPH)				
Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante	57,793333	3,484027	16,59	<,0001*
X ₁	15,91625	2,133522	7,46	0,0007*
X ₂	-6,8475	2,133522	-3,21	0,0237*
X ₃	1,68625	2,133522	0,79	0,4651
X ₁ *X ₂	6,38	3,017256	2,11	0,0881
X ₁ *X ₃	1,4825	3,017256	0,49	0,6440
X ₂ *X ₃	9,44	3,017256	3,13	0,0260*
X ₁ ²	-2,817917	3,140459	-0,90	0,4107
X ₂ ²	9,0845833	3,140459	2,89	0,0341*
X ₃ ²	0,4620833	3,140459	0,15	0,8888

Résumé

Le pollen d'abeille est l'un des produits de la ruche qui présente des propriétés antioxydantes. Dans ce contexte, une étude est menée sur un échantillon de pollen afin d'optimiser l'extraction des composés phénoliques. Pour ce fait, la méthode séquentielle et la méthode des surfaces de réponse sont utilisées. Des activités biologiques (peroxydation lipidique et anti-hémolytique) sont évaluées pour l'extrait final. Les résultats obtenus révèlent que le pollen analysé est monofloral et sa teneur en protéines est de 27 305,98 mg EBSA/100 g. Les résultats de l'optimisation par la méthode séquentielle ont montré que l'acétonitrile 75 %, le ratio de 1 g de pollen, la température d'extraction de 35° C et le temps d'extraction de 180 min représentant les meilleures conditions d'extraction des composés phénoliques. L'analyse des données avec la méthode des surfaces de réponse suggère que les conditions optimales d'extraction sont : l'acétonitrile 90 %, température d'extraction de 25° C et temps d'extraction 180 min. Les valeurs maximales obtenues par ce modèle sont de 90,63 mg EAG/g pour les composés phénoliques et de 80,34 % pour l'activité anti-radicalaire DPPH. Les résultats des activités biologiques montrent que la capacité inhibitrice de la peroxydation lipidique et le pouvoir anti-hémolytique de l'extrait de pollen.

Mots clés : Pollen d'abeille, méthode séquentielle, méthode des surfaces de réponse, composés phénoliques, peroxydation lipidique, activité anti-hémolytique.

Abstract

Bee pollen is one of the products of the beehive, which presents antioxidant properties. In this context, a study is conducted on a pollen sample in order to optimize the extraction of phenolic compounds. For this purpose, the sequential method and the response surface method are used. Biological activities (lipid peroxidation and anti-hemolytic) are evaluated for the final extract. The results obtained reveal that the analyzed pollen is monofloral and its protein content is 27,305.98 mg EBSA/100 g. The results of the optimization with the sequential method showed that acetonitrile 75 %, the ratio of 1g of pollen, the extraction temperature of 35° C and the extraction time of 180 min representing the best conditions for extraction of phenolic compounds. Analysis of the data with the response surface method suggests that the optimal extraction conditions are: acetonitrile 90 %, extraction temperature of 25° C and extraction time 180 min. The maximum values obtained by this model are 90.63 mg EAG/g for phenolic compounds and 80.34 % for DPPH radical scavenging activity. The results of the biological activities show the lipid peroxidation inhibitory capacity and the anti-hemolytic power of the pollen extract.

Key words: Bee pollen, signal-factor method, response surface methodology, phenolic compounds, lipid peroxidation, anti-hemolytic activity.

ملخص

حبوب لقاح النحل هي واحدة من منتجات الخلية التي تعرض خصائص مضادة للأوكسدة. في هذا السياق، يتم إجراء دراسة على عينة من حبوب اللقاح من أجل تحسين استخلاص المركبات الفينولية. لهذا، تم استخدام الطريقة المتسلسلة وطريقة سطح الاستجابة، ويتم تقييم الأنشطة البيولوجية (بيروكسيد الدهون ومضادات انحلال الدم) للمستخلص النهائي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن حبوب اللقاح التي تم تحليلها أحادية الزهرة ومحتواها من البروتين هو 27305.98 mg EBSA/100 g. أظهرت نتائج التحسين بالطريقة المتسلسلة أن 75 % أسيتونيترييل ونسبة 1 جرام من حبوب اللقاح ودرجة حرارة الاستخلاص 35 درجة مئوية ووقت الاستخلاص 180 دقيقة تمثل أفضل ظروف استخلاص المركبات الفينولية. يشير تحليل البيانات باستخدام طريقة سطح الاستجابة إلى أن ظروف الاستخراج المثلى هي: 90 % أسيتونيترييل، ودرجة حرارة الاستخراج 25 درجة مئوية ووقت الاستخراج 180 دقيقة. القيم القصوى التي حصل عليها هذا النموذج هي 90.63 mg EBSA/g للمركبات الفينولية و80.34 % للنشاط المضاد للجذور DPPH. أظهرت نتائج الأنشطة البيولوجية القدرة المثبطة لبيروكسيد الدهون والقوة المضادة لانحلال الدم لمستخلص حبوب اللقاح.

الكلمات المفتاحية: حبوب لقاح النحل، الطريقة المتسلسلة، طريقة سطح الاستجابة، المركبات الفينولية، بيروكسيد الدهون، النشاط المضاد لانحلال الدم.