

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Spécialité Biochimie Fondamentale



Réf :

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Étude comparative de quelques
méthodes d'extraction de molécules
bioactives du pollen.**

Présenté par :

HADDOUM Djouhra

FERHOUNE Djida

Soutenu le : 24 juin 2024

Devant le jury composé de :

Mme BEDJOU F

Mr ZAIDI H

Mme DJAOUD K

Mme AYOUNI K

Pr

MCB

MCB

MCB

Présidente

Encadrant

Co-encadrant

Examinatrice

Année universitaire : 2023 / 2024

REMERCIEMENTS

*La louange entière est à Allah qui nous a donné la force et la patience
d'accomplir ce travail qui est le fruit de notre vie éducative.*

*Nous tenons spécialement adresser toute nos gratitude à notre
encadrant, “**Mr ZAIDI H**” pour sa patience, sa disponibilité et
surtout ses judicieux conseils durant toute la période du travail et
sans oublier notre co-encadrant “**Mme DJAOUD K**” qui nous a
assistée.*

*Nous tenons à remercier “**Mr Otmani A**” spécialement pour nous avoir
assisté et aidé durant les tests microbiologiques, ainsi les membres de
juré Professeur “**Mme. Bedjou F**” également Mme. “**Ayouni K**” Pour
d'avoir acceptée d'évaluer notre travail.*

*Nous remercions également l'ensemble des enseignants de la faculté
des sciences de la nature et de la vie.*

*Un grand merci à nos familles pour leur amour et leur soutien
constant.*

*Enfin, à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la
réalisation de ce projet de fin d'étude.*

DEDICACE

La louange entière est à Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie particulièrement : A ma très chère MAMAN, symbole de la bonté et de la générosité. Aucune dédicace ne peut être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis Ma naissance. A Mon très cher père pour ces sacrifices et son soutien tout au long de ma vie. Mes frères : Koussila, Iyès Tahar, Hamou. Mes sœurs : Mira, Zahira sa famille, Lila sa famille, Nora sa famille, à qui je souhaite une vie pleine de bonheur, de santé et de réussite. À ceux qui m'ont soutenu, m'ont beaucoup encouragé et ont soulagé mes difficultés, mon fiancé Mohamed et toute sa famille. Aussi à toutes mes amies, et en particulier à Manel, Rima, Rokia et mon binôme Djida, avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de travailler pour achever mon cycle de master.



HADDOUN Djouhra

DEDICACE

Je dédie ce travail À mes chers parents qui n'ont jamais hésité à m'épauler, me soutenir, m'encourager et se sacrifier pour moi, et qui ont toujours prié pour moi. Votre présence à mes côtés est la source de ma force. Aucune expression de gratitude et de reconnaissance ne pourra jamais vous rendre justice. À mes chers frères Nassim, Halim, Walid, Djalal et Zakari, toujours présents pour moi, merci pour tout. Je vous souhaite tout le succès dans votre vie. À mes adorables sœurs Wissam, Faiza et Ibtissam, qui n'ont jamais arrêté de m'apporter leur soutien. À ma grand-mère, que la miséricorde de Dieu soit sur elle, et à mon grand-père, que Dieu lui accorde une longue vie. À toutes mes tantes, mes cousins et cousines. À toute ma famille et toutes mes amies. A mon binôme Djouhra et toute sa famille.



FERHOUME Djida

Table de matière

Table de matière.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux :	
Introduction	1
I. Synthèse bibliographique.....	2
I.1. La palynologie.....	2
I.2. La plante mellifère.....	2
I.2.1. Catégories des plantes mellifères.....	3
I.2.2. Les principales plantes mellifères en Algérie :	4
I.3. Définition du pollen	4
I.4. Structure du pollen :	4
I.5. Méthodes de récolte de pollen :	5
I.5.1. Collecte manuelle	6
I.5.2. Les trappes à pollen	6
I.6. Composition Phytochimiques du pollen.....	8
I.7. Quelques propriétés nutritionnelles du pollen	9
I.8. Quelques propriétés thérapeutiques du pollen	9
I.9. Quelques méthodes d'extraction des molécules bioactives.....	10
I.9.1. Extraction par solvant	10
I.9.2. Extraction par Soxhlet :	11
I.9.3. Extraction par macération :	11
I.9.4. Extraction par agitation :	11
I.9.5. Extraction par ultrasons :	11
I.9.6. Extraction par micro-ondes :	12
I.9.7. Extraction par CO2 supercritique :	12
II. Matériel et méthodes :	13
II.2. Protocoles d'extraction	14
II.2.1. Préparation d'extrait éthanolique de pollen par agitation.....	14
II.2.2. Préparation d'extrait éthanolique de pollen assisté par ultrason :	14
II.3. Dosage.....	15
II.4. Dosage des antioxydants	15
II.4.1. Dosage des composés phénoliques totaux.....	15
II.5. L'activité antioxydante des extraits.....	16

II.5.1. Pouvoir réducteur	16
II.5.2. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	16
II.5.3. Activité anti radicalaire DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	17
II.5.4. Test ABTS	17
II.6. Test d'activité antibactérienne	18
II.6.1. Protocole de préparation des extraits par l'évaporateur rotatif	18
a. Préparation du gélose Mueller Hinton	19
b. Protocole de Coulage des Boîtes de Pétri.....	19
c. Test de sensibilité.....	19
<i>I.1.1. Résultats et Discussion :</i>	21
<i>III.1. Dosage des Protéines :</i>	21
<i>III.2. Dosages des antioxydants :</i>	22
<i>III.2.1. Dosage des polyphénols totaux :</i>	22
III.3. L'activité antioxydante des extraits.....	24
III.3.1. Pouvoir réducteur :.....	24
III.3.2. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :.....	25
III.3.3. Activité anti radicalaire DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	26
III.3.4. Test ABTS	28
III.4. Test d'activité antibactérienne	29
III.4.1. Test antibactérien sur <i>Escherichia coli</i>	29
III.4.2. Test antibactérien sur <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Conclusion.....	32
<i>Références bibliographiques :</i>	33
<i>Annexes 1 :</i>	
<i>Annexe 2 :</i>	
<i>Résumé :</i>	

Liste des abréviations

ABTS : 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium.

AG : Acide Gallique.

AGNE : Acide gras non estérifié

ALA : Acide α -Linoléinique

ATCC : American Type Culture Collection.

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute.

Fc ϵ RI : Récepteur Fc epsilon pour l'immunoglobuline.

FRAP : le pouvoir antioxydant réducteur du fer.

IgE : Immunoglobuline E

MH : Mueller-Hinton.

M1 : Extraction par agitation.

M2 : Extraction par ultrasonication.

NF- κ B : Facteur Nucléaire Kappa des cellules B activées

ROS : Reactive Oxygen Species.

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale Alpha

TPTZ : 2,4,6-tripyridyl-1,3,5-striazine.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Éléments constitutifs d'une fleur d'Hélianthème des Apennins (Helianthemum apenninum, Cistacées).	2
Figure 02	Guides nectarifères incitant les insectes pollinisateurs à se diriger vers le pollen et/ou les nectaires.	3
Figure 03	La structure générale d'un grain de pollen.	5
Figure 04	Morphologie générale de l'abeille.	5
Figure 05	Trappes à tiroir frontal.	6
Figure 06	Trappes à pollen de fond.	7
Figure 07	Trappes à glissières en plastique.	7
Figure 08	Propriétés thérapeutiques potentielles du pollen d'abeille.	10
Figure 09	Photographie des échantillons du pollen d'abeille.	14
Figure 10	Photographie des extraits obtenu par agitation.	15
Figure 11	Photographie de l'Agitation du Pollen sur la Plaque agitatrice.	15
Figure 12	Photographie des extraits obtenu par ultrasonication.	15

Figure 13	Photographie de l'Extraction Ultrasonique sur le Pollen.	15
Figure 14	Photographie de la préparation de l'extrait par l'évaporateur rotatif.	20
Figure 15	La teneur en protéines des échantillons de pollen.	22
Figure 16	La teneur en composés phénolique dans les échantillons de pollen.	23
Figure 17	Valeurs de pouvoir réducteur des extraits de pollen.	25
Figure 18	Pouvoir Antioxydant de Réduction du Fer.	26
Figure 19	Les valeurs de l'activité antiradicalaire DPPH.	27
Figure 20	Les valeurs de l'activité antiradicalaire ABTS.	30
Figure 21	Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur E.Coli.	31
Figure 22	Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur S.aureus.	32

Liste des tableaux :

N° tableau	Titre	Page
Le tableau I	Composition phytochimique du pollen de différentes sources végétales.	8
Tableau II	Les régions de collecte des échantillons de pollen.	14
Tableau III	Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur E.Coli.	29
Tableau IV	Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur S.aureus.	31

Introduction

Introduction

Le pollen, produit essentiel des plantes à fleurs, regorge de composés bioactifs tels que les antioxydants et les agents antibactériens, **(Guenaoui et al., 2024)**, Ces molécules présentent un intérêt croissant dans divers secteurs, de l'alimentation à la médecine en passant par la cosmétique, en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la santé. Cependant, la récupération efficace de ces composés dépend largement de la méthode d'extraction utilisée, ainsi que des conditions environnementales et géographiques. **(Otmani et al., 2022)**

Dans cette étude, nous avons entrepris une comparaison détaillée de deux méthodes d'extraction de molécules bioactives du pollen, en mettant en lumière sur la teneur en antioxydants et les propriétés des extraits obtenus, afin de mieux comprendre les possibilités d'exploitation de ces précieux composés pour diverses applications.

Cette étude vise à analyser les variations de composition et d'activité biologique des extraits de pollen obtenus par différentes méthodes d'extraction, en tenant compte des régions géographiques de récolte.

L'objectif est de déterminer quelle méthode d'extraction est la plus efficace pour obtenir des extraits riches en composés bioactifs et comment les variations des paramètres d'extraction peuvent influencer les résultats.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. La palynologie

La palynologie est l'étude des grains de pollen et des spores, vivants et fossiles (Erdtman, 2023). Ces grains sont produits par les organes mâles des plantes et transportés vers les structures femelles pour la fécondation. Cette discipline a de nombreuses applications : elle permet d'identifier l'origine florale du miel (méliissopalynologie), d'étudier les écosystèmes préhistoriques (paléontologie), de comprendre les allergies respiratoires (allergologie), d'analyser des structures et sédiments souterrains (géologie), et d'aider dans les enquêtes judiciaires (criminologie) (Erdtman, 2023; Özkök, 2023). La palynologie aide également à expliquer les relations phylogénétiques entre fossiles et espèces contemporaines, à comprendre les causes de mortalités massives d'abeilles, et à étudier la biodiversité des zones visitées par les abeilles, ce qui est utile pour l'apiculture (Gastaldi et al., 2020).

I.2. La plante mellifère

La flore mellifère (Figure 01) englobe toutes les plantes d'une région qui sont essentielles à la production de miel, principalement en produisant du nectar (Melin, 2011) Elle inclut également les plantes visitées par les abeilles (Hamel et Boulemtafes, 2017), notamment celles qui produisent du pollen et du miellat (Rasoloarijao et al., 2019).

Les plantes mellifères les plus importantes sont celles qui ont une productivité nectarifère élevée et régulière, existent en vastes peuplements et donnent un miel de très bonne qualité (Louveaux, 1970).



Figure 1 : Éléments constitutifs d'une fleur d'Helianthemum des Apennins (*Helianthemum apenninum*, Cistacées) (Delsinne, 2023).

I.2.1. Catégories des plantes mellifères

Les plantes mellifères (Figure 02) sont classées en trois catégories en fonction de leur attrait pour les abeilles et de leur utilisation par celles-ci :

Les plantes mixtes : Ces plantes sont visitées par les abeilles pour leur nectar et leur pollen. Elles sont souvent caractérisées par des fleurs attrayantes pour les abeilles. Les arbres fruitiers, tels que l'abricotier, le pommier, le poirier et le prunier, font partie de cette catégorie. Elles fournissent aux abeilles à la fois des glucides (du nectar) et des protéines (du pollen), essentiels à leur nutrition (Ahouandjinou et al., 2017; Rabiet, 1984).

Les plantes nectarifères : Ces plantes se distinguent par leur production de nectar, une substance sucrée qui constitue la principale source de glucides pour les abeilles. Le nectar est sécrété par des organes spéciaux appelés nectaires, souvent situés au fond des fleurs (Rabiet, 1984; Yédomonhan et al., 2006).

Les plantes pollinifères : Ces plantes sont visitées par les abeilles principalement pour leur pollen. Le pollen est une source importante de protéines, de lipides, de vitamines et de minéraux pour les abeilles. Des exemples de plantes pollinifères incluent les coquelicots et les hélianthèmes (Coulibaly et al., 2019; Rabiet, 1984).



Figure 02 : Guides nectarifères incitant les insectes pollinisateurs à se diriger vers le pollen et/ou les nectaires (et les organes reproducteurs !) situés au centre de la fleur. (A) *Lilium martagon* (Liliacées). (B) *Digitalis purpurea* (Plantaginacées) visitée par un bourdon. (C) *Oxalis acetosella* (Oxalidacées). (D) Astéracée ornementale, *Coreopsis tinctoria*. (F-G) *Viola* sp. (Violacées). (H) Primevère ornementale (*Primula* sp., Primulacées). (E) *Adonis aestivalis* (Renonculacées). (I) Ruine de Rome, *Cymbalaria muralis* (Plantaginacées). (Delsinne, 2023)

I.2.2. Les principales plantes mellifères en Algérie :

Dans le sud-ouest de l'Algérie, une étude a identifié 66 espèces de plantes mellifères parmi 582 espèces en floraison, ces plantes, principalement spontanées et cultivées, appartenaient majoritairement aux familles des Fabacées, Astéracées et Lamiacées. Les abeilles récoltaient surtout le pollen et le nectar (**Laallam et al., 2011**). Parallèlement, une recherche dans le nord de l'Algérie a listé 107 espèces mellifères. Ces travaux soulignent l'importance de la protection de ces habitats pour une production de miel optimale et la santé des abeilles. Ils mettent en lumière la diversité et la valeur des plantes mellifères en Algérie (**Tarek et Boulemtafes, 2017**).

I.3. Définition du pollen

Le pollen est l'élément reproducteur mâle des plantes à fleurs, présent sous forme de grains microscopiques contenus dans les anthères des étamines (**Scott et al., 2004**). L'identification des grains de pollen repose sur leur examen microscopique, où des caractéristiques telles que la couleur, la forme, la taille et les pores permettent de les différencier (**Andersen et Bertelsen, 1972**). Chaque grain de pollen est enveloppé dans une couche résistante, renfermant des substances essentielles à l'alimentation des larves et des jeunes abeilles (**Luo et al., 2015**). Cette enveloppe présente une forme caractéristique propre à chaque espèce végétale, ce qui permet de déterminer l'origine botanique d'un miel (**Bryant Jr. et Jones, 2001**).

I.4. Structure du pollen :

Un grain de pollen est une structure microscopique qui protège le matériel génétique sensible jusqu'à ce qu'il soit reçu par les structures reproductrices femelle (figure 03), (**Aylanc et al., 2023; Luo et al., 2015**) et il est généralement composé d'un contenu cytoplasmique qui contient le matériel génétique, d'une intine qui est la couche interne faite de cellulose et de pectine, et d'une exine, la couche externe faite de sporopollenin, une substance très résistante aux dégradations chimiques et biologiques. Enfin, le pollenkitt est une substance collante sur la surface externe qui aide à l'adhérence sur les insectes pollinisateurs (**Aylanc et al., 2023**).

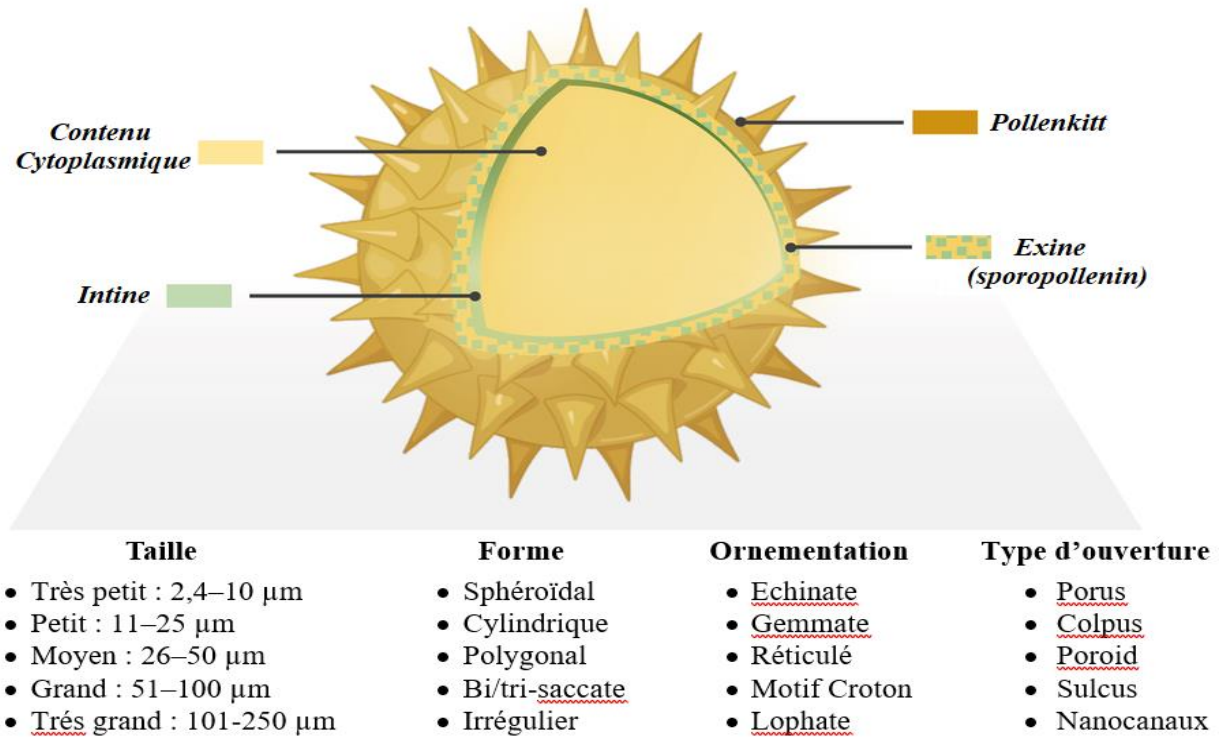


Figure 03 : La structure générale d'un grain de pollen (d'*Helianthus*) et ces principaux constituants et certaines des caractéristiques morphologiques répandues dans diverses espèces dans la nature. (Aylanc et al., 2023)

I.5. Méthodes de récolte de pollen :

La récolte du pollen par l'homme, facilitée par l'abeille et les trappes à pollen, est une activité relativement récente. Les premières trappes à pollen, conçues en Amérique, étaient à l'origine utilisées uniquement par les chercheurs et non par les apiculteurs. Ces derniers, se basant sur les recherches concernant la consommation de pollen par les abeilles (figure 04), ont parfois récolté du pollen pour compléter l'alimentation des ruches déficientes (Lavie et Fresnaye, 1963).

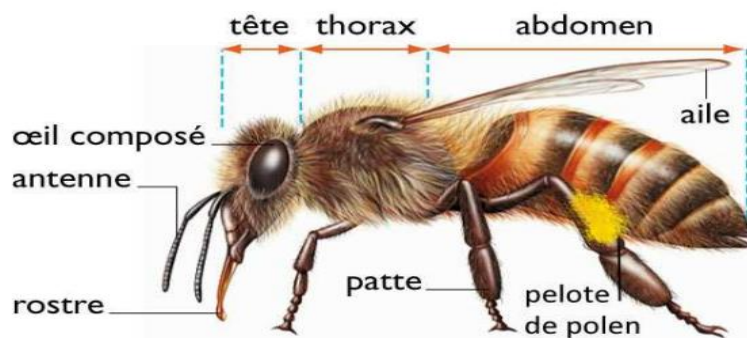


Figure 04 : Morphologie générale de l'abeille. (Djebbar et Ounadi, 2017)

Différentes méthodes de collecte peuvent être adoptées selon l'objectif à atteindre parmi elles on cite :

I.5.1. Collecte manuelle

La récolte manuelle du pollen est une méthode simple et peu coûteuse qui consiste à collecter le pollen directement à partir des fleurs à l'aide de peignes spéciaux ou de brosses douces. Cette méthode est souvent privilégiée par les petits apiculteurs car elle permet de collecter du pollen frais sans perturber excessivement les abeilles. Cependant, elle peut être moins efficace pour obtenir de grandes quantités de pollen par rapport à d'autres méthodes plus spécialisées (Žilić et al., 2014).

I.5.2. Les trappes à pollen

Les apiculteurs utilisent plusieurs types de trappes à pollen pour collecter les pelotes rapportées par les abeilles, tout en veillant à ne pas nuire au développement des colonies. Une ruche nécessite entre 20 et 50 kg de pollen par an, sa principale source de protéines. Les apiculteurs ne prélèvent qu'environ 10% de cette quantité (2 à 5 kg) pour ne pas perturber les abeilles. Les trappes à pollen, placées à l'entrée des ruches, détachent les pelotes des abeilles en les forçant à passer à travers des grilles avec des mailles d'environ 4,5 mm de diamètre (Gharbi, 2011). Voici les types de trappes à pollen évaluées :

I. Trappes à tiroir frontal : Montées à l'entrée des ruches, avec des mailles de 4,7 à 5 mm de diamètre. (Mohamed et al., 2022)



Figure 05 : Trappes à tiroir frontal (Mohamed et al., 2022).

II. Trappes à pollen de fond : Installées sous les disques des pores des ruches sur le fond de la planche, avec des mailles de 4,6 mm de diamètre.



Figure 06 : Trappes à pollen de fond (Mohamed et al., 2022).

III. Trappes à glissières en plastique : Fabriquées en plastique avec des pores de 4 à 5 mm de diamètre, similaires à un séparateur de reine placé à l'entrée de la ruche.



Figure 07 : Trappes à glissières en plastique (Mohamed et al., 2022).

Les mailles des trappes sont conçues pour être suffisamment larges pour permettre le passage des abeilles, mais assez étroites pour détacher les pelotes de pollen. Un tiroir sous la trappe recueille les pelotes, tandis qu'un tamis de 3 mm empêche les abeilles de récupérer leur pollen. L'efficacité des trappes se mesure par le pourcentage de pelotes collectées par rapport au nombre total de pelotes ayant traversé la trappe, avec une efficacité idéale de 10% (Gharbi, 2011).

I.6. Composition Phytochimiques du pollen

Le pollen est un complément alimentaire riche en composés bioactifs, sa composition exacte et ses effets sur la santé sont encore à l'étude (Ares et al., 2017).

Le tableau I : composition phytochimique du pollen de différentes sources végétales :

Nutriment (100g)	Ciste	Châtaignier	Saule	Bruyère	Coquelicot
Calories (Cal)	354	316	354	319	316
Protéines (g)	14,2	19,56	15,5	15,5	22,8
Lipides (g)	6,56	4,19	5,8	3,26	3,26
Acide Linoléique (g)	0,7	0,31	0,31	0,13	0,31
Acide Alpha-Linolénique (g)	0,52	0,15	0,33	0,55	0,55
Glucides (g)	52,17	46,77	64,5	48,66	40,97
Fibres (g)	12,80	14,4	14,4	13,0	9,2
Vitamine B1 (mg)	0,80	0,52	1,01	0,38	0,47
Vitamine B2 (mg)	0,76	1,17	0,86	0,86	0,36
Vitamine B3 (mg)	4,60	6,7	7,1	4,79	2,27
Vitamine B5 (mg)	0,86	1,24	0,9	0,9	1,45
Vitamine B6 (mg)	0,27	0,29	0,30	0,25	0,04
Vitamine B9 (mg)	124	371	844	128	157
Vitamine C (mg)	14,2	14,3	29,8	20,2	67,1
Vitamine E (mg)	27,8	4,2	11,8	9,28	1,44
Cuivre (mg)	0,68	0,61	0,85	0,63	0,63
Magnésium (mg)	26,5	50,1	71,4	60,1	41,3
Phosphore (mg)	200,1	337,5	566	279,9	448
Zinc (mg)	2,26	6,47	4,7	3,2	4,41
Potassium (mg)	370	504	484	433	433
Sodium (mg)	26	31	31	31	24
Polyphénols (mg/)	1959	2086	1500	1788	1420
ORAC (mmoles/g)	536	406	199	379	283
Kaempférol-3.0-glucos.	61,9	575	48,3	648,3	-
Isorhamnétine-3.0-glucos.	282	158	7,1	37,1	-
Rutine	-	335	1207	239	-
Lutéoline-7-glucoside	13,9	6,6	30,7	175	-
Phytostérols (mg)	232	191	-	-	-

I.7. Quelques propriétés nutritionnelles du pollen

Le pollen est un aliment très nutritif et complet, souvent décrit comme la poussière qui donne la vie, et il est considéré comme le seul aliment parfaitement complet. (Nicolson, 2011) Voici un résumé de sa valeur nutritionnelle :

Glucides : Le pollen contient des glucides tels que le fructose, le glucose, le saccharose et les fibres, qui fournissent de l'énergie et sont essentiels pour le fonctionnement du cerveau (Bogdanov, 2012).

Protéines et acides aminés : Le pollen est une source importante de protéines et contient tous les acides aminés essentiels nécessaires à la croissance et à la réparation des tissus corporels (Nicolson, 2011).

Graisses : Le pollen contient également des graisses, qui fournissent de l'énergie et sont nécessaires pour certaines fonctions corporelles, comme l'absorption des vitamines liposolubles (Bogdanov, 2012; Chau et Rehan, 2024).

Fibres brutes : Le pollen est une bonne source de fibres brutes, qui favorisent la digestion et sont essentielles pour une alimentation équilibrée (Bogdanov, 2012).

Acides gras non estérifiés (AGNE) et acides aminés (AA) : Le contenu en AGNE et en AA du pollen varie selon les familles et les genres, mais il est riche en acides gras essentiels oméga-6 et oméga-3 ainsi qu'en acides aminés essentiels (Chau et Rehan, 2024).

Ratios P:L et oméga-6:3 : Les ratios protéines-lipides varient considérablement, mais les ratios oméga-6:3 sont généralement inférieurs à un, ce qui est bénéfique (Chau et Rehan, 2024).

Il est important de noter que la composition nutritionnelle du pollen peut varier en fonction de son origine botanique. Une analyse chimique spécifique du pollen est donc nécessaire pour obtenir une image précise de sa valeur nutritionnelle (Nicolson, 2011).

I.8. Quelques propriétés thérapeutiques du pollen

Le pollen est un aliment souvent sous-estimé, mais ses effets bénéfiques sur la santé sont impressionnants, bien qu'il possède des propriétés anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes, hépatoprotectrices, anti-athérosclérotiques, et immuno-modulatrices, toutefois Les polyphénols et les flavonoïdes présents dans le pollen jouent un rôle clé dans ces effets en inhibant l'inflammation, en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses, en luttant contre les infections bactériennes et fongiques, en protégeant le foie contre les toxines, en réduisant le taux de lipides sanguins et en renforçant le système immunitaire (Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016).

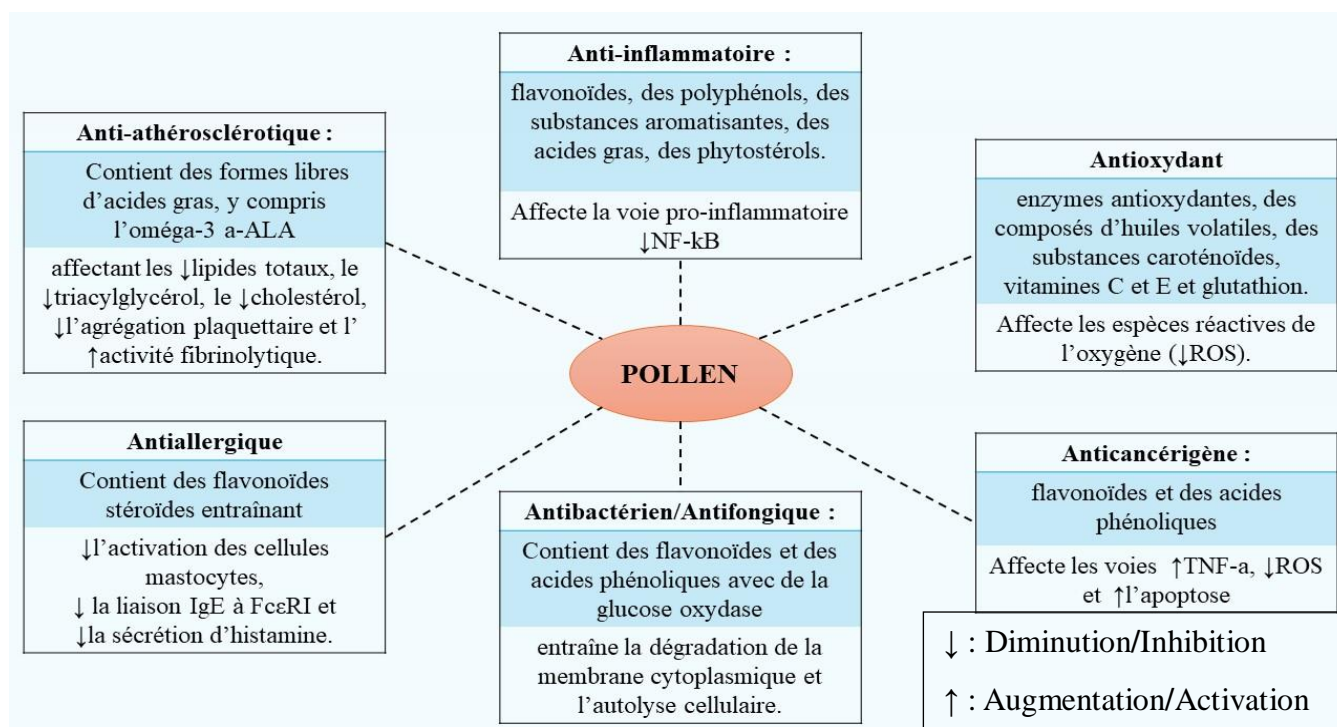


Figure 8: Propriétés thérapeutiques potentielles du pollen (Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016).

I.9. Quelques méthodes d'extraction des molécules bioactives

I.9.1. Extraction par solvant

L'extraction par solvant, aussi appelée extraction liquide-liquide, implique le transfert de composés d'une phase liquide à une autre phase liquide non miscible, elle est utilisée pour isoler des composés d'une substance en exploitant leur différence de solubilité entre le solvant et la substance d'origine (Abe et al., 2010).

Le principe de l'extraction par solvant repose sur trois facteurs clés :

- **La miscibilité des liquides** : Certains liquides, comme l'huile et l'eau, ne se mélangent pas même après agitation. Ainsi, il est essentiel de connaître la densité des deux liquides pour une extraction liquide-liquide. (Abe et al., 2010; Boukhatem et al., 2019)

- **La solubilité des espèces chimiques** : Les solutés présentent une capacité variable à se dissoudre dans un solvant. Si la quantité de soluté dépasse la capacité de dissolution du solvant, une solution saturée se forme. (Abe, Delyle et Alvarez, 2010)

- **Le choix du solvant d'extraction** : Le solvant choisi doit être liquide à la température et à la pression de l'extraction, non miscible avec l'eau, et l'espèce à extraire doit être plus soluble dans le solvant que dans l'eau (Abe et al., 2010). Les solvants les plus couramment utilisés sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, et parfois le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant sélectionné doit être autorisé et présenter une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène (Fine et al., 2013).

I.9.2. Extraction par Soxhlet :

La méthode Soxhlet, inventée en 1879 par Franz von Soxhlet pour la détermination des matières grasses dans le lait, est une technique d'extraction continue des composés d'intérêt présents dans un solide à l'aide d'un solvant. Cette méthode, largement utilisée dans des domaines tels que l'agriculture, l'environnement, l'alimentation et la pharmacutique, est devenue l'outil standard pour l'extraction solide-liquide (**Virost et al., 2007**). Son principe repose sur le lavage répété de l'échantillon solide avec du solvant frais. Le solvant est chauffé dans un ballon, vaporisé, puis condensé dans un condenseur au-dessus du thimble (récipient en forme de cylindre) contenant l'échantillon. (López-Bascón et Luque de Castro, 2020) Le solvant liquide traverse alors le thimble, dissolvant les composés d'intérêt, avant d'être siphonné de retour dans le ballon pour un nouvel cycle d'extraction. Ce processus permet une extraction exhaustive des composés ciblés (**Luque de Castro et Priego-Capote, 2010**).

I.9.3. Extraction par macération :

La macération est une technique d'extraction qui consiste à immerger une substance végétale, telle que les graines de pollens, dans un solvant, puis cette substance est ensuite agitée fréquemment dans un récipient fermé jusqu'à ce que les composants solubles soient dissous (**Tambun et al., 2021**). Cette méthode est particulièrement adaptée pour les médicaments thermolabiles. Bien que la macération nécessite du temps, elle est simple, économique et efficace pour extraire les composés actifs des plantes (**Velavan, 2015**).

I.9.4. Extraction par agitation :

L'extraction par agitation est une méthode très répandue pour extraire des composés bioactifs à partir de matériaux naturels comme le pollen, les fruits ou les plantes (**Ahmed et al., 2020**). Elle consiste à préparer l'échantillon en le broyant ou en le découpant, puis à le placer dans un solvant tel que l'éthanol, ensuite en agitant continuellement, on favorise la dissolution des composés recherchés dans le solvant, une fois l'extraction terminée, on peut séparer les phases organique et aqueuse si nécessaire, et enfin, pour concentrer les composés extraits, on utilise souvent une évaporation sous vide (**Ahmed et al., 2020; Das et Eun, 2018**).

I.9.5. Extraction par ultrasons :

L'extraction assistée par ultrasons est une technique nouvelle et respectueuse de l'environnement qui permet d'extraire efficacement les composés bioactifs des plantes et autres matières biologiques (**Oroian et al., 2020; Wen et al., 2018**). Cette méthode utilise des ondes ultrasoniques puissantes générées par un transducteur piézoélectrique, Ces ondes provoquent un phénomène appelé cavitation acoustique, qui génère des conditions extrêmes à l'échelle

microscopique, ainsi les bulles de cavitation implosent près des particules végétales, créant des forces de cisaillement, des températures élevées et des pressions intenses (**Burgers, 2016; Wen et al., 2018**). Les avantages de cette technique comprennent sa rapidité, son efficacité, sa réduction de l'utilisation de solvants et ses coûts de production plus faibles (**Wen et al., 2018**).

I.9.6.Extraction par micro-ondes :

L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) est une technique moderne et efficace utilisée pour extraire des composés bioactifs à partir de plantes (**Kaufmann et Christen, 2002**). Elle repose sur le chauffage sélectif des échantillons végétaux à l'aide d'un dispositif spécifique, ce qui permet de rompre les liaisons faibles et de libérer les composés dans le solvant (**Kumar et al., 2018; Sethunga et al., 2022**). Différentes variantes de cette méthode existent, notamment l'extraction assistée par micro-ondes en phase solide (MASE), en phase liquide (MALE), sous pression (MAP), et l'extraction assistée par micro-ondes-hydrodistillation (MAHD) (**Sethunga et al., 2022**).

I.9.7.Extraction par CO2 supercritique :

L'extraction au dioxyde de carbone supercritique (SC-CO2) est une technique moderne utilisée pour extraire des substances bioactives à partir de matières végétales (**Tonthubthimthong et al., 2001**). Elle repose sur l'utilisation du dioxyde de carbone dans un état supercritique, où il se comporte à la fois comme un gaz et un liquide en raison de la température et de la pression élevées (**Kuk et Dowd, 1998**).

Cette méthode utilise le CO2 dans un état supercritique comme solvant pour extraire des composés bioactifs de diverses matières premières, et le CO2 supercritique solubilise les composés d'intérêt et les transporte hors du matériau (**Herzi, 2013**).

I.9.8. Extraction assistée par enzyme :

L'extraction assistée par des enzymes (EAE) est une méthode qui exploite la capacité spécifique des enzymes à catalyser la dégradation ou la modification des parois cellulaires, facilitant ainsi la libération des composés intracellulaires d'intérêt, en particulier les composés phénoliques (**Tizón Alba et al., 2023**). Les enzymes ciblent des composants spécifiques des parois cellulaires, tels que la pectine, l'amidon ou la cellulose, ce qui permet d'améliorer le rendement d'extraction des composés d'intérêt (**Marathe et al., 2017**).

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes :

Notre étude vise à comparer les méthodes d'extraction par agitation et par ultrasonication des extraits de pollen, en quantifiant les antioxydants présents dans des échantillons provenant de différentes régions de Bejaia. Nous cherchons également à évaluer l'activité antioxydante de ces extraits en utilisant divers tests tels que le pouvoir réducteur, le test FRAP, l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH et l'activité anti-radicalaire ABTS. Et pour évaluer l'activité antibactérienne, nous utilisons des souches de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* sur gélose.

II.1.Échantillonnage du pollen :

Le travail porte sur l'analyse de plusieurs échantillons de pollen apicole (Figure 09), collectés dans diverses zones de la région de Béjaïa. (**Tableau II**).

Tableau II : Les régions d'origine des échantillons de pollen

Échantillon	L'origine de l'échantillant
P1	Souk El Ténine
P2	Tighremt
P3	Aokas
P4	Adekar
P5	Kherrata



Figure 09 : Photographie Originale des échantillons du pollen.

II.2. Protocoles d'extraction

II.2.1. Préparation d'extrait éthanolique de pollen par agitation

Selon Bougandoura et Bendimerad, (2012), nous avons mélangés 1 g de pollen avec 70 mL d'éthanol à 70% dans un bécher. Ce mélange est ensuite placé sur une plaque agitatrice avec un barreau magnétique, démarrant à 300 tours par minute, puis augmentant successivement à la vitesse maximale, et ce pendant 4 heures. Après agitation, le mélange est filtré avec du papier filtre pour obtenir l'extrait, qui est ensuite conservé dans un réfrigérateur.



Figure 10 : Photographie Originale de l'Agitation du Pollen sur la Plaque agitatrice.

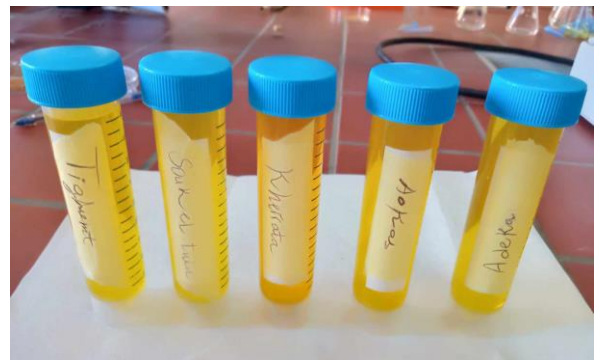


Figure 11 : Photographie Originale des extraits obtenu par agitation.

II.2.2. Préparation d'extrait éthanolique de pollen assisté par ultrason :

Pour extraire les composés bioactifs du pollen, nous avons utilisés 3 g de pollen avec 60 mL d'éthanol à 70% dans un bécher. Ce mélange est ensuite placé dans un appareil à bain ultrasonique réglé à 40°C pendant 45 minutes. Après cette étape, nous effectuons un dégazage pendant 5 minutes, suivi d'une filtration. Enfin, nous ajustons le volume de l'extrait pour le ramener à son volume initial.



Figure 12 : Photographie Originale de l'Extraction Ultrasonique sur le Pollen.



Figure 13 : Photographie Originale des extraits obtenu par ultrasonication.

II.3. Dosage des protéines

La méthode de Bradford (1976) a été employée pour estimer la concentration en protéines des échantillons de pollen. Cette méthode, basée sur la réaction colorimétrique, implique l'utilisation du colorant "bleu de Coomassie G250". Ce colorant, naturellement vert foncé en milieu acide, subit un changement de couleur pour devenir bleu lorsqu'il se lie aux groupements NH_3^+ des protéines, permettant ainsi une évaluation précise de leur concentration (**Bradford, 1976**). Une quantité de 100 μl a été prélevée de chaque échantillon d'extrait de pollen issus des deux méthodes, dans des tubes numérotés et 5 ml de réactif de Bradford ont été ajoutés. Les échantillons ont été homogénéisés par vortex. Un blanc a été préparé avec 100 μl d'eau distillée et 5 ml de réactif. Tous les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 2 minutes. L'absorbance a été lue à 595 nm. Les résultats ont été présentés en milligrammes équivalents de sérum albumine bovine pour 1 gramme d'échantillon (mg EqBSA /g).

II.4. Dosage des antioxydants

II.4.1. Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols repose sur la réaction entre les composés phénoliques présents dans les extraits et le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Lorsque les composés phénoliques subissent une oxydation, ils génèrent un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), la coloration bleue résultante étant proportionnelle à la concentration des composés phénoliques dans la solution. (**Pérez et al., 2023**).

La teneur en composés phénoliques a été évaluée selon la méthode décrite par **Naithani et al. (2006)**. Dans des tubes à essai, 100 μl de chaque extrait de pollen issus des deux méthodes ont été mélangés avec 100 μl de réactif de Folin-Ciocalteu et 2 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2%. Incuber les tubes à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 750 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100g d'échantillon (mgEAG/100g).

II.5.L'activité antioxydante des extraits

II.5.1. Pouvoir réducteur

Diverses études ont mis en évidence une relation étroite entre les activités antioxydantes et la capacité de réduction (**Bentabet et al., 2014**). Cette méthodologie est souvent utilisée pour évaluer la capacité de réduction des antioxydants contenus dans les extraits, en catalysant la conversion du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). En d'autres termes, elle permet de mesurer la capacité des antioxydants à neutraliser les radicaux libres, un processus crucial dans la prévention du stress oxydatif et de diverses maladies (**Doukani et al., 2014**).

Selon le protocole décrit par **Beretta et al. (2005)**, 500 μL d'extrait de chaque échantillon des extraits de pollen issus des deux méthodes sont mélangés avec 1500 μL de tampon phosphate et 1500 μL de potassium hexacyanoferrate. Après vortex, le mélange est incubé à 50°C dans un bain-marie pendant 20 minutes. Ensuite, 1500 μL d'acide trichloracétique (TCA) sont ajoutés, puis le mélange est vortexé à nouveau. Un volume de 1250 μL de ce mélange est prélevé et dilué dans 1250 μL d'eau distillée (H_2O). Ensuite, 1250 μL de chlorure ferrique (FeCl_3) sont ajoutés, suivi d'un nouveau vortex. Après une incubation de 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 700 nm. Les résultats sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur \%} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs C}}{\text{Abs E}} \right) \right] \times 100$$

- Abs C : Absorbance du contrôle
- Abs E : Absorbance de l'échantillon.

II.5.2. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le test FRAP est largement utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant. Son principe repose sur la réduction du complexe ferrique 2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine (Fe^{3+} -TPTZ) en sa forme ferreuse colorée (Fe^{2+} -TPTZ) en présence d'antioxydants. Le complexe ainsi formé présente une teinte bleu-violet, à une absorbance maximale à 593 nm (**Alvarez-Suarez et al., 2010**).

D'après **Maksimović et al. (2005)**, 100 μl de chaque extraits de pollen issus des deux méthodes (dilué à 1/5 : 100 μl d'extrait dans 400 μl d'éthanol) sont mélangés avec 1 ml de réactif FRAP, préparé en respectant un rapport volumétrique spécifique de (100.10.10). Et que pour chaque 100 ml de tampon d'acétate de sodium 300 mM, on ajoute 10 ml de TPTZ 10 mM et 10

ml de FeCl₃ 20 mM. Après une incubation de 5 minutes, l'absorbance est mesurée à 593 nm. Les résultats sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{FRAP \%} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs C}}{\text{Abs E}} \right) \right] \times 100$$

- Abs C : Absorbance du contrôle
- Abs E : Absorbance de l'échantillon.

II.5.3. Activité anti radicalaire DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

La molécule de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable en raison de la délocalisation de son électron non apparié, ce qui lui confère une couleur violette intense détectable par absorption. Lorsqu'elle entre en contact avec des composés capables de céder un atome d'hydrogène ou un électron, la forme réduite de DPPH (DPPH₂) est produite, se traduisant par une perte de la couleur violette et l'apparition d'une teinte jaune pâle due à la présence de groupements picryl. L'absorbance de cette solution est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 517 nm (Gülçin et al., 2003).

Pour déterminer le pourcentage de réduction du DPPH, la méthode de Meda et al. (2005) est utilisée, 100µl de chaque extrait de pollen issus des deux méthodes ont été mélangés avec 1 ml de solution de DPPH, puis homogénéisés. Après une période de 15 minutes à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage de réduction du DPPH est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire \%} = \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs E})}{\text{Abs C}} \times 100$$

- Abs C : Absorbance du contrôle
- Abs E : Absorbance de l'échantillon.

II.5.4. Test ABTS

Le test ABTS utilise le 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium (ABTS) comme réactif. L'ABTS est un composé soluble dans l'eau qui, lorsqu'il est oxydé par un agent oxydant tel que le persulfate de potassium, forme le radical cation ABTS⁺. Ce radical

cation ABTS⁺ est bleu-vert et absorbe la lumière à une longueur d'onde de 734 nm. Lorsqu'un antioxydant est ajouté à la solution d'ABTS⁺, il neutralise le radical cation, réduisant ainsi son absorbance à 734 nm. Cette réduction de l'absorbance est directement proportionnelle à la capacité antioxydante de l'échantillon testé (**Re et al., 1999**).

Selon **Re et al. (1999)**, 100 µL de chaque extrait de pollen issus des deux méthodes sont mélangés avec 1 ml de solution ABTS. L'absorbance du mélange est ensuite mesurée après 7 minutes à une longueur d'onde de 734 nm. La différence d'absorbance entre la solution d'ABTS en présence et en absence de l'échantillon est indicative du potentiel des composés responsables de cette activité à neutraliser le radical ABTS⁺. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical, calculé selon la formule suivante :

$$\text{ABTS (\%)} = \frac{(\text{Abs C} - \text{Abs E})}{\text{Abs C}} \times 100$$

- **Abs C : Absorbance du contrôle**
- **Abs E : Absorbance de l'échantillon.**

II.6. Test d'activité antibactérienne

II.6.1. Protocole de préparation des extraits par l'évaporateur rotatif

Afin de préparer les échantillons de l'extrait de pollen à évaluer l'activité antibactérienne, selon (**Penchev, 2010**), un évaporateur rotatif est utilisé pour séparer l'extrait du solvant. Du diéthyléther est ensuite ajouté et agité doucement. Le mélange est transféré dans des boîtes de Pétri, séchés, puis grattés et placés dans des Eppendorfs. Du DMSO est ajouté selon le poids de l'extrait sec, puis le mélange est vortexé. Les extraits sont filtrés deux fois avec des filtres de 0,45 et 0,22 micromètres pour éliminer champignons et bactéries.



Figure 14 : photographie Originale de la préparation de l'extrait par l'évaporateur rotatif.

a. Préparation du gélose Mueller Hinton

Pour préparer la gélose Mueller-Hinton, 18 g de gélose MH sont pesés et ajoutés à 1 litre d'eau distillée dans un erlenmeyer, puis le mélange est porté à ébullition tout en étant agité. La solution est ensuite versée à mi-volume dans des flacons stériles.

b. Protocole de Coulage des Boîtes de Pétri

Le milieu de culture gélosé Mueller Hinton est aseptiquement coulé dans des boîtes de Pétri, puis laissées à température ambiante pendant quelques minutes pour permettre à la gélose de se solidifier pour permettre un durcissement complet de la gélose.

c. Test de sensibilité

Pour évaluer l'activité antibactérienne *in vitro*, deux souches bactériennes de référence sont utilisées : *Escherichia coli* (ATCC25922) et *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). La pureté de ces souches est vérifiée en utilisant la méthode macroscopique (observation de la forme et du mode d'association) et la méthode microscopique (coloration de Gram).

Pour préparer les suspensions bactériennes, les flacons stérilisés et une solution saline de 0,9% sont utilisés.

La méthode de diffusion sur gélose décrite par le “Clinical and Laboratory Standards Institute” **CLSI (2015)**, à l’aide d’un écouvillon, les souches bactériennes ont étéensemencées à la surface de la gélose avec un inoculum ajusté à une turbidité de 0,5 McFarland, confirmée par une mesure d’absorbance de 0,08 à 0,1 à 630 nm. 6 puits sur la surface de la gélose ont été créés, 50µL de chaque extrait est déposé dans chaque puit. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37 °C, puis les diamètres des zones d’inhibition autour des spots sont mesurés en millimètres et comparés aux contrôles positifs pour évaluer l’efficacité antibactérienne des extraits de pollen.

Les extraits de pollen sont classés selon l’échelle d’estimation de l’activité antimicrobienne (**Ponce et al., 2003**) : non sensible (<8 mm), sensible (8 à 14 mm), très sensible (15 à 19 mm) et extrêmement sensible (>20 mm).

Chapitre III :
Résultats et discussion

I.1.1. Résultats et Discussion :

III.1. Dosage des Protéines :

La (figure 15) représente les résultats obtenus en fonction de la teneur en protéines ont permis de représenter la l'histogramme suivant :

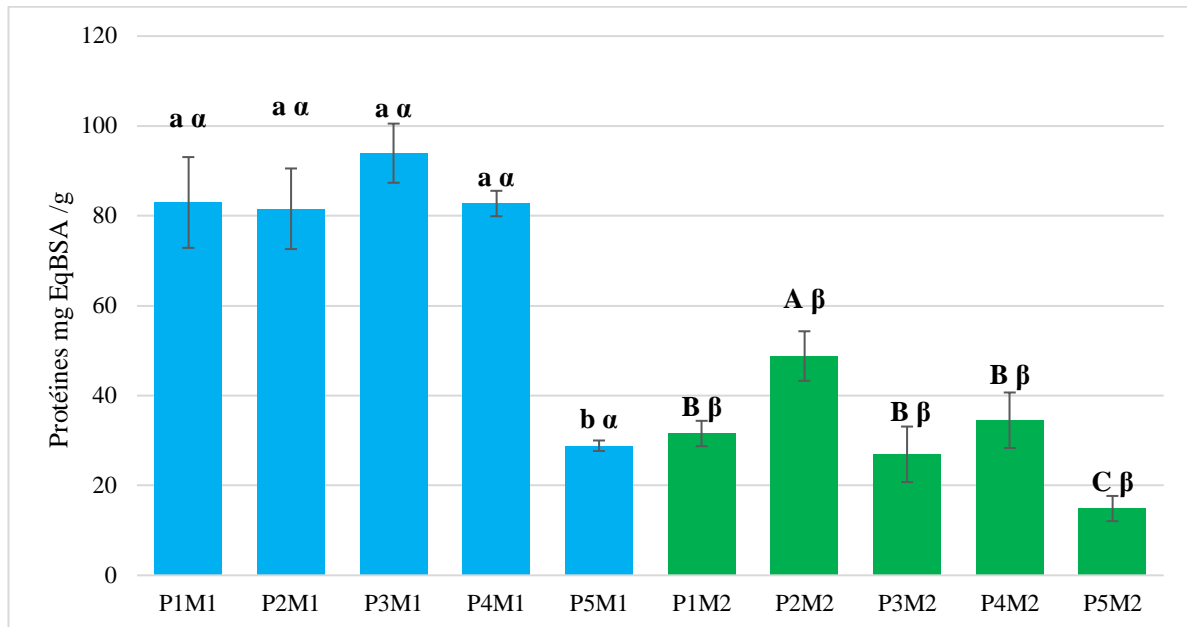


Figure 15 : la teneur en protéines des échantillons de pollen.

Les résultats indiquent que la teneur en protéines la plus élevée est observée pour P3M1 (Aokas - Agitation) à 93,94 mg EqBSA /g, tandis que la plus basse est pour P5M2 (Kherrata - Ultrasonication) à 14,86 mg EqBSA /g.

En comparaison, les teneurs en protéines trouvées par **Taha, Al-KahtanietTaha, (2019)** pour différents types de pollen, les résultats obtenus dans cette étude montrent des variations significatives dans la teneur en protéines des échantillons de pollen en fonction de la méthode d'extraction utilisée. La Méthode 1 (agitation) a montré des teneurs en protéines allant de 28,84 à 93,94 mg EqBSA /g, et la Méthode 2 (ultrasonication) a produit des valeurs allant de 14,86 à 48,80 mg EqBSA /g.

L'analyse ANOVA de teneur en protéines a montré 1 groupe homogène (a) pour la première méthode et 1 groupe homogène pour la deuxième méthode, les autres échantillons montrent une différence significative à $p < 0,05$

Selon le test de Student, les moyennes des valeurs de teneur en protéines des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2) montrent une différence significative.

Pour faciliter la comparaison, il est nécessaire de convertir les teneurs en protéines obtenues en mg EqBSA/g dans cette étude en g/100 g. Toutefois, même sans conversion directe, il est évident que les teneurs en protéines dans cette étude sont significativement plus élevées que celles rapportées par **Taha, Al-KahtanietTaha, (2019)**.

Les échantillons extraits par l'agitation (M1) montrent des teneurs en protéines plus élevées, atteignant jusqu'à 93,94 mg EqBSA/g pour P3M1, tandis que les échantillons extraits par l'ultrasonication (M2) affichent des valeurs inférieures, avec un maximum de 48,80 mg EqBSA/g pour P2M2.

Les résultats de **Taha, Al-KahtanietTaha, (2019)** indiquent que la teneur en protéines varie également en fonction de la source de pollen, avec des valeurs allant de 15,19 g/100 g pour le pollen de tournesol à 20,23 g/100 g Ms pour le pollen de luzerne.

Les résultats montrent que les extraits de pollen obtenus dans cette étude possèdent des teneurs en protéines supérieures à celles rapportées par **Taha, Al-KahtanietTaha, (2019)**, suggérant une efficacité potentiellement accrue des méthodes d'extraction utilisées ici. Les variations observées entre les différentes méthodes d'extraction (M1 et M2) soulignent également l'importance de la sélection de la méthode appropriée pour maximiser la récupération des protéines du pollen.

III.2. Dosages des antioxydants :

III.2.1. Dosage des polyphénols totaux :

La (figure 16) représente les résultats obtenus en fonction de la teneur en en composés phénolique ont permet de représenter la l'histogramme suivant :

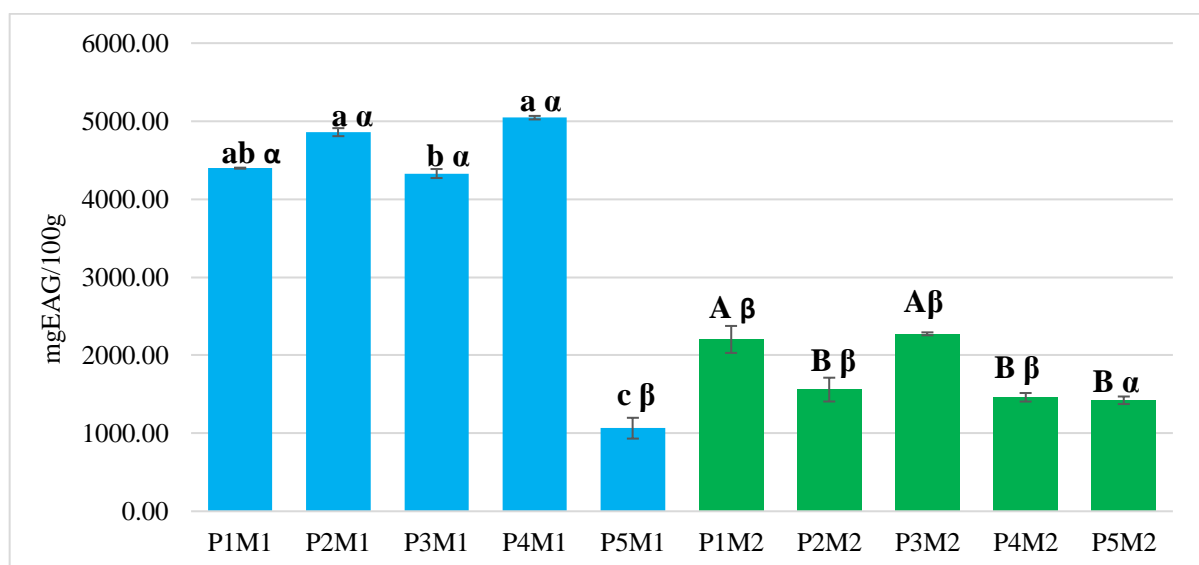


Figure 16 : La teneur en composés phénolique totaux dans les échantillons de pollen.

Nos résultats révèlent des variations significatives dans les niveaux de composés phénoliques totaux du pollen entre les différentes régions étudiées à Bejaia.

Les résultats obtenus par les méthodes d'extraction M1 (agitation) et M2 (ultrasonication) révèlent des niveaux de composés phénoliques totaux plus élevés pour la méthode M1 dans toutes les régions étudiées. Pour l'extrait de pollen de Souk El Ténine P1, la méthode M1 présente un contenu phénolique de 4397,72 mg/100g, tandis que la méthode M2 affiche une valeur de 2202,49 mg/100g. Pour l'extrait de pollen de Tighremt P2, la méthode M1 montre une valeur de 4859,29 mg/100g, et la méthode M2 donne 1559,71 mg/100g. Pour l'extrait de pollen de Aokas P3, la méthode M1 présente 4328,66 mg/100g, alors que la méthode M2 montre 2274,14 mg/100g. Pour l'extrait de pollen de Adekar P4, la méthode M1 donne un contenu phénolique de 5044,65 mg/100g, contre 1461,06 mg/100g pour la méthode M2. Enfin, celui de Kherrata P5, la méthode M1 affiche une valeur de 1064,90 mg/100g, tandis que la méthode M2 montre 1422,64 mg/100g.

L'analyse ANOVA des teneurs en composé phénolique a montré un groupe homogène (a) pour la première méthode et 2 groupes homogènes pour la deuxième méthode les autres échantillons montre une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, il y a une différence significative entre les moyennes des valeurs de teneur en composés phénoliques des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2).

En comparant les niveaux de contenu phénolique entre différentes régions, on constate que le contenu phénolique d'Adekar est supérieur à celui de la Russia-Perm Region en Turquie rapporté par **Özcan et al. (2019)**, avec 5044.65 mgEAG/100g et 719.58 mg/100g respectivement. Également supérieure à celui de Sefrou au Maroc obtenu par **Asmae et al. (2021)**, qui a 32.39 mg GAE/g.

Les variations dans les niveaux de composés phénoliques entre différentes régions peuvent être expliquées par divers facteurs, tels que les conditions environnementales, la variété des plantes, les pratiques agricoles et le climat. Ces différences soulignent l'importance de tenir compte des influences environnementales et géographiques lors de l'évaluation des composés phénoliques, car elles peuvent influencer significativement les niveaux et les types de composés présents dans les plantes. Nos résultats mettent en évidence des niveaux de composés phénoliques plus élevés dans certaines régions par rapport à d'autres études, ce qui indique le potentiel de ces régions pour la production de pollen riche en composés phénoliques bénéfiques pour la santé. De plus, notre étude montre que la méthode d'agitation est plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, ce qui souligne l'importance de choisir la méthode d'extraction appropriée pour obtenir les meilleurs résultats.

III.3. L'activité antioxydante des extraits.

III.3.1. Pouvoir réducteur :

La (figure 17) représente le pourcentage d'apparition de couleur lié au pouvoir réducteur de pollen par les 2 méthodes.

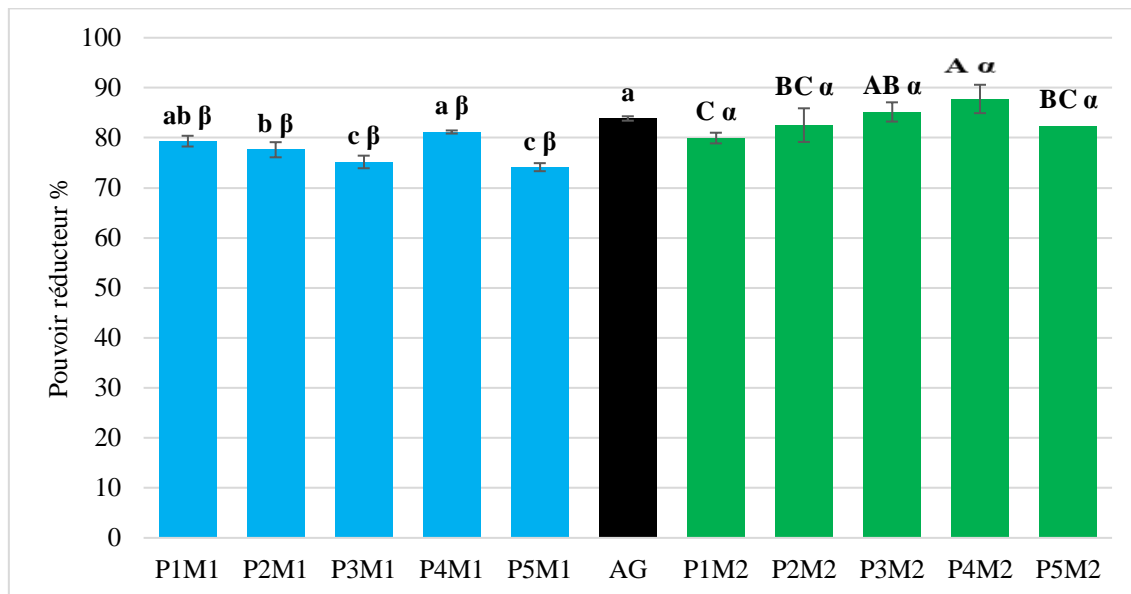


Figure 17 : valeurs de pouvoir réducteur des extraits de pollen.

Ces résultats représentent les pourcentages de conversion de couleur par le pouvoir réducteur des extraits de pollen, comparés à l'acide gallique, connu pour ses propriétés réductrices, qui a un pourcentage de 83,85%.

Les résultats ont montré que le pourcentage de conversion de couleur le plus élevé a été obtenu avec l'ultrasonication pour le pollen de la région de Adekar (P4), avec un taux de 87,76%. En revanche, le pourcentage d'inhibition le plus faible a été enregistré avec l'agitation pour le pollen de la région de Kherrata (P5), avec un taux de 74,12%.

L'analyse ANOVA de pouvoir réducteur a montré 2 groupes homogènes (a et c) pour la première méthode et 1 groupes homogènes pour la deuxième méthode et P2M1 montre une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, les moyennes des valeurs de pouvoir réducteur des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2) montrent une différence significative.

En comparant les résultats moyens des pourcentages d'inhibition obtenus avec les méthodes d'extraction (agitation et ultrasonication) à la moyenne globale de l'acide gallique des pourcentages de pouvoir réducteur, on constate que l'ultrasonication a généralement donné des valeurs supérieures à la moyenne globale pour tous les échantillons de pollen, à

l'exception de P1 (Souk El Ténine) où l'agitation a donné un résultat légèrement supérieur à la moyenne globale. Par exemple, pour P4 (Adekar), l'ultrasonication a produit un pourcentage d'inhibition de 87,76%, tandis que la moyenne globale est de 83,86%. En revanche, l'agitation a donné des pourcentages d'inhibition inférieurs à la moyenne globale pour tous les échantillons de pollen.

Ces résultats suggèrent que l'ultrasonication est une méthode d'extraction plus efficace que l'agitation pour extraire les composés bioactifs du pollen, avec des performances variables selon la région de récolte du pollen.

III.3.2. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :

Les valeurs de Pouvoir Antioxydant de Réduction du Fer ont été représenté sur la (figure 18).

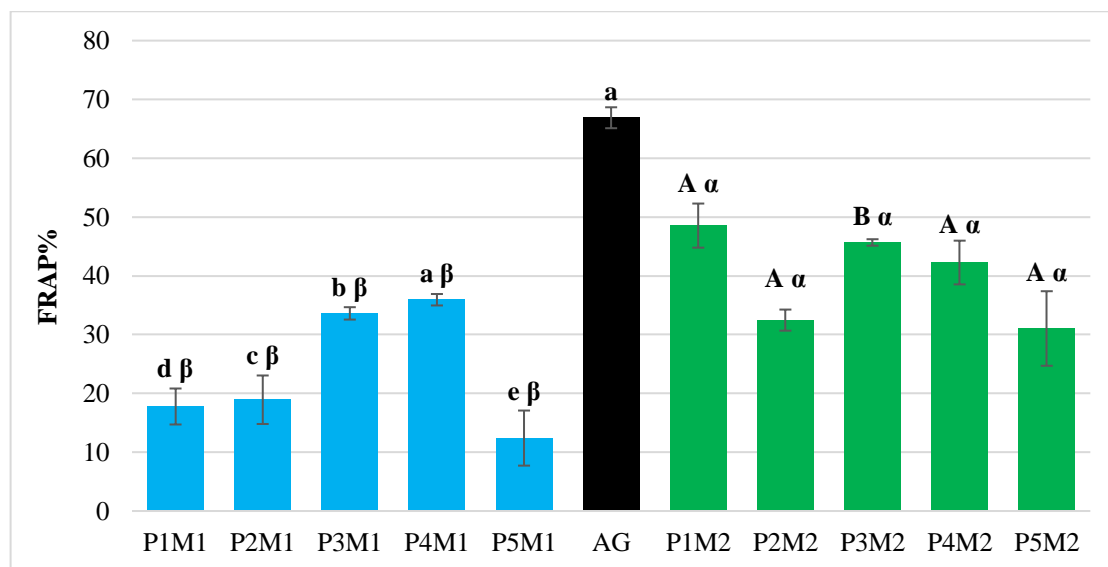


Figure 18 : Pouvoir Antioxydant de Réduction du Fer.

Les résultats de l'analyse FRAP des échantillons de pollen des différentes régions, montrent des variations significatives. Le résultat maximal de l'analyse FRAP a été obtenu par l'échantillon P1M2 de la région de Souk El Ténine avec une valeur de 48,53%, tandis que le résultat minimal a été obtenu par l'échantillon P5M1 de la région de Kherrata avec une valeur de 12,40%.

L'analyse ANOVA de FRAP a montré un groupe homogène (a) pour la deuxième méthode et les autres échantillons montrent une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, il existe une différence significative entre les moyennes des valeurs de FRAP des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2).

En comparant ces valeurs à l'acide gallique (AG), qui a une valeur de 66,88%, nous pouvons observer que tous les échantillons présentent des valeurs inférieures à celle de l'AG. Les échantillons obtenus par agitation montrent des résultats FRAP inférieurs à ceux de l'acide gallique : P1M1 (17,77% < 66,88%), P2M1 (18,92% < 66,88%), P3M1 (33,61% < 66,88%), P4M1 (35,93% < 66,88%), et P5M1 (12,40% < 66,88%). Pour les échantillons obtenus par ultrasonication, les valeurs sont également inférieures à l'AG mais globalement plus élevées que celles obtenues par agitation : P1M2 (48,53% < 66,88%), P2M2 (32,46% < 66,88%), P3M2 (45,67% < 66,88%), P4M2 (42,26% < 66,88%), et P5M2 (31,04% < 66,88%).

Les différences dans les résultats FRAP des échantillons de pollen sont dues à l'efficacité variable des méthodes d'extraction (ultrasonication vs agitation), les conditions géographiques et climatiques des régions de collecte, la saison de récolte, les méthodes de stockage et traitement post-récolte, la diversité botanique des plantes sources, et les facteurs biologiques et génétiques des plantes et des abeilles. Ces facteurs influencent la composition chimique et l'activité antioxydante du pollen.

III.3.3. Activité anti radicalaire DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

La figure 18 représente les résultats obtenus par l'activité anti radicalaire DPPH.

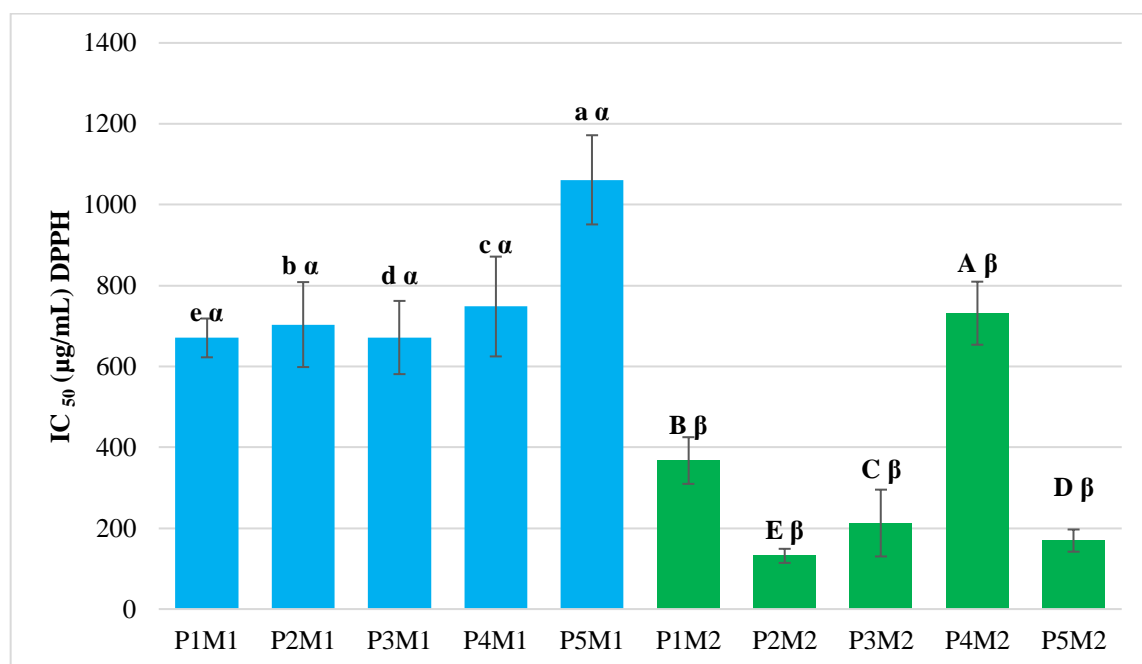


Figure 19 : les valeurs de l'activité antiradicalaire DPPH.

L'analyse comparative des méthodes d'extraction de pollen, agitation (M1) et ultrasonication (M2), a révélé des différences marquantes dans l'activité antioxydante des échantillons.

Pour l'agitation, l'IC₅₀ varie de 670,50 µg/ml (P1, Souk El Ténine) à 1061,42 µg/ml (P5, Kherrata), tandis qu'avec l'ultrasonication, les valeurs vont de 131,62 µg/ml (P2, Tighremt) à 731,61 µg/ml (P4, Adekar).

Cette tendance se confirme dans le classement des échantillons : P2M2 < P3M2 < P1M2 < P4M2 < P5M2 pour l'ultrasonication et P2M1 < P3M1 < P1M1 < P4M1 < P5M1 pour l'agitation, soulignant la supériorité de l'ultrasonication en termes d'activité antioxydante.

L'analyse ANOVA de DPPH a montré une différence significative à p<0,05 entre tout les groupe des deux méthodes.

Selon le test de Student, il y a une différence significative entre les moyennes des valeurs de DPPH des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2).

Les résultats d'IC₅₀ pour les deux méthodes d'extraction agitation et ultrasonication, montrent des valeurs généralement plus élevées que celles obtenues par **Bakour et al. (2021)**. pour divers types de pollen, ce qui suggère une activité antioxydante relativement plus faible pour nos échantillons., nos échantillons de pollen présentent des valeurs d'IC₅₀ allant de 670,50 à 1061,42 µg/mL pour la méthode d'agitation et de 131,62 à 731,61 µg/mL pour la méthode d'ultrasonication. En comparaison, **Bakour et al. (2021)**. ont obtenu des valeurs d'IC₅₀ plus basses pour d'autres variétés de pollen, telles que le pollen de Genêt à balais (200 µg/mL), le pollen d'Oranger amer (80 µg/mL), le pollen de Coriandre (140 µg/mL), le pollen de Grenadier (6 µg/mL), le pollen de Chêne vert (10 µg/mL) et le pollen de Rue (80 µg/mL). Cependant, malgré ces différences, certains de nos échantillons, tels que le pollen d'Aokas avec une valeur d'IC₅₀ de 212,75 µg/mL et le pollen de Kherrata avec une valeur d'IC₅₀ de 169,38 µg/mL, montrent des valeurs comparables à celles de certaines variétés de pollen étudiées par **Bakour et al. (2021)**, ce qui suggère un potentiel antioxydant similaire pour ces échantillons.

Les résultats mettent en évidence la diversité des activités antioxydantes du pollen selon la variété et les conditions de récolte, ce qui pourrait avoir des implications significatives pour son utilisation thérapeutique ou alimentaire. De plus, l'importance du choix de la méthode d'extraction pour maximiser l'activité antioxydante du pollen est soulignée, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour son application dans divers domaines.

III.3.4. Test ABTS

La figure 20 représente les résultats obtenus par l'activité anti radicalaire ABTS.

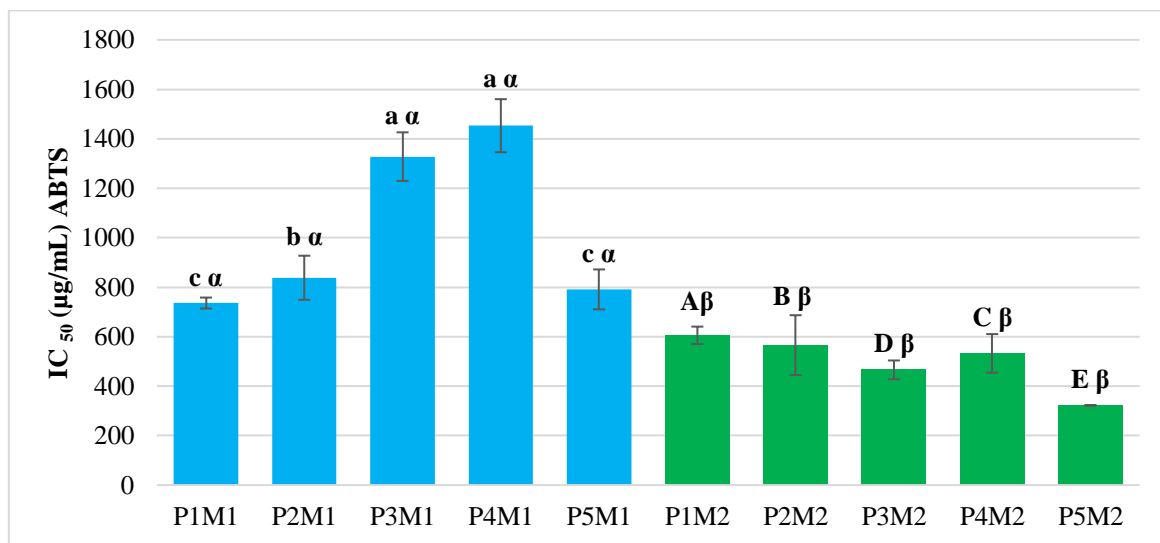


Figure 20 : les valeurs de l'activité antiradicalaire ABTS.

Les résultats obtenus montrent que la méthode d'ultrasonication (M2) produit généralement des rendements supérieurs en termes d'activité antioxydante mesurée par le test ABTS (IC₅₀) comparativement à la méthode d'agitation (M1). Pour l'échantillon P1, la valeur de l'IC₅₀ est de 605,45 µg/mL avec la méthode M2, contre 735,91 µg/mL avec la méthode M1.

La valeur maximale obtenue avec la méthode M1 est de 1453,00 µg/mL pour l'échantillon P4 (Adekar), tandis que la valeur minimale est de 735,91 µg/mL pour l'échantillon P1 (Souk El Ténine). En comparaison, la méthode M2 montre une valeur maximale de 605,45 µg/mL pour l'échantillon P1 (Souk El Ténine) et une valeur minimale de 322,11 µg/mL pour l'échantillon P5 (Kherrata).

L'analyse ANOVA d'ABTS a montré 2 groupes homogènes (a et c) pour la première méthode et les autres échantillons montrent une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, il y a une différence significative entre les moyennes des valeurs de ABTS des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2).

En comparaison avec les résultats rapportés par **Bakour et al. (2021)** pour diverses sources de pollen, les valeurs d'IC₅₀ sont généralement plus faibles, indiquant une activité antioxydante plus élevée. *Mentha spicata* présente une valeur d'IC₅₀ de 0,08 mg/mL et

Anethum graveolens de 0,24 mg/mL, tandis que dans cette étude, les valeurs les plus faibles obtenues avec la méthode M2 sont de 322,11 µg/mL pour l'échantillon P5 (Kherrata).

Ces différences substantielles mettent en évidence l'impact significatif des méthodes d'extraction et des conditions expérimentales sur les rendements d'extraction des composés phénoliques, soulignant ainsi la nécessité d'une approche méthodologique cohérente pour permettre des comparaisons pertinentes entre différentes études. Les variations observées peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment la plante spécifique utilisée, le solvant d'extraction, les conditions d'extraction (température, durée, agitation), ainsi que la méthode de mesure du rendement.

III.4. Test d'activité antibactérienne

III.4.1. Test antibactérien sur *Escherichia coli*

Les résultats de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli* sont représentés sur la figure 21.

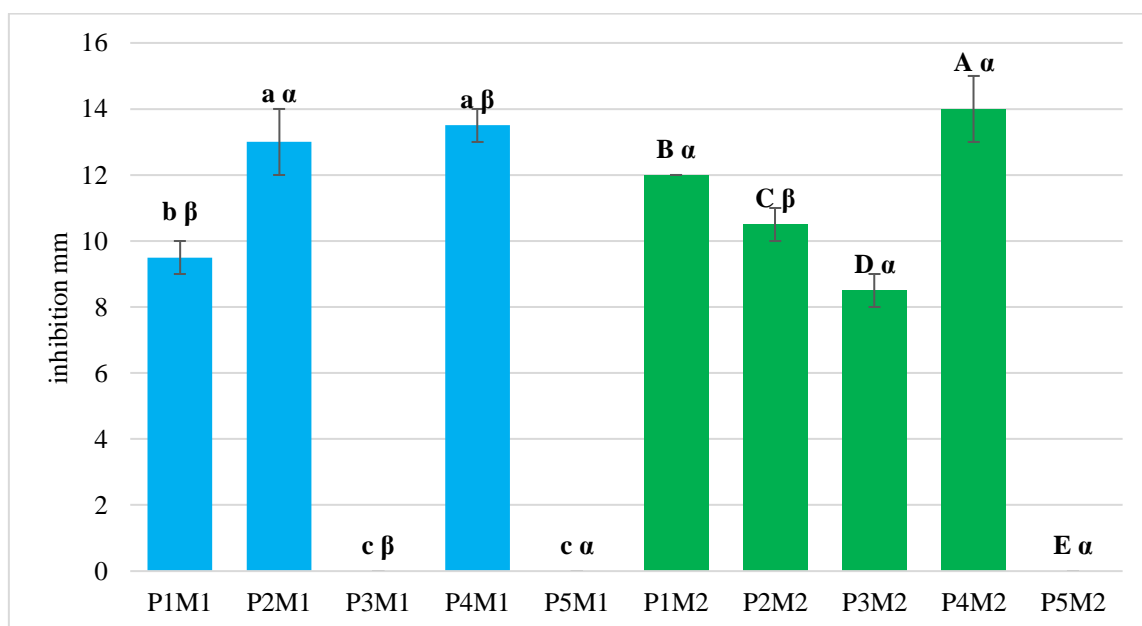


Figure 21 : Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli*.

Tableau III : Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli*.

E.Coli	P1M1	P2M1	P3M1	P4M1	P5M1	P1M2	P2M2	P3M2	P4M2	P5M2
Inhibition mm	9,5	13	0	13,5	0	12	10,5	8,5	14	0

Les résultats d'activité antibactérienne des échantillons de pollen contre *Escherichia coli* montrent des variations significatives en fonction de l'origine et de la méthode d'extraction. Les échantillons obtenus par agitation (M1) ont présenté des zones d'inhibition allant de 0 mm (P3M1, Aokas et P5M1, Kherrata) à 13,5 mm (P4M1, Adekar), tandis que ceux obtenus par ultrasonication (M2) ont varié de 0 mm (P5M2, Kherrata) à 14 mm (P4M2, Adekar).

L'analyse ANOVA de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli* a montré 2 groupes homogènes (a et c) pour la première méthode et les autres échantillons montrent une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, aucune différence significative apparente entre les moyennes des valeurs de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli* de l'échantillon de pollen (P5M1) obtenu par agitation et (P5M2) obtenu par ultrasonication. Mais il y a une différence significative entre les moyennes des autres valeurs de test antibactérien des échantillons de pollen traités par agitation et par ultrasonication.

En comparaison, les résultats de **Khadra et al. (2019)** pour le pollen d'*Inulaviscosa* montrent une inhibition constante de 13 mm à des concentrations de 1 mg/mL et 0,1 mg/mL. Les échantillons de P2M1 (Tighremt) et P4M1 (Adekar) ont des inhibitions similaires à celles de Khadra et al., (2019), tandis que d'autres échantillons, comme P1M1 (Souk El Ténine) et P2M2 (Tighremt), montrent des inhibitions légèrement inférieures. Les échantillons de P3M1, P5M1 et P5M2 n'ont révélé aucune activité antibactérienne, ce qui diffère des résultats rapportés par **Khadra et al. (2019)**.

III.4.2. Test antibactérien sur *Staphylococcus aureus*

Les résultats de test d'inhibition antibactérienne sur *S.aureus* ont été représentés sur la figure 22.

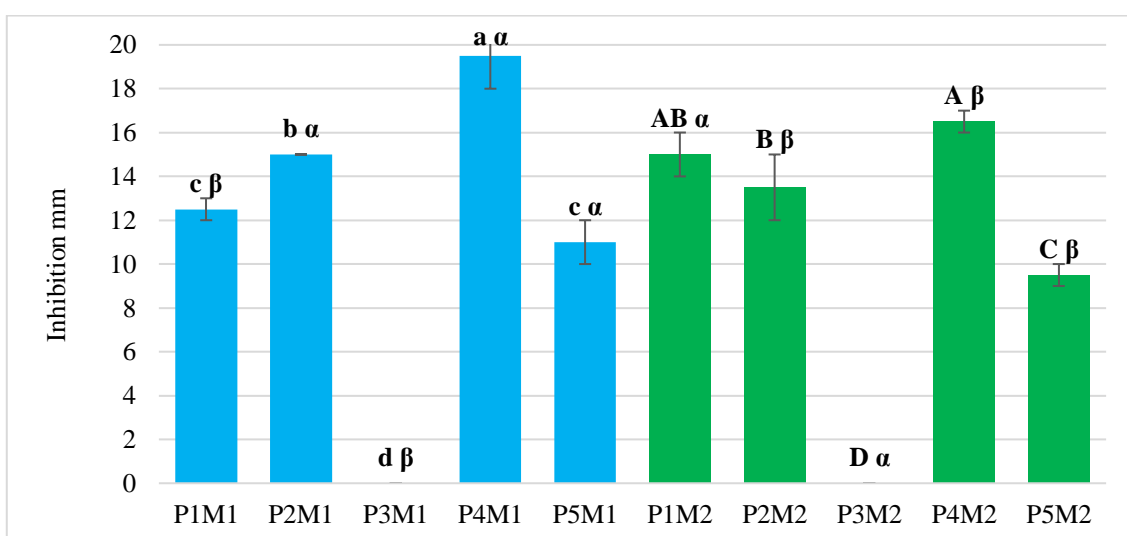


Figure 22 : Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur *S.aureus*.

Tableau IV : Résultats de test d'inhibition antibactérienne sur S.aureus.

S.Aureus	P1M1	P2M1	P3M1	P4M1	P5M1	P1M2	P2M2	P3M2	P4M2	P5M2
Inhibition mm	12,5	15	0	19,5	11	15	13,5	0	16,5	9,5

Les résultats d'activité antibactérienne des échantillons de pollen contre *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) varient en fonction de l'origine et de la méthode d'extraction. Les échantillons obtenus par agitation (M1) montrent des zones d'inhibition allant de 0 mm (P3M1, Aokas) à 19,5 mm (P4M1, Adekar), tandis que ceux obtenus par ultrasonication (M2) varient de 0 mm (P3M2, Aokas) à 16,5 mm (P4M2, Adekar).

L'analyse ANOVA de test d'inhibition antibactérienne sur *S.aureus* a montré 1 groupe homogène (A et B) pour la deuxième méthode et les autres échantillons montrent une différence significative à $p < 0,05$.

Selon le test de Student, il y a une différence significative entre les moyennes des valeurs de test d'inhibition antibactérienne sur *E.Coli* des échantillons de pollen traités par agitation (M1) et par ultrasonication (M2).

Comparés aux résultats de **Khadra et al. (2019)**, qui a observé des inhibitions de 15 mm et 14 mm à des concentrations de 1 mg/mL et 0,1 mg/mL respectivement pour le pollen d'*Inulaviscosa*, les échantillons de P2M1 (Tighremt) et P1M2 (Souk El Ténine) montrent des inhibitions similaires de 15 mm. Cependant, P4M1 (Adekar) présente une inhibition supérieure de 19,5 mm, tandis que P1M1 (Souk El Ténine) et P5M1 (Kherrata) ont des inhibitions inférieures de 12,5 mm et 11 mm respectivement.

Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'origine du pollen et de la méthode d'extraction sur l'activité antibactérienne. Et soulignent l'importance de la provenance et de la méthode d'extraction pour maximiser l'activité antibactérienne des pollens, et indiquent des variations significatives dans la composition phytochimique des échantillons de pollen, ce qui suggère des implications potentielles pour leur utilisation en tant qu'agents antibactériens.

Conclusion

Conclusion

L'étude comparative de deux méthodes d'extraction de molécules bioactives du pollen a été réalisée avec des échantillons récoltés depuis différentes régions de Bejaia. Les résultats ont révélé des variations significatives dans la teneur en protéines, en composés phénoliques, ainsi que dans l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de pollen.

Les échantillons extraits par agitation (M1) ont généralement présenté des teneurs plus élevées en protéines et en composés phénoliques que ceux extraits par ultrasonication (M2) issus de toutes les régions étudiées. Cependant, l'ultrasonication a montré de meilleures performances en termes d'activité antioxydante, tels que le pouvoir réducteur, le test FRAP, l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH et l'activité anti-radicalaire ABTS, ainsi qu'en termes d'activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Ces résultats soulignent l'impact de l'origine botanique, des conditions liés à l'environnement et à la géographie sur la composition phytochimique du pollen. De plus, ils indiquent que le choix de la méthode d'extraction est crucial pour maximiser la récupération des composés bioactifs du pollen. Ces conclusions pourraient avoir des implications importantes pour l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, en identifiant les régions propices à la production de pollen riche en composés bioactifs bénéfiques pour la santé.

Cela ouvre des perspectives telles que l'optimisation des Méthodes comme Combiner agitation et ultrasonication, et utiliser des techniques comme l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, et le développement des protocoles standardisés et utilisation des techniques avancées comme la HPLC pour garantir la reproductibilité.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques :

- ❖ Abe, E., Delye, S. G., & Alvarez, J. C. (2010). Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés. *Annales de Toxicologie Analytique*, 22, 51–59.
- ❖ Ahmed, M., Ramachandraiah, K., Jiang, G.-H., & Eun, J. B. (2020). Effects of Ultrasonication and Agitation on Bioactive Compounds and Structure of Amaranth Extract. *Foods*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/foods9081116>
- ❖ Ahouandjinou, S. T. B., Yédomonhan, H., Tossou, G. M., Adomou, A. C., & Akoègninou, A. (2017). Diversité des plantes mellifères de la zone soudanienne: cas de la forêt classée des collines de Kouandé, Nord-Ouest du Bénin. *Afrique Science*, 13(6), 149–163.
- ❖ Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol*, 48(8–9), 2490–2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- ❖ Andersen, T. S., & Bertelsen, F. (1972). Scanning Electron Microscope Studies of Pollen of Cereals and other Grasses. *Grana*, 12(2), 79–86. <https://doi.org/10.1080/00173137209428830>
- ❖ Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2017). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *J Pharm Biomed Anal*, 147, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009>
- ❖ Asmae, E. G., Nawal, E. M., Bakour, M., & Lyoussi, B. (2021). Moroccan Monofloral Bee Pollen: Botanical Origin, Physicochemical Characterization, and Antioxidant Activities. *Journal of Food Quality*, 2021(1), 8877266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/8877266>
- ❖ Aylanc, V., Peixoto, A., Vale, N., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2023). Sporopollenin-based bio-microcapsules as green carriers for controlled delivery of pharmaceutical drugs. *Applied Materials Today*, 33, 101860. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2023.101860>
- ❖ Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaid, D., Oumokhtar, B., & Lyoussi, B. (2021). Antioxidant and Antibacterial Effects of Pollen Extracts on Human Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Quality*, 2021(1), 5560182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/5560182>
- ❖ Bougandoura N., et Bendimerad N. (2012). Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. (*Nepeta*) briq. *Revue des BioRessources*, 2 :1-7.
- ❖ Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364–371. <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0834-x>
- ❖ Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Maffei Facino, R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185–191. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.010>

- ❖ Bogdanov, S. (2012). Pollen: Nutrition, functional properties, health. *Magnesium*, 20, 350.
- ❖ Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653–1659.
- ❖ Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- ❖ Bryant Jr., V. M., & Jones, G. D. (2001). The r-values of honey: Pollen coefficients. *Palynology*, 25(1), 11–28. <https://doi.org/10.1080/01916122.2001.9989554>
- ❖ Burgers, A. (2016). Caractérisations physico-mécaniques de bois sans défauts pour la conception mécanique: application aux pins de la région méditerranéenne française. Université de Montpellier.
- ❖ Chau, K. D., & Rehan, S. M. (2024). Nutritional profiling of common eastern North American pollen species with implications for bee diet and pollinator health. *Apidologie*, 55(1), 9. <https://doi.org/10.1007/s13592-023-01054-4>
- ❖ Coulibaly, S., Ouattara, D., Koulibaly, A., & Kamanzi, K. (2019). Potentiel mellifère de la flore du Centre-Est de la Côte d'Ivoire: Intérêt pour l'apiculture moderne. *Agronomie Africaine*, 8(1), 23–39.
- ❖ Das, P. R., & Eun, J.-B. (2018). A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chemistry*, 253, 22–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.080>
- ❖ Delsinne, T. (n.d.). Synthèse des connaissances concernant les insectes pollinisateurs sauvages du Parc Naturel Régional des Volcans d'Auvergne.
- ❖ Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303–4309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
- ❖ Djebbar, O., & Ounadi, L. (2017). Contribution à l'identification des plantes mellifères dans la région de Tizi-Ouzou et analyse de leurs pollens au microscope optique. Université Mouloud Mammeri.
- ❖ Doukani, K., Souhila, T., Asma, D., & Zahira, H. (2014). Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement*, 10, 1–13.
- ❖ Erdtman, G. (2023). Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperms (an introduction to palynology). Brill.
- ❖ Fine, F., Vian, M. A., Tixier, A.-S. F., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2013). Les agrosolvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20(5). <https://doi.org/10.1051/ocl/2013020>

- ❖Gastaldi, C., Thi Mai, B., & Girard, M. (2020). Notions de base en palynogénèse et morphologie du pollen. Abeilles et Cie, 199, 25–26. <https://anses.hal.science/anses-03540779>
- ❖Gharbi, M. (2011). Les produits de la ruche: origines-fonctions naturelles-composition-propriétés thérapeutiques: apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire.
- ❖Guenauoui, N., Mouhoubi-Tafinine, Z., Amessis-Ouchemoukh, N., Saimi, M., Saidi, H., Ayad, R., Sadou, D., Moumeni, L., & Ouchemoukh, S. (2024). Pollen profiles, physico-chemical parameters, in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of honeys and anti-browning effect of honeys on apple. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 17, 15–33. <https://doi.org/10.3233/MNM-230037>
- ❖Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371–382. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
- ❖Hamel, T., & Boulemtafes, A. (2017). Plantes butinées par les abeilles à la péninsule de l'Edough (Nord-Est algérien). *Livestock Research for Rural Development*, 29(9), 1–13.
- ❖Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Institut National Polytechnique de Toulouse-INPT; École nationale d
- ❖Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.631>
- ❖Khadra, L., Kamel, M., Hamama, B., Ibrahim, D., & Daoud, H. (2019). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of algerian bee pollen (*inula viscosa*) methanolic extract. *Int. J. Res. Pharm. Chem*, 9(9).
- ❖Kuk, M. S., & Dowd, M. K. (1998). Supercritical CO₂ extraction of rice bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(5), 623–628. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0075-y>
- ❖Kumar, R. C., Benal, M. M., Prasad, B. D., Krupashankara, M. S., Kulkarni, R. S., & Siddaligaswamy, N. H. (2018). Microwave assisted extraction of oil from pongamia pinnata seeds. *Materials Today: Proceedings*, 5(1, Part 3), 2960–2964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.094>
- ❖Laallam, H., Boughediri, L., & Bissati, S. (2011). Inventaire des Plantes Mellifères du Sud Ouest Algérien. Synthèse: *Revue Des Sciences et de La Technologie*, 23, 81–89.
- ❖Lavie, P., & Fresnaye, J. (1963). Étude expérimentale de la trappe à pollen en position supérieure. *Les Annales de l'Abeille*, 6(4), 277–301.
- ❖López-Bascón, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2020). Chapter 11 - Soxhlet Extraction. In C. F. B. T.-L.-P. E. Poole (Ed.), *Handbooks in Separation Science* (pp. 327–354). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
- ❖Louveaux, J. (1970). Atlas photographique d'analyse pollinique des miels. Service de la

répression des fraudes et du contrôle de la qualité.
<https://books.google.dz/books?id=eeMuHAAACAAJ>

- ❖ Luo, Y., Lu, L., Wortley, A. H., Li, D.-Z., Wang, H., & Blackmore, S. (2015). EVOLUTION OF ANGIOSPERM POLLEN. 3. MONOCOTS. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 101(2), 406–455. <http://www.jstor.org/stable/43916856>
- ❖ Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383–2389. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- ❖ Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96(8), 873–877. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.006>
- ❖ Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., & Singhal, R. S. (2017). Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives BT - Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications (M. Puri (ed.); pp. 171–201). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51639-4_8
- ❖ 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(3), 571–577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.006>
- ❖ Melin, E. (2011). Botanique apicole. Ecole d'Apiculture de La RÃ© Gion Wallonne & Institut de Botanique, UniversitÃ© de Liege, Belgique.
- ❖ Mohamed, E., Ali, M. A., & Ghazala, N. (2022). Evaluation of the Efficiency Different Types of Bee Pollen-Collection Traps in Honey Bee Colonies during Summer Season. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 30(1), 141–146. <https://doi.org/10.21608/ajs.2022.111909.1448>
- ❖ 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(2), 176–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.004>
- ❖ Nicolson, S. W. (2011). Bee Food: The Chemistry and Nutritional Value of Nectar, Pollen and Mixtures of the Two. *African Zoology*, 46(2), 197–204. <https://doi.org/10.3377/004.046.0201>
- ❖ Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Crude Pollen. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040322>
- ❖ Otmani, A., Amessis-Ouchemoukh, N., Mouhoubi-Tafinine, Z., Tighlit, K., Redouan, I., Terrab, A., & Ouchemoukh, S. (2022). Contribution of Organic Bee Pollen to the Determination of Botanical Origin of Honey and its Impact on its Biological Properties. *Current Bioactive Compounds*, 18(5), 66–77.
- ❖ Özcan, M. M., Aljuhaimi, F., Babiker, E. E., Uslu, N., Ceylan, D. A., Ghafoor, K., Özcan, M. M., Dursun, N., Ahmed, I. M., Jamiu, F. G., & Alsawmahi, O. N. (2019). Determination of Antioxidant Activity, Phenolic Compound, Mineral Contents and Fatty Acid Compositions of Bee

Pollen Grains Collected from Different Locations. *Journal of Apicultural Science*, 63(1), 69–79. <https://doi.org/doi:10.2478/jas-2019-0004>

❖Özkök, A. (2023). Bee Products and Palynology Arı Ürünleri ve Palinoloji. PROCEEDING BOOK, 194.

❖Penchev, P. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.

❖Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>

❖Rabiet, E. (1984). Plantes mellifères, plantes apicoles: Rapport entre les plantes et l'abeille domestique. Ed. Rabiet E., Grand Casablanca, Maroc. 424p.

❖Rasoloarijao, T. M., Ramavovololona, P., Ramamonjisoa, R., Clemencet, J., Lebreton, G., & Delatte, H. (2019). Pollen morphology of melliferous plants for *Apis mellifera unicolor* in the tropical rainforest of Ranomafana National Park, Madagascar. *Palynology*, 43(2), 292–320. <https://doi.org/10.1080/01916122.2018.1443980>

❖Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3)

❖Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen Structure and Function. *The Plant Cell*, 16(suppl_1), S46–S60. <https://doi.org/10.1105/tpc.017012>

❖Sethunga, M., Ranaweera, K., Munaweera, I., & Gunathilake, K. D. P. (2022). Recent advances in the extraction methods of essential oils and oleoresins from plant materials and its potential applications: A comprehensive review. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 5, 151–167. <https://doi.org/10.22059/jfabe.2022.347001.1126>

❖Taha, E.-K. A., Al-Kahtani, S., & Taha, R. (2019). Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 232–237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.003>

❖Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1122(1), 12095. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1122/1/012095>

❖Tarek, H., & Boulemtafes, A. (2017). Plantes butinées par les abeilles à la péninsule de l'Edough (Nord-Est algérien). *Livestock Research for Rural Development*, 29.

❖Tizón Alba, A., Aliaño-González, M. J., Palma, M., Fernández Barbero, G., & Carrera, C. (2023). Enhancing Efficiency of Enzymatic-Assisted Extraction Method for Evaluating Bioactive Compound Analysis in Mulberry: An Optimization Approach. In *Agronomy* (Vol. 13, Issue 10).

<https://doi.org/10.3390/agronomy13102548>

❖Tonhubthimthong, P., Chuaprasert, S., Douglas, P., & Luewisutthichat, W. (2001). Supercritical CO₂ extraction of nimbin from neem seeds – an experimental study. *Journal of Food Engineering*, 47(4), 289–293. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00131-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00131-X)

❖Velavan, S. (2015). Phytochemical techniques-a review. *World Journal of Science and Research*, 1(2), 80–91.

❖Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., & Chemat, F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction: An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*, 1174(1), 138–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.067>

❖Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>

❖Yédomonhan, H., Akoègninou, A., Tossou, G. M., & Akpagana, K. (2006). Potentialités de production de miel de la forêt classée de la lama (Bénin). *Journal de La Recherche Scientifique de l'Université de Lomé*, 8(2).

❖Žilić, S., Vančetović, J., Janković, M., & Maksimović, V. (2014). Chemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity and stability of floral maize (*Zea mays* L.) pollen. *Journal of Functional Foods*, 10, 65–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.007>

Annexes

Annexes 1 : Préparation des solutions

1- Bradford pour 500 ml

Solution de Bradford (500 ml)

$H_3PO_4 \rightarrow 50 \text{ ml}$

Éthanol $\rightarrow 25 \text{ ml}$

Bleu de Coomassie $\rightarrow 50 \text{ mg}$

Compléter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée

2- Préparation ABTS

$C = 7 \text{ mM}$

$MM = 514.62 \text{ g/mole}$

$1000 \text{ ml} \rightarrow 3.602 \text{ g}$

$100 \text{ ml} \rightarrow X$

$X = 0.36 \text{ g}$

3- Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)

$C = 2.45 \text{ mM}$

$MM = 270.33 \text{ g/mol}$

$1000 \text{ ml} \rightarrow 0.662 \text{ g}$

$100 \text{ ml} \rightarrow x$

$X = 0.066 \text{ g}$

4- DPPH :

$1 \text{ M} \rightarrow 394.33$

$6 \times 10^5 \text{ M} \rightarrow x$

$X = 0.0236 \text{ g}$

$1000 \text{ ml} \rightarrow 0.0236$

$100 \text{ ml} \rightarrow x$

$X = 0.0024 \text{ g}$

5- FRAP

- TPTZ = 0.15g \rightarrow 50ml l'eau distillé
- $FeCl_3 = 0.16 \text{ g} \rightarrow 50 \text{ ml}$ l'eau distillé
- Tampon d'acétate 2.46g \rightarrow 10ml l'eau distillé

Mélange de FRAP { 80ml Tampon d'acétate + 10ml $FeCl_3$ + 10ml TPTZ }

6- Acide Gallique

AG : 10 mg \rightarrow 20ml

Annexe 2 : Les Courbes d'étalonnages :

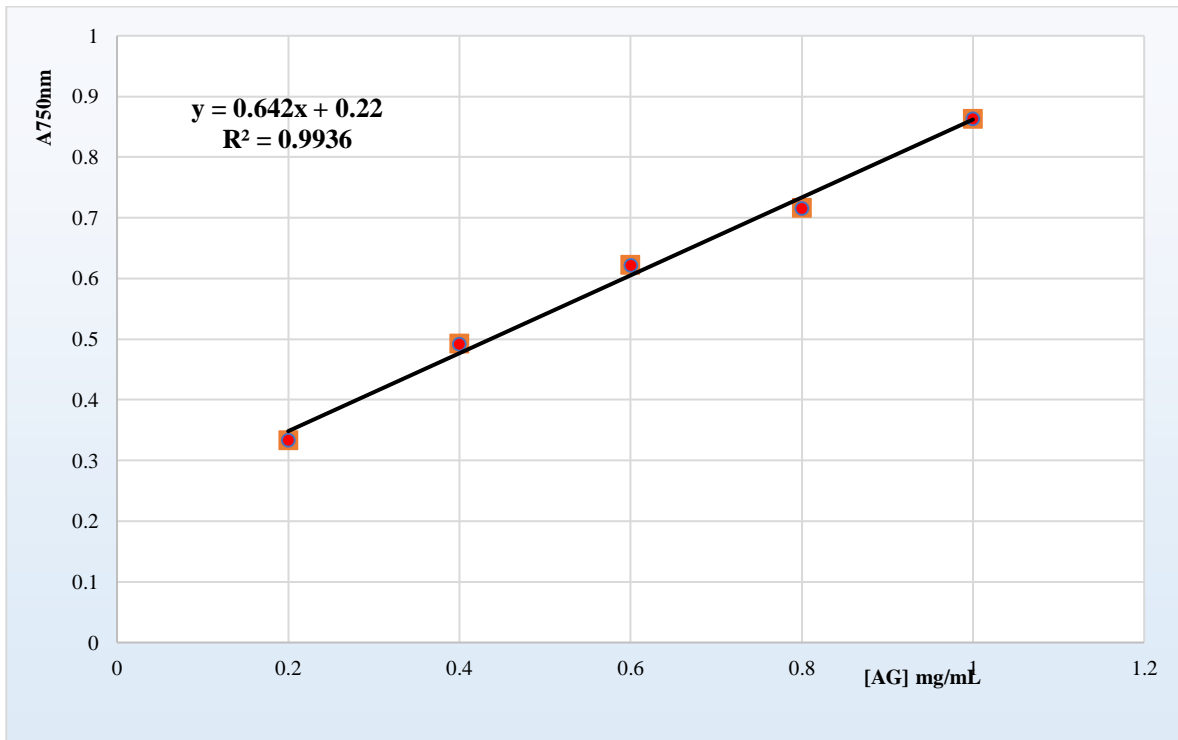


Figure 01 : courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux.

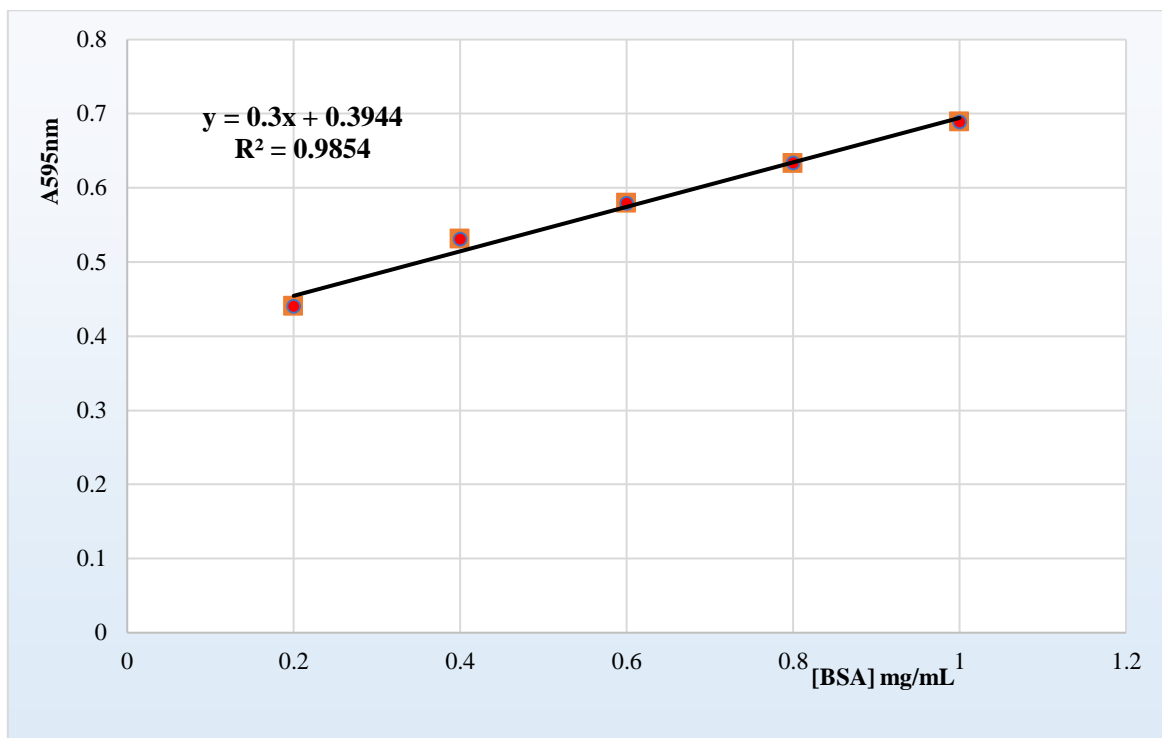


Figure 02 : courbe d'étalonnages des protéines.

Résumé :

Cette étude comparative vise à comparer l'efficacité de deux méthodes d'extraction du pollen, l'agitation et l'ultrasonication, pour obtenir des extraits riches en antioxydants. Les échantillons de pollen ont été prélevés dans cinq régions différentes de Béjaïa, à savoir Souk El Ténine, Tighremt, Aokas, Adekar et Kherrata, afin de refléter la diversité botanique de la région. Les extraits obtenus ont été analysés pour leur teneur en composés phénoliques totaux et leur capacité antioxydante, à l'aide de tests reconnus tels que le pouvoir réducteur, le test FRAP, l'activité anti-radicalaire DPPH et le test ABTS, qui permettent de mesurer la capacité des extraits à neutraliser les radicaux libres, des composés associés au stress oxydatif et à diverses maladies. Les résultats ont révélé des différences significatives entre les méthodes d'extraction, tant en termes de rendement que d'activité antioxydante. Les extraits obtenus par ultrasonication ont montré une teneur plus élevée en composés phénoliques totaux et une capacité antioxydante plus importante que ceux obtenus par agitation. Ces résultats suggèrent que l'ultrasonication est une méthode plus efficace pour extraire des composés bioactifs du pollen. De plus, l'étude a évalué l'activité antibactérienne des extraits contre des souches de référence d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*, démontrant une activité significative pour les deux méthodes d'extraction, soulignant ainsi le potentiel des extraits de pollen comme agents antibactériens. En conclusion, cette recherche met en évidence l'efficacité supérieure de l'ultrasonication par rapport à l'agitation pour extraire des composés bioactifs du pollen, offrant ainsi des extraits présentant une activité antioxydante et antibactérienne supérieure. Ces résultats ouvrent la voie à de futures études sur l'utilisation potentielle des extraits de pollen dans diverses applications, notamment dans le domaine de la santé et de l'alimentation.

Mots clés : extraction, ultrasonication, agitation, pollen, antioxydants.

Abstract :

This comparative study aims to compare the effectiveness of two pollen extraction methods, agitation and ultrasonication, in obtaining antioxidant-rich extracts. Pollen samples were collected from five different regions in Béjaïa, namely Souk El Ténine, Tighremt, Aokas, Adekar, and Kherrata, to reflect the botanical diversity of the region. The obtained extracts were analyzed for their total phenolic content and antioxidant capacity using recognized tests such as reducing power, the FRAP assay, DPPH radical scavenging activity, and the ABTS assay, which measure the ability of the extracts to neutralize free radicals, compounds associated with oxidative stress and various diseases. The results revealed significant differences between the extraction methods in terms of both yield and antioxidant activity. The extracts obtained by ultrasonication showed higher total phenolic content and greater antioxidant capacity than those obtained by agitation. These findings suggest that ultrasonication is a more effective method for extracting bioactive compounds from pollen. Furthermore, the study evaluated the antibacterial activity of the extracts against reference strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, demonstrating significant activity for both extraction methods, thus highlighting the potential of pollen extracts as antibacterial agents. In conclusion, this research highlights the superior effectiveness of ultrasonication compared to agitation for extracting bioactive compounds from pollen, offering extracts with superior antioxidant and antibacterial activity. These results pave the way for future studies on the potential use of pollen extracts in various applications, particularly in the fields of health and food.

Keys words : extraction, ultrasonication, agitation, pollen, antioxidants.

ملخص:

تهدف هذه الدراسة المقارنة إلى مقارنة فعالية طريقتين لاستخراج حبوب اللقاح، التحريك والموجات فوق الصوتية، في الحصول على مستخلصات غنية بمضادات الأكسدة. تم جمع عينات حبوب اللقاح من خمس مناطق مختلفة في بجاية، وهي سوق الاثنتين، تيغريميت، أوقاس، أدكار وخراطة، لتعكس التنوع النباتي في المنطقة. تم تحليل المستخلصات المستحصلة لتحديد محتواها من المركبات الفينولية الكلية وقدرتها المضادة للأكسدة باستخدام اختبارات معترف بها مثل القدرة الاختزالية، اختبار FRAP، نشاط مكافحة الجذور الحرة DPPH، واختبار ABTS، والتي تقيس قدرة المستخلصات على تحييد الجذور الحرة، وهي مركبات مرتبطة بالإجهاد التأكسدي والعديد من الأمراض. أظهرت النتائج اختلافات كبيرة بين طرق الاستخلاص من حيث العائد والنشاط المضاد للأكسدة. أظهرت المستخلصات التي تم الحصول عليها باستخدام الموجات فوق الصوتية محتوى أعلى من المركبات الفينولية الكلية وقدرة أكبر على مضادات الأكسدة مقارنة بتلك المستخلصة بالتحريك. تشير هذه النتائج إلى أن الموجات فوق الصوتية هي طريقة أكثر فعالية لاستخراج المركبات النشطة بيولوجيًا من حبوب اللقاح. علاوة على ذلك، قيمت الدراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات ضد سلالات مرجعية من الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية، مما أظهر نشاطًا كبيرًا لكلا طريقتي الاستخلاص، مما يبرز بذلك إمكانيات مستخلصات حبوب اللقاح كعوامل مضادة للبكتيريا. في الختام، تسلط هذه الدراسة الضوء على فعالية الموجات فوق الصوتية الفعالة مقارنة بالتحريك لاستخراج المركبات النشطة بيولوجيًا من حبوب اللقاح، مما يقدم مستخلصات ذات نشاط مضاد للأكسدة ومضاد للبكتيريا أعلى. تقترح هذه النتائج الطريق لدراسات مستقبلية حول الاستخدام المحتمل لمستخلصات حبوب اللقاح في تطبيقات مختلفة، خاصة في مجالات الصحة والتغذية.

الكلمات المفتاحية: استخراج، التردد الفوقي، الاهتزاز، غبار اللقاح، مضادات الأكسدة.