

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



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Laboratoire de Biochimie Appliquée

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par
M^{lle} BEDJIH Farida

Thème

**Composition chimique et propriétés biologiques de quelques
échantillons de pollens Algériens**

Soutenue le : 22/10/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. KECHA Mouloud

Professeur

Univ. de Béjaïa

Président

M. OUCHEMOUKH Salim

Professeur

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

Mme KHETTAL Bachra

Professeur

Univ. de Béjaïa

Examinatrice

Mme DEBBACHE Nadjat

Professeur

Univ. de Béjaïa

Examinatrice

M. BOURNINE Lamine

MCA

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2025/2026

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers Dieu, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force, la santé et la patience nécessaires à l'achèvement de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Pr OUCHEMOUKH Salim qui m'a encadré et guidé avec une rigueur scientifique exemplaire tout au long de la réalisation de cette thèse. Je lui suis reconnaissante pour ses précieux conseils et son soutien constant. Sa modestie et sa disponibilité ont été des atouts inestimables. Merci, Monsieur, pour tout le savoir que vous m'avez transmis et pour les commentaires qui ont enrichi ce travail.

Je souhaite également exprimer mes vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail : Pr KECHA Mouloud, Pr KHETTAL Bachra et Pr DEBBACHE Nadjat, de l'université de Béjaïa, et Mr BOURNINE Laminé de l'université de Bouira. Je leur suis reconnaissante pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma thèse et pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'examiner mon travail. Vos remarques et suggestions apporteront des améliorations significatives et donneront à ma thèse une valeur ajoutée.

Je remercie Mme Sevgi KOLAYLI, professeur à l'université de Karadeniz en Turquie, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis de mener à bien mon projet de recherche en mettant à ma disposition les ressources nécessaires et en sollicitant l'aide d'autres laboratoires.

Je suis également reconnaissante envers Mr Yacup KARA pour sa présence, son écoute, ses conseils et son accompagnement, notamment en ce qui concerne la technique HPLC.

Mes remerciements vont à Mr Ali Osman BELDÜZ, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire, me permettant ainsi d'acquérir de nombreuses compétences, en particulier dans le domaine de la microbiologie et de la biologie moléculaire.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Mr Cihan INAN, professeur de biologie moléculaire à l'université de Karadeniz. Son aide, ses conseils et son orientation ont été

précieux. Je suis impressionnée par ses qualités humaines. Un grand merci également à toute son équipe, en particulier à Ikra Özkan.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire de microbiologie médicale (Farabi) à Trabzon, notamment le professeur Ali Osman Kılıç et ses collaborateurs Osman Birol Özgümüş, Ulku, Inci et Burak. Dans ce laboratoire, j'ai découvert la véritable signification de l'esprit d'équipe et du travail collaboratif.

Je tiens à remercier chaleureusement Pr AMESSIS-OUCHEMOUKH Nadia pour son aide, ses conseils avisés et ses encouragements qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je ne saurais jamais assez remercier Mr OTMANI Amar pour ses conseils, ses explications et ses clarifications, notamment en microbiologie et en biostatistiques.

Je souhaite également remercier Mr ZAIDI Hicham et GUENAOUI Nawel pour leur aide et leur disponibilité à répondre à toutes mes questions.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres du laboratoire de biochimie appliquée pour leur aide très précieuse et à l'ensemble du personnel du département de BPC qui m'a enseignée et encouragée.

Un immense merci à mes parents, mon frère et ma sœur pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce travail que je dédie :

A mes Chers parents qui ne cessent de m'encourager et de prier pour moi, que Dieu vous
garde longtemps près de nous.

A ma sœur et mon frère, je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et
de réussite.

A toutes mes amies.

A tous ceux que j'aime et que j'estime.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail et qui m'ont
soutenu moralement.

Farida

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le pollen d'abeille

I.	Définition	4
II.	Le pollen, de la fleur à la ruche	5
II.1	Grain de pollen : fonction et structure	5
II.2	Récolte du pollen par l'abeille	6
II. 2. 1	Relation fleur-abeille	6
II. 2. 2	Récolte du pollen par l'abeille	7
II.3	Devenir du pollen collecté	9
III.	Collecte du pollen par l'Homme	10
III. 1	Sélection des colonies	11
III. 2	Types de récoltes	11
IV.	Processus du traitement	12
V.	Mélessopalynologie et identification de l'origine botanique	14
V. 1	Définition de la mélessopalynologie	14
V. 2	Importance de la détermination de l'origine botanique	14
V. 3	Identification du pollen	16
V. 4.	Aspect physique de pollen d'abeille	19
V. 4. 1	La forme	19
V. 4. 2	La couleur	19

Chapitre II : Composition et valeur nutritionnelle

I.	Composition	21
I.1	Eau	21
I.2	Glucides	21
I.3	Protéines et acides amines	21
I.4	Lipides et acides gras	22
I.5	Vitamines	23
I.6	Minéraux	24

I.7	Composés bioactifs.....	24
I.8	Flore microbienne	25
II.	Applications alimentaires et statut de sécurité du pollen d'abeille.....	25
II.1	Pollen d'abeille : un aliment fonctionnel	25
II.2	Applications et utilisations alimentaires.....	26
II.3	Sécurité et risques de consommation	27
II.4	Législation	28

Chapitre III : Composés bioactifs et activités biologiques

I.	Composés bioactifs dans le pollen d'abeille	29
I. 1	Polyphénols.....	29
I.1. 1	Acides phénoliques	30
I.1. 2	Flavonoïdes	31
I.1.3	Anthocyanidines	36
I.1.4	Stilbènes.....	37
I.1. 5	Lignanes.....	37
I.1. 6	Coumarines	37
I.1. 7	Tanins	38
I. 2	Caroténoïdes	38
II.	Activités biologiques du pollen d'abeille	39
II. 1	Activité antioxydante.....	39
II. 2	Activité antibactérienne	41
II. 3	Activité anti-inflammatoire.....	41
II. 4	Activité cicatrisante	42
II. 5	Activité antivirale	43
II. 6	Activité anticancéreuse	43
II. 7	Effets cardioprotecteurs	44
II. 8	Propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiques	44
II. 9	Activité hépatoprotectrice et détoxifiante.....	44
II. 10	Effet sur l'hyperplasie bénigne de la prostate	45

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.	Analyses polliniques.....	47
II.	Préparation des extraits de pollen.....	47
III.	Analyses physico-chimiques	47

III. 1	Couleur	47
III. 2	Dosage des protéines.....	48
III. 3	Dosage des minéraux	48
IV.	Dosage des antioxydants	48
IV.1	Composés phénoliques totaux.....	48
IV.2	Flavonoïdes	49
IV.3	Proanthocyanidines	49
IV.4	Caroténoïdes	50
V.	Activités antioxydantes	50
V. 1	Activité anti-radicalaire DPPH (Scavenger).....	50
V. 2	Activité anti-radicalaire ABTS	51
V. 3	Test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	51
V. 4	Pouvoir réducteur	52
VI.	Analyse HPLC: High performance liquid chromatography.....	52
VII.	Activité antimicrobienne	53
VII.1	Test de sensibilité	54
VII.2	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	54
VIII.	Activités enzymatiques	55
VIII.1	Activité anti-AChE.....	55
VIII.2	Activité anti- α -glucosidase.....	55
VIII.3	Activité SOD	56
IX.	Test de viabilité cellulaire	56
X.	Test de cicatrisation (Scratch assay)	57
XI.	Activité antivirale	58
XII.	Activité protectrice d'ADN	58
XII.1	Effets des extraits sur l'ADN	58
XII.2	Protection de l'ADN contre la réaction de Fenton	59
XIII.	Analyses statistiques	59

Chapitre II : Résultats et discussion

I.	Analyses polliniques.....	60
II.	Analyses physico-chimiques.....	67
II. 1	Couleur	67
II. 2	Teneurs en protéines.....	68
II. 3	Teneurs en minéraux	70
III.	Teneurs en antioxydants.....	72

III.1	Composés phénoliques totaux.....	72
III.2	Flavonoïdes	75
III.3	Proanthocyanidines	76
III.4	Caroténoïdes	77
IV.	Analyse HPLC.....	79
V.	Activités antioxydantes.....	83
V.1	Activité anti-radicalaire DPPH (Scavenger).....	83
V.2	Activité anti-radicalaire ABTS	86
V.3	Test de FRAP	87
V.4	Pouvoir réducteur	89
VI.	Activité antimicrobienne	91
VII.	Activités enzymatiques	94
VII.1	Activité anti- AChE	94
VII.2	Activité anti- α -glucosidase.....	96
VII.3	Activité de la SOD.....	97
VIII.	Test de viabilité cellulaire	98
IX.	Activité cicatrisante	98
X.	Activité antivirale	100
XI.	Activité protectrice d'ADN	103
XI.1	Effets des extraits sur l'ADN.....	103
XI.2	Effets des extraits sur l'ADN contre la réaction de Fenton.....	104
XII.	Corrélations	106
XII.1	Corrélations couleur composés bioactifs et activités antioxydantes.....	106
XII.1.1	Corrélations entre couleur et composés bioactifs	106
XII.1.2	Corrélation entre composés bioactifs et activités antioxydantes	106
XII.2	Corrélation entre composés bioactifs et activité antibactérienne	109
XII.3	Corrélation entre les composés bioactifs et l'activité enzymatique.....	111
XII.4	Corrélation entre les composés bioactifs et l'activité antivirale.....	112
XIII.	Analyse en composantes principales (ACP)	115
	Conclusion	117
	Références bibliographiques	120
	Annexes	

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ABTS : 2,2-azino- bis-3- éthylbenzothiazoline-6-sulfonate

AChE: Acétylcholinestérase

ACP: Analyse en composantes principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

A-glu: α -glucosidase

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens

AMPK/Sirt1: AMP-activated protein kinase/ sirtuine 1

ANOVA: Analysis of one variance

ATCC: American type culture collection

Bcl-2: B cell lymphoma 2

BSA: Bovin serum albumin

CETAM: Centre d'études techniques apicoles de Moselle (France)

CFU: Unité formant colonie

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice

COX : Cyclooxygénase

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH: 2,2-diphinol-1-picrylhydrazyl

DTNB: 5,5'Dithiobis [2-nitrobenzoic acid]

DZI : Diamètre de zone d'inhibition

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAO : Food and Agriculture Organisation (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture).

FDA: Food and drug administration

FRAP: Ferric Reducing Antioxydant Power

HPLC: High performance liquid chromatography

HSV-1: Herpes simplex virus-1

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

ICP OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy
(Spectroscopie d'Émission Optique à Plasma Couplé Inductivement)

IgE : Immunoglobulin E

iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase (Oxyde nitrique synthase inductible)

LOX : Lipooxygénase

MDA : Malondialdéhyde

MEB: Microscopie électronique à balayage

MHB: Mueller Hinton Broth (bouillon Mueller-Hinton)

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NBT: Nitroblue TetrazoliumTest

NFκB: Nuclear Factor kappa B

O₂⁻ : Anion superoxide

OH[•] : Radical hydroxyle

OMC: Organisation mondiale du commerce

OMS: Organisation mondiale de la santé

PBS: Phosphate buffer salin (tampon phosphate)

PGE2 : prostaglandine E2

pNPB: p-nitrophényl butyrate

pNPG: p-nitrophényl-α-Dglucopyranoside

Rpm: Rotation par minute

SDB: Sabouraud Dextrose Broth (bouillon de Sabouraud-dextrose)

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SOD: Superoxyde dismutase

TEA: triéthylamine

TNB⁻ : 5-thio-2-nitrobenzoate

TPTZ: 2,4,6-tripyridyl-1,3,5-s-triazine

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1: Grains de pollen d'abeille	4
Figure 2: Représentation schématique d'une fleur bisexuée	5
Figure 3: Structure d'un grain de pollen	6
Figure 4: Processus de collecte du pollen par les abeilles	9
Figure 5: Trappe à pollen installée à l'entrée d'une ruche	11
Figure 6: Les différentes formes de grains de pollen	16
Figure 7: Principaux types d'ouvertures	18
Figure 8 : Structure chimique de quelques acides phénoliques	31
Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes	32
Figure 10 : Structure chimique de quelques flavonols.	33
Figure 11 : Structure chimique de quelques flavanols.	34
Figure 12 : Structure chimique de quelques isoflavones	34
Figure 13 : Structure chimique de quelques flavanones	35
Figure 14 : Structure chimique de quelques flavones	36
Figure 15 : Structure chimique de quelques anthocyanidines	36
Figure 16 : Structure chimique de la coumarine.....	37
Figure 17 : Les extraits des échantillons de pollens d'abeilles.....	47
Figure 18 : Les familles botaniques identifiées dans les échantillons de pollens étudiés.	61
Figure 19 : Couleur des pollens d'abeilles à 450 nm.	67
Figure 20 : Teneurs en protéines des pollens d'abeilles	69
Figure 21 : Teneurs en composés phénoliques totaux des pollens d'abeilles analysés.....	73
Figure 22 : Teneurs en flavonoïdes dans les pollens d'abeilles analysés	75
Figure 23 : Teneurs en proanthocyanidines dans les pollens d'abeilles étudiés.....	77
Figure 24 : Teneurs en caroténoïdes des pollens d'abeilles étudiés.....	78
Figure 25 : Chromatogrammes des composés phénoliques standards	79
Figure 26 : Activité antiradicalaire DPPH des pollens d'abeilles étudiés.	83
Figure 27 : Activité antiradicalaire ABTS des pollens d'abeilles étudiés	86
Figure 28 : Activité FRAP des pollens d'abeilles étudiés	88
Figure 29 : Pouvoir réducteur des pollens d'abeilles étudiés.	89
Figure 30 : Photographie des résultats de l'activité antibactérienne	92
Figure 31 : Résultats du test de la cicatrisation.	99
Figure 32 : Résultats de l'activité antivirale (anti-HSV-1).	100

Figure 33 : Viabilité des cellules après contact avec HSV-1.	101
Figure 34 : Effet des extraits de pollen d'abeille sur l'ADN plasmidique	104
Figure 35 : Effets protecteurs des extraits sur l'ADN plasmidique pBR322 superenroulé contre la réaction de Fenton	104
Figure 36 : ACP des échantillons de pollen d'abeille	116
Figure 37 : Cercle de corrélations entre la couleur, les composés bioactifs et les activités biologiques	116

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I: Composition du pollen d'abeille et besoins nutritionnels en vitamines	23
Tableau II: Composition du pollen d'abeille en minéraux	24
Tableau III : Régions de récolte des échantillons et leurs images respectives.....	46
Tableau IV : Programme de gradient du détecteur RP-HPLC-UV.....	53
Tableau V: Résultats de l'analyse pollinique des 14 échantillons de pollen d'abeille	65
Tableau VI: Teneurs minérales des 14 échantillons de pollen d'abeille (mg/Kg)	70
Tableau VII : Composés phénoliques des 14 échantillons de pollen d'abeille détectés par HPLC (µg/g).....	82
Tableau VIII : Résultats de l'activité antibactérienne des échantillons de pollen d'abeille....	91
Tableau IX: Résultats des activités enzymatiques des pollens étudiés	94
Tableau X: Corrélation entre couleurs et activités antioxydantes avec les composés bioactifs	108
Tableau XI : Corrélation composés bioactifs et activité antibactérienne	110
Tableau XII : Corrélation entre activité enzymatique et antivirale avec les composés bioactifs.....	114

Introduction

Introduction

La relation de l'être humain aux produits apicoles (le miel, le pollen, la gelée royale et la cire d'abeille) n'est pas récente. Les premières traces de la récolte de ces produits par l'Homme proviennent des peintures rupestres découvertes en 1919 en Espagne près de Valence. La peinture qui remonte à une période estimée de 8000 à 5000 ans avant Jésus-Christ montre une personne prélevant du miel d'abeilles sauvages. Plus tard, dans l'antiquité, notamment en Grèce, en Chine et en Égypte, les produits apicoles n'étaient pas seulement des produits très appréciés mais ils étaient largement utilisés en médecine et ils avaient une grande importance dans les rituels religieux de presque tous les cultes (**Kieliszek et al., 2018 ; Khalifa et al., 2021**).

Le pollen d'abeille est l'un de ces produits tant considéré comme précieux. Les anciens Égyptiens le décrivent comme "la poussière donnant la vie". Hippocrate et Pythagore sont les personnages historiques les plus connus ayant parlé du pollen d'abeille, ils le considéraient comme un produit à grands effets thérapeutiques. Néanmoins, il n'a commencé à être largement utilisé pour la consommation humaine qu'après la seconde guerre mondiale suite à l'invention des trappes à pollen (**Campos et al., 2010 ; Abdelnour et al., 2019**). Actuellement, la production mondiale de pollen d'abeille est d'environ 1500 tonnes par an. Les pays producteurs en tête de liste sont : la Chine, l'Australie et l'Argentine (**Sipos et al., 2020**).

Ces dernières années, l'intérêt pour les produits alimentaires écologiques, plus fonctionnels, équilibrés et plus sains a augmenté. Les entreprises de l'industrie alimentaire tentent de plus en plus de trouver des sources alimentaires naturelles à haute valeur nutritionnelle avec un potentiel de promotion de la santé, ce qui a conduit à accorder plus d'attention aux produits de la ruche, notamment le pollen d'abeille (**Bobis et al., 2010**). Alors que le marché mondial du pollen d'abeille continue de croître, sa valeur était évaluée à 795,98 millions de dollars en 2024 selon Allied Market Research, qui est une société d'études de marché, avec une prévision d'atteindre 1,4 milliard de dollars d'ici 2033, ce qui montre une augmentation significative de la demande pour ce produit.

Le pollen d'abeille résulte de l'agglutination du pollen de diverses espèces de fleurs visitées par l'abeille domestique *Apis mellifera*, ajouté de nectar ou de miel et de substances salivaires. C'est un produit alimentaire complet, étant l'un des rares aliments qui contient tous les acides aminés essentiels mais aussi d'autres composés tels que les protéines, les glucides, les lipides, les vitamines, les minéraux et les composés bioactifs tels que les polyphénols et les caroténoïdes (**Dias et al., 2016 ; Koroglu, 2018**). Sa composition varie en fonction de son origine botanique et géographique mais d'autres facteurs tels que la nature du sol et le comportement des abeilles peuvent également avoir un impact (**Khalifa et al., 2021**). Cette richesse et diversité de composition fait de ce produit un aliment précieux, distinguable des autres produits apicoles et lui donne un grand potentiel et un large éventail d'applications thérapeutiques. Il est d'ailleurs considéré comme un complément alimentaire de plus en plus populaire (**Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016**).

Les études faites sur le pollen d'abeille ont montré qu'il contient des substances biologiquement actives telles que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les caroténoïdes qui lui confèrent des propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, cicatrisantes, anticancéreuses, cardioprotectrices, hépatoprotectrices et détoxifiantes). De plus, il a été démontré que l'utilisation quotidienne de ce produit peut contribuer à améliorer les fonctions oculaires, cutanées, cardiovasculaires ou coliques (**Koroglu, 2018**). Le pollen d'abeille a démontré aussi des effets significatifs sur l'activité de certaines enzymes impliquées dans divers processus biologiques, notamment la superoxyde dismutase (SOD), qu'il active, contribuant ainsi positivement au processus antioxydant. De plus, il pourrait protéger contre le diabète et la maladie d'Alzheimer en inhibant l' α -glucosidase et l'acétylcholinestérase (AChE), respectivement (**Silva Araújo et al., 2017 ; Tutun et al., 2021**).

En Algérie, les études sur le pollen d'abeille se sont intéressées notamment à sa composition phytochimique et ses activités biologiques prometteuses, tout en soulignant l'influence de son origine géographique et botanique.

L'étude de Rebiai et Lanez (2012) a montré le potentiel antioxydant des pollens du nord-ouest algérien, où le pollen de Boufarik, en particulier, a présenté une forte activité corrélée à sa teneur élevée en composés phénoliques. Par ailleurs, la caractérisation chimique approfondie par Bakchiche et al. (2020) sur le pollen de Laghouat a révélé une très forte teneur en composés phénoliques totaux et a mis en lumière le profil nutritif, les acides gras ainsi que les

teneurs en minéraux des pollens algériens, confirmant leur pertinence en tant que supplément alimentaire riche et source de composés bioactifs importants.

Complémentairement, Mokhtari et al. (2022) ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires des pollens du nord-est algérien, consolidant l'intérêt pharmacologique de ce produit au-delà de sa fonction antioxydante. Les études de Boulfous et al. (2025) sur des échantillons de Mila ont démontré une forte corrélation entre les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes et une forte capacité antioxydante (DPPH, FRAP).

L'ensemble de ces recherches souligne une diversité de propriétés du pollen selon son origine florale et géographique et valide son statut de super-aliment et de ressource précieuse pour des applications notamment en pharmacologie.

Au cours de ces dernières décennies, des problématiques telles que la résistance aux antibiotiques, les effets secondaires des inhibiteurs d'enzymes et la propagation des virus suscitent une grande préoccupation pour la santé publique (**Silva Araújo et al., 2017 ; Kamboj et al., 2012**), il est donc essentiel de trouver de nouvelles alternatives. Dans ce contexte précisément, le pollen d'abeille émerge comme un produit très prometteur en raison de ses activités biologiques.

Les études et les publications scientifiques menées sur le pollen d'abeille dans le monde en général et surtout en Algérie sont peu par rapport aux autres produits apicoles. Pour cela, dans ce travail, 14 échantillons de pollens d'abeilles sont récoltés de différentes régions de l'Algérie dans le but d'étudier leur composition (familles botaniques, minéraux et composés bioactifs) et propriétés biologiques (antioxydante, antimicrobienne, enzymatiques, cicatrisante et antivirale) afin de mieux connaître et de valoriser cette ressource.

Ce travail sera développé en deux parties comme suit :

- Une partie bibliographique qui donne dans un premier lieu des concepts clés et des notions relatives au pollen d'abeille, sa production, sa conservation et ses activités biologiques.
- Une partie expérimentale qui présente le matériel d'étude, les techniques et les différents tests utilisés ainsi que les résultats obtenus avec leur discussion.

*Synthèse
bibliographique*

*Chapitre I : Généralités
sur le pollen d'abeille*

Chapitre I : Généralités sur le pollen d'abeille

I. Définition

Le mot pollen vient du grec «palé » qui signifie la poussière, dont le sens est proche du mot latin pollen qui veut dire fine farine. Ce nom est alors approuvé dès le XVII^e siècle pour désigner le produit apicole nommé autrefois « nourriture ». Le pollen représente l'organe reproducteur mâle dans les fleurs des angiospermes, il est produit et diffusé dans le cadre du processus de la reproduction. Il se présente sous forme de grains contenus dans les anthères des étamines ayant selon l'origine florale des morphologies différentes (**Le conte, 2005 ; Bogdanov, 2017**).

Le pollen d'abeille est le résultat final de l'agglutination des grains de pollen récoltés par des ouvrières appartenant à l'abeille domestique *Apis mellifera* dans le but de nourrir les larves dans les premiers stades du développement. Il est tout de même indispensable à la croissance et à la reproduction d'autant plus qu'il représente l'unique source de protéines dans la ruche, le rendant ainsi un élément incontournable à la colonie. Les sécrétions glandulaires des abeilles, le nectar et le miel servent à garder ces grains de pollen maintenus ensemble (Figure 1) (**Campos et al., 2008 ; El Ghouizi et al., 2023**).



Figure 1: Grains de pollen d'abeille (**Kieliszek et al., 2023**).

Le Codex Alimentarius (2001) le définit comme "le produit de la collecte des abeilles à partir des étamines des fleurs, combiné avec des sécrétions provenant de la source botanique, et qui a été transporté par les abeilles dans la ruche".

II. Le pollen, de la fleur à la ruche

II.1. Grain de pollen : fonction et structure

A la base, le pollen se trouve dans les anthères des fleurs contenant des gamétophytes mâles qui sont indispensables à la reproduction des plantes (Figure 2). Il est soit distribué par le vent dans le cas des plantes anémophiles (pollinisées par le vent) ou par un insecte dans le cas des plantes entomophiles (pollinisées par les insectes) pour atteindre le gamète femelle (Malihah Mohammad *et al.*, 2021).

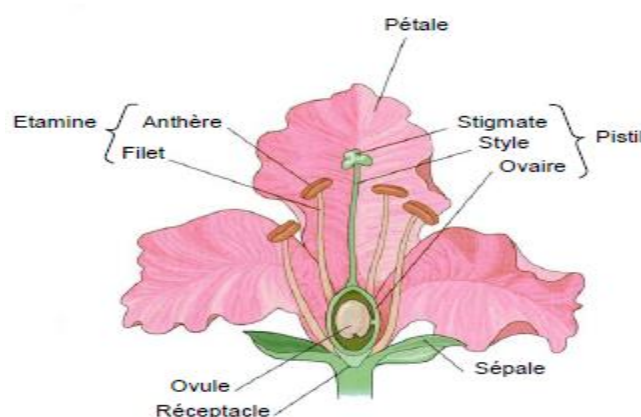


Figure 2: Représentation schématique d'une fleur bisexuée (Campbell et Reece, 2004).

Le pollen d'abeille se présente sous forme de grains de 2,5 à 250 μm , le grain de pollen est enveloppé par une paroi cellulaire à double couche : une interne appelée intine et une externe appelée exine. La couche d'exine est constituée de sporopollénine, une structure solide permettant une forte résistance aux facteurs physico-chimiques. La couche intine est constituée de cellulose et de pectine ayant une structure sensible comparativement à l'exine (Figure 3). Cette structure multicouche garantit que les grains de pollen résistent aux bactéries et les préserve également contre des facteurs environnementaux tels que la température, les changements de pH ou les rayonnements ultraviolets. A la surface de l'exine, il existe de nombreux pores et des sillons ainsi qu'une couche de baume qui facilitent le collage du pollen sur le corps des abeilles.

Les formes, couleurs, tailles et poids des grains de pollen sont multiples et variés en fonction de l'espèce végétale d'origine. Les formes des grains sont diverses et peuvent être : rondes, cylindriques, en forme de cloche, triangulaires ou épineuses. Quant au poids, il peut aller d'une à plusieurs dizaines de microgrammes. En terme de couleurs, il couvre un spectre

assez large allant du jaune clair jusqu'au noir (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015 ; Aylanc *et al.*, 2021).

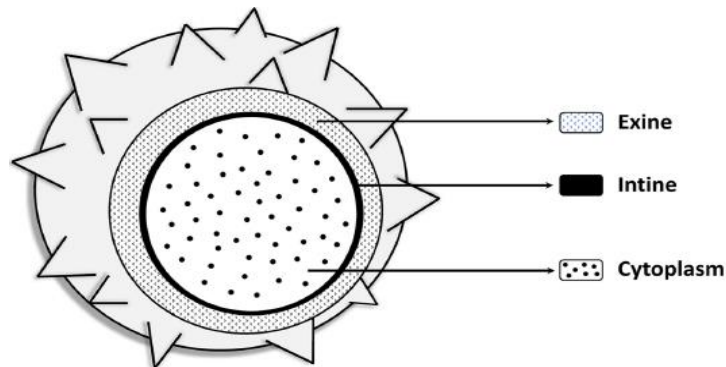


Figure 3: Structure d'un grain de pollen (Aylanc *et al.*, 2021).

II.2. Récolte du pollen par l'abeille

II.2.1. Relation fleur-abeille

En plus de l'eau, les abeilles mellifères récoltent deux aliments nécessaires à la survie et à la santé de leurs colonies, à savoir le nectar et le pollen. Le nectar, principalement produit par les glandes nectarifères des plantes, constitue la matière première pour la production du miel représentant ainsi la source des glucides. Cependant, les grains de pollen fournissent d'autres nutriments tels que des lipides, des protéines, des vitamines et des minéraux (Winston, 1987).

L'interaction entre la fleur et l'abeille est une relation remarquable, reliant les mondes végétal et animal dans laquelle les fleurs assurent leur reproduction sexuée, tandis que les abeilles se nourrissent de nectar et de pollen. Ce qui semble être une rencontre improbable entre des univers si distincts, celui des plantes et celui des insectes, se révèle en réalité être une vaste symbiose. L'abeille offre un service essentiel qui est le transport des grains de pollen. En contrepartie, elle reçoit en retour sa nourriture vitale : le nectar et le pollen (Louveaux, 1990). À cet égard, chacun des deux impliqués dans cette relation, à savoir la fleur et l'abeille, a développé des mécanismes pour en tirer le maximum d'avantages. Les fleurs adoptent de nombreuses techniques, telles que la coloration de leurs pétales et l'émission des parfums appelés phéromones pour attirer l'abeille pollinisatrice et se reproduire éventuellement. L'abeille de son côté s'est adaptée physiquement pour transporter le pollen vers la ruche en le collectant dans des sacs à pollen sur ses pattes postérieures (El Ghouizi *et al.*, 2023).

II.2.2. Récolte du pollen par l'abeille

Les abeilles ouvrières effectuent des centaines de vols vers les fleurs pour collecter la quantité nécessaire du pollen et du nectar. Cette opération s'appelle le butinage et elle est hautement vitale et nécessaire pour la survie des colonies d'abeilles.

Etant donné que la ruche est une organisation hiérarchisée, le butinage est un comportement qui se développe chez une catégorie des abeilles ouvrières âgées à partir de l'âge de 21 jours où elles sont désignées comme « butineuses ». Avant cet âge, elles s'occupent des tâches à l'intérieur de la ruche. Les jeunes butineuses effectuent plusieurs vols de reconnaissance pour trouver leurs repères et à l'âge de 21 jours, elles quitteront leurs ruches pour rechercher et récolter du nectar, du miellat, du pollen, de l'eau et de nombreux éléments essentiels, ainsi que la résine utilisée pour maintenir l'asepsie de la ruche (**El Ghouizi et al., 2023**).

La récolte du pollen par les abeilles se fait principalement à la fin de l'hiver et au printemps. La quantité de pollen produite par jour varie considérablement d'une ruche à l'autre parce que chaque colonie a son propre comportement. Dans la journée, une abeille butineuse fait généralement plusieurs sorties. Chaque sortie dure en moyenne une dizaine de minutes (entre 5 et 15 minutes) durant laquelle elle collecte deux pelotes de pollen. Chaque pelote pèse en moyenne 7,57 mg, ce qui fait donc une charge totale d'environ 15 mg par vol. Le poids de ces pelotes ne varie pas énormément, allant de 4,2 mg à 10,7 mg (**Louveaux, 1990**).

Ainsi, une colonie d'abeilles peut collecter de 50 à 250 g de pollen par jour (15 à 40 Kg/an) (**Komosinska-Vassev et al., 2015**). La quantité et la qualité du pollen collecté peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs tels que les conditions extérieures du vol, les fleurs visitées, la saison, l'emplacement et l'état de santé de la colonie (**Jean-Prost, 2005**).

Sachant que l'abeille possède 3 paires de pattes, chaque paire assure une tâche pendant la récolte du pollen qui se divise en étapes comme suit :

- Lorsque l'abeille visite ou se pose sur les fleurs, elle touche les étamines et son corps devient recouvert de poussière de pollen. C'est grâce à ce contact que le pollen se dépose sur le corps entier surtout que les poils sont favorables à la retenue du pollen sec et poudreux (**Louveaux, 1958**). S'il n'est pas tombé de lui-même sur la fleur, l'abeille le libère directement dans les étamines et ainsi les grains sont piégés dans ses poils et elle peut même les collecter par ses mandibules.
- Une fois le corps couvert de pollen, l'abeille utilise sa paire de pattes antérieures pour le rassembler.

- Les pattes médianes interviennent récupérant le pollen et nettoyant aussi bien le thorax que l'abdomen. L'abeille le brosse, le faisant passer de l'avant vers l'arrière de son corps (**Gout, 2008**).
- Grâce au peigne de la patte postérieure opposée, le pollen est enfin recueilli et méticuleusement compacté en pelote à l'intérieur de la corbeille. Chaque pelote se compose de 200 000 à 5 000 000 de grains (**Lang et al., 2019**).
- Une fois les "corbeilles" pleines, elle utilise ses enzymes salivaires (amylase, catalase et glucosidase) et du nectar pour l'humidifier, l'agglutiner, le compacter et l'emballer dans la corbeille sur leurs pattes postérieures. Une charge de pollen contient jusqu'à 10 % de nectar, ce qui est nécessaire pour l'emballage (**Campos et al., 2008**). L'ajout de ces substances convertit le pollen des fleurs en pollen d'abeille. Cette technique conduit à l'ensemencement du pollen par les ferments lactiques et les levures (**Malihah Mohammad et al., 2021**). Chacune des abeilles butineuses répète les mêmes gestes mentionnés précédemment sur chaque fleur jusqu'à ce que les corbeilles soient pleines ce qui signifie que les boules de pollen soient assez grosses pour être rapportées à la ruche. Etant une nourriture de croissance, le pollen entre prioritairement dans l'alimentation des larves (**Gout, 2008**).

La figure 4 schématise les différentes étapes de la récolte du pollen par les abeilles.

Généralement, une pelote de pollen est composée du pollen d'une seule espèce végétale. Les pelotes contenant le pollen de deux espèces ou plus sont rares, représentant en moyenne seulement 0,3% des cas. Cependant, le niveau de diversité de ces pelotes semble dépendre des conditions environnementales locales. En revanche, lorsqu'on analyse l'ensemble des pelotes de pollen récoltées par une colonie d'abeilles sur une période donnée (une heure, d'une journée ou une semaine), la composition n'est pas homogène. Cela signifie que sur une période plus longue, la colonie ramènera du pollen provenant de diverses sources (**Louveaux, 1990**).

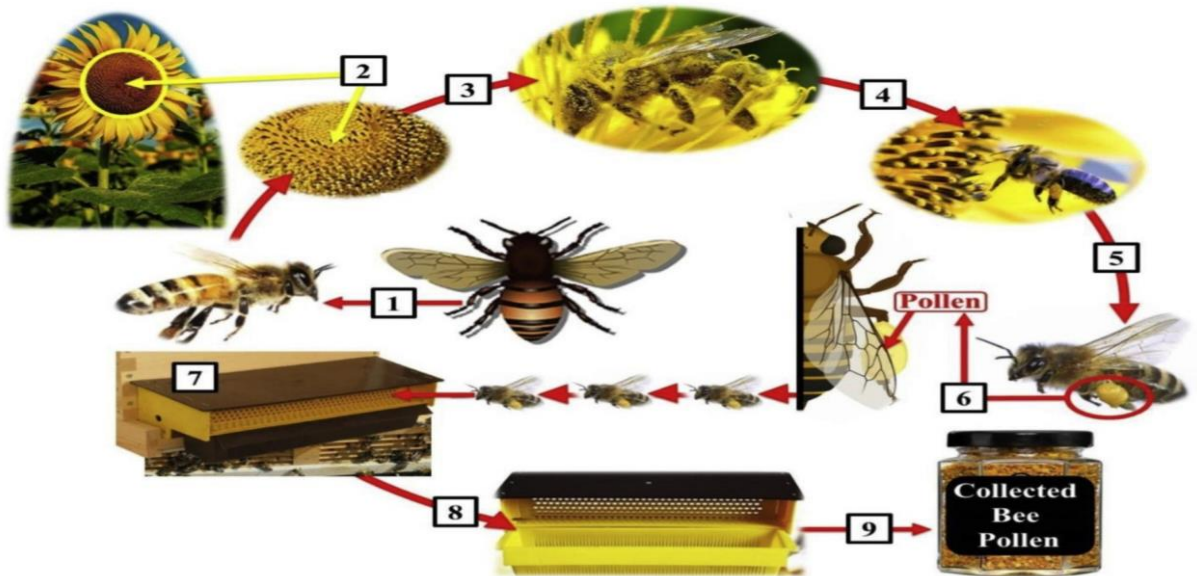


Figure 4: Processus de collecte du pollen par les abeilles (Thakur et Nanda, 2020).

[1] Abeille, [2] Fleur avec du pollen, [3] Abeille couverte de pollen, [4] Abeille transportant une pelote de pollen dans ses pattes arrière, [5] Abeille prête à transporter une pelote de pollen, [6] Pattes arrière avec pelote de pollen, [7] Piège à pollen à l'entrée de la ruche, [8] Plateau de collecte pour le pollen d'abeille, et [9] Pollen d'abeille collecté.

II.3. Devenir du pollen collecté

Les abeilles butineuses transportent le pollen collecté (pollen d'abeille) avec le nectar vers leur ruche. Certains apiculteurs collectent le pollen d'abeille, ce qui est généralement observé dans le cas de l'abeille *Apis*. Le pollen d'abeille est acquis grâce à un piège à pollen communément appelé trappe à pollen installé à l'entrée de la ruche, qui enlève le pollen de la patte de l'abeille en forçant les abeilles à ramper à travers un petit espace (trou) étroit (Malihah Mohammad *et al.*, 2021).

Quand la charge est suffisamment grande, la butineuse revient à la ruche pour déposer sa récolte dans les alvéoles au dessus et à côté du nid à couvain. Le dépôt se fait dans une cellule vide ou dans une cellule qui contient déjà du pollen et elle quitte la ruche pour une autre récolte et cède la mission à d'autres abeilles ouvrières généralement plus jeunes pour compléter le travail. Lorsque la cellule est remplie aux trois quart, les jeunes ouvrières triturent le pollen avec leurs mandibules, l'humectent avec leur salive et le tasse avec des mouvements de tête pour compacter les alvéoles avec une couche de boules de pollen et de

miel, et enfin les recouvrir d'une couche de cire. Le pollen stocké alors après ce processus subit une fermentation lactique (**Louveaux, 1958**).

La fermentation lactique se produit à ce stade grâce à la participation des souches qui prolifèrent à l'intérieur des ruches. Ces souches sont *Lactobacillus* qui convertit les glucides en acide lactique et *Saccharomyces* qui assure le métabolisme du reste des sucres qui existent dans le milieu. Ces chaînes de réactions permettent de réduire le pH de l'environnement, prévenir la germination du pollen et améliorer la capacité d'absorption du pollen d'abeille. Ce processus aboutit à la formation du produit appelé le pain d'abeille (**El Ghouizi et al., 2023**).

Bien que le pollen d'abeille et le pain d'abeille proviennent tous les deux du même pollen floral, ils présentent des différences en raison de leurs transformations respectives. Le pollen est collecté à l'entrée de la ruche, alors que le pain subit une fermentation interne qui modifie sa composition. Ce mécanisme réduit le pH du pollen, augmentant son acidité, et décompose sa membrane cellulaire, facilitant ainsi la digestion du pain d'abeille. Sur le plan nutritionnel, le pain est moins abondant en protéines et en lipides, mais il renferme plus de glucides et d'acides aminés tels que la leucine et la thréonine. En outre, la fermentation augmente le contenu en vitamines, faisant du pain d'abeille un aliment plus approprié à la digestion humaine que le pollen (**Degrandi-Hoffman et al., 2013 ; Habryka et al., 2016 ; Jaya et al., 2020 ; Aylanc et al., 2021**).

III. Collecte du pollen par l'Homme

L'innovation du piège à pollen par Eckert en 1942 a révolutionné la collecte du pollen. Installé à l'entrée de la ruche, ce dispositif permet aux abeilles butineuses de passer, mais celles chargées de pollen ont des difficultés, entraînant la chute de 10 à 15% des pelotes dans un bac à pollen. Ensuite, l'apiculteur prend le relais pour récolter, classer et vendre le pollen destiné à la consommation humaine. Il existe plusieurs types de trappes, mais leur principe de fonctionnement reste le même : les abeilles traversent un peigne qui retient partiellement les pelotes, ces dernières tombent ensuite dans un bac inaccessible aux abeilles (Figure 5) (**Fluri et al., 2007 ; Zuluaga et al., 2015**).



Figure 5: Trappe à pollen installée à l'entrée d'une ruche (Bruneau, 2021).

III.1. Sélection des colonies

Les trappes à pollen ne se placent pas automatiquement sur toutes les colonies, les éligibles sont uniquement celles qui sont déjà bien développées, absolument saines, de force moyenne et ne présentant aucun signe de maladie. Il est vivement recommandé de ne pas collecter de pollen sur des lignées sensibles au couvain plâtré.

Les ruches équipées de trappes sont disposées dans un ou plusieurs ruchers dédiés, et la collecte se fait en même temps sur l'ensemble des ruches afin d'écarter tout risque de migration vers des colonies dépourvues de trappe, particulièrement lors des premières récoltes. Dès l'apparition de signes de maladie au sein d'une colonie, il faut la retirer, car les larves momifiées sont particulièrement difficiles à éliminer du pollen lors du tri (Hoover et Ovinge, 2018 ; Bruneau, 2021).

III.2. Types de récolte

La période de récolte du pollen par l'apiculteur dépend de sa production par les plantes et de la météo. Avant de commencer la récolte, les trappes doivent être placées sur les ruches sans leur peigne pendant quelques jours afin que les abeilles s'habituent à cette nouvelle configuration.

L'apiculteur peut opter pour l'un des deux types de récolte : continue ou temporaire (alternative).

- Récolte continue : dans ce cas, le pollen collecté dans les trappes va diminuer après deux ou trois jours car les abeilles s'habituent au passage au travers du peigne. Cela leur permet d'adapter correctement le nombre de butineuses assurant cette tâche et ajuster la taille des pelotes pour passer à travers le peigne sans tomber (plus petites)

pour assurer un apport continu suffisant à la ruche et donc le taux des pelotes récupérées dans la trappe va être réduit.

- Récolte temporaire (alternative) : Ce model permet l'obtention de bonnes récoltes mais les risques de perturbations des ruches sont importants (**Hoover et Ovinge, 2018**).

IV. Processus du traitement

Le pollen est un aliment délicat qui nécessite une manipulation soigneuse en raison de sa forte teneur en eau (20 à 30 %) et de ses protéines. Cette humidité favorise la croissance de micro-organismes comme les bactéries et les levures, tandis qu'un stockage inapproprié peut altérer sa valeur nutritionnelle par la perte de composés volatils, ou l'apparition d'odeurs indésirables comme un résultat de l'oxydation des lipides.

Pour préserver une qualité maximale, le pollen doit être récolté quotidiennement dans les climats humides et trié immédiatement pour enlever les impuretés. Il doit ensuite être congelé ou séché. Après deux jours au congélateur, les insectes nuisibles sont éliminés. Le contrôle du processus de préparation et de stockage est essentiel, car après décongélation, le pollen d'abeille peut être conservé seulement pendant quelques heures et doit être traité ultérieurement dès que possible (**Moosbeckhofer et Ulz, 1996 ; Campos et al., 2010 ; Nogueira et al., 2012 ; Eshete, 2021**).

La chaîne du traitement post-récolte est comme suit :

➤ Le tri

Le tri peut être effectué sur du pollen sec ou congelé, ce qui nécessite un environnement contrôlé et propre. Un premier tri manuel permet d'écarter les débris et agrégats, suivi par un tamisage pour l'élimination de la poussière. Il est conseillé d'utiliser des dispositifs spécifiques, tels qu'une bande magnétique. Ensuite, un séparateur de pollen divise les éléments par leur poids : les plus lourds tombent dans un conteneur, tandis que les plus légers sont détournés. Pour finir, un tri manuel à l'aide d'une pince à épiler permet de se débarrasser des résidus restants, tout en ayant la possibilité de goûter les pelotes afin d'éliminer celles qui sont trop amères (**Bruneau, 2021 ; Thibault, 2017**).

➤ Le séchage

Le séchage du pollen est un processus délicat qui exige un séchage homogène de l'intérieur à l'extérieur, sans que les températures ne dépassent 40 °C afin de préserver au maximum ses éléments sensibles. Pour maximiser le contact avec l'air sec, il est essentiel de répartir le pollen en couches fines. Les techniques traditionnelles de séchage au soleil sont à éviter, car elles peuvent diminuer la puissance du pollen jusqu'à 50 %. La lyophilisation est recommandée comme alternative, permettant de mieux conserver les nutriments et les différentes propriétés biologiques. Des recherches démontrent que le séchage à l'air chaud provoque des pertes considérables de vitamines, mettant en évidence la nécessité d'une technique de séchage douce (**Collin et al., 1995, Campos et al., 2010; Ciurzynska et Lenart, 2011**).

➤ La surgélation

La conservation du pollen d'abeille par la méthode de la congélation ne le modifie pas, contrairement à la technique de séchage. Elle doit être faite immédiatement après le tri du pollen frais, à une température de -18 °C ou inférieure. Le pollen doit rapidement atteindre cette température et être emballé pour prévenir toute contamination et dessèchement. Un suivi de température est obligatoire et crucial car le pollen doit être maintenu à une température inférieure à 3 °C. Cette méthode est la meilleur pour mieux garder les bienfaits et les composants du pollen car la perte de sa valeur nutritionnelle à cet états de conservation se fait très lentement par comparaison à la méthode du séchage (**Bruneaux, 2012**).

➤ Le stockage

Pour tirer pleinement profit du pollen en tant qu'aliment fonctionnel, le choix des méthodes de conservation est essentiel pour maintenir ses éléments nutritifs. Plusieurs facteurs, comme l'humidité, la température, ainsi que des aspects microbiologiques et chimiques, peuvent influencer sa qualité. Le pollen devrait être stocké dans des contenants hermétiques et gardé dans un lieu frais et sec : moins de 15 °C pour le pollen sec, et -18 °C pour le pollen congelé. Une fois décongelé, il est préférable de le consommer rapidement. L'idéal serait d'utiliser le pollen peu après sa récolte et sa durée de conservation ne devrait pas excéder un an pour le pollen sec et deux ans pour le pollen surgelé (**Bruneaux, 2012 ; Kostić et al., 2020 ; Somervill , 2012**).

V. Mélissopalynologie et identification de l'origine botanique

Une pelote de pollen d'abeille est constitué de 200 000 à 5 000 000 de grains de pollen accumulés provenant de différentes plantes à fleurs (**Lang et al., 2019**). Bien que l'analyse de la couleur puisse donner un aperçu sur son origine florale, mais elle reste incertaine et insuffisante car une couleur commune n'indique pas forcément la même origine florale d'où la nécessité d'une analyse précise du pollen pour l'identification des taxons par la mélissopalynologie comme le confirmait Modro et al. (2009).

V.1. Définition de la mélissopalynologie

La mélissopalynologie consiste à l'étude microscopique faite sur des produits apicoles (le miel, le pollen, la propolis et la gelée royale) en vue de déterminer les grains de pollen qu'ils contiennent. Les caractéristiques physiques des grains de pollen représentent le centre d'intérêt (les paramètres déterminants) de cette étude à savoir leur taille, leur forme, leur ouverture et leur ornementation (**Malihah Mohammad et al., 2021**).

Les grains peuvent avoir des tailles comprises entre 2,5 et 250 μm de diamètre (**Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016**) dont la surface est d'une grande diversité présentant différentes structures, telles que clava, perforée, réticulée (maille), granuleuse et épineuse (**Halbritter et al., 2009**). Dans une analyse pollinique donnée, un type de pollen peut être classé comme prédominant, secondairement dominant ou minoritaire en fonction de sa fréquence, ce qui est ensuite important pour identifier le produit comme étant monofloral/unifloral ou polyfloral (**Louveaux et al., 1978**).

V.2. Importance de la détermination de l'origine botanique

Le pollen collecté par les abeilles diffère en termes de taille, de couleur, de composition et des activités biologiques. Ces différences sont dues à plusieurs facteurs tels que les conditions géographiques, saisonnières et génétiques des espèces de fleurs visitées par les abeilles (**De Melo et al., 2018**). Chaque espèce végétale se caractérise par un pollen d'une forme spécifique qui la rend distinguable et déterminable parmi des milliers d'autres, ainsi des informations précieuses peuvent en être tirées sur l'origine botanique du pollen et sur les plantes visitées préférentiellement par les abeilles (**Malihah Mohammad et al., 2021**).

Les informations sur l'origine botanique du pollen particulièrement sont cruciales car elles peuvent servir d'indicateur sur sa valeur nutritionnelle, sa composition phytochimique et ses activités biologiques qui déterminent sa qualité commerciale (**Campos et al., 2010**).

Un pollen est appelé monofloral lorsqu'on en trouve une seule taxonomie botanique, dans ce cas il préserve les propriétés physiques et biochimiques de la plante d'origine. En revanche, il est dit polyfloral lorsqu'il se compose de mélanges provenant de différentes fleurs.

Au niveau commercial, le pollen d'abeille est principalement vendu sous forme polyflorale, cela résulte du mélange de pelotes du pollen collectés dans les trappes ou stockés par les abeilles dans la même alvéole (**Carpes et al., 2013**).

En se basant sur les résultats de l'analyse pollinique, les apiculteurs peuvent planifier et gérer un environnement propice à l'approvisionnement alimentaire des abeilles en utilisant les informations fournies par l'identification de l'origine botanique du pollen. Cette identification permet également une meilleure compréhension de la source nutritionnelle des abeilles donnant éventuellement aux produits apicoles fabriqués à partir de ces plantes une meilleure valeur commerciale (**Malihah Mohammad et al., 2021**).

L'approche traditionnelle pour déterminer l'origine botanique du pollen se repose sur l'analyse microscopique, cependant cette méthode présente quelques inconvénients tels que la prise énorme du temps et la nécessité d'une expertise en palynologie. Récemment, grâce aux avancées de la biologie moléculaire et des nouvelles méthodes analytiques, de nouvelles approches sont développées. L'une d'entre elles repose sur l'utilisation d'acides aminés libres, de minéraux et de composés aromatiques, mais elle reste coûteuse et requiert des matériaux complexes. En revanche, la technologie du code-barres ADN et le séquençage de nouvelle génération des amplicons semblent plus prometteurs, offrant de meilleures sensibilités et résolutions que l'analyse microscopique (**Laha et al., 2017**). Toutefois, certaines limitations persistent en raison de la base de données végétale incomplète, de l'accès à l'équipement de laboratoire et de l'évaluation d'échantillons de pollen mixtes provenant de plusieurs espèces végétales (**Keller et al., 2015**).

V.3. Identification du pollen

L'analyse pollinique consiste à classer et identifier les grains de pollen dans le but de comprendre l'évolution des plantes et de déterminer l'origine des échantillons polliniques. On classe les grains en fonction de leur morphologie, dimensions, ornementation et structure, ce qui permet aux spécialistes en palynologie d'identifier les espèces végétales. La variété des formes polliniques reflète l'adaptation des plantes à leur environnement et leur mode de pollinisation. Des techniques comme la microscopie optique ou électronique sont utilisées pour obtenir des informations plus précises sur les échantillons polliniques (**Sémah et Renault-Miskovsky, 2004**).

L'identification des grains de pollen repose sur 4 critères :

➤ **La symétrie**

Il peut y avoir des symétries isopolaires ou hétéropolaires selon les deux plans polaire ou équatorial.

➤ **La forme**

La forme est définie par la valeur du rapport existant entre les dimensions de l'axe polaire (P) et de l'axe équatorial (E) (Figure 6).

Lorsque : $E = P$: Le pollen est de forme sphérique.

$E < P$: Le pollen est de forme longiaxe.

$E > P$: Le pollen est de forme briviaxe (**Renault-Miskovsky et Marguerie, 1992**).

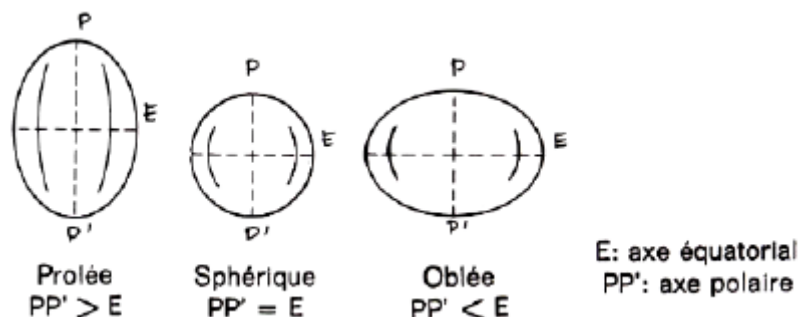


Figure 6: Les différentes formes de grains de pollen (**Renault-Miskovsky et Marguerie, 1992**).

➤ **Taille**

Il existe une grande diversité de tailles, elles sont comprises dans l'intervalle 2,5 et 250 μm de diamètre (**Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016**).

➤ **Les apertures**

Les "apertures" dans la structure des grains de pollen en méliissopalynologie font référence aux ouvertures présentes sur la paroi du grain de pollen (Figure 7). Elles peuvent être sous forme de pores ou sillons ou association des deux types. Les pollens porés comportent de petites ouvertures circulaires (pores). Les pollens colpés ont seulement une ouverture très allongée (sillon). Les pollens colporés présentent à la fois des pores et des sillons. En l'absence d'apertures, le pollen est dit "inaperture".

Les apertures sont des structures importantes pour la reproduction des plantes en permettant le passage du tube pollinique lors de la pollinisation, elles sont aussi essentielles à la régulation du volume des grains en fonction de l'humidité environnante. Elles jouent aussi un rôle crucial dans la classification et l'identification des pollens car leur type et leur nombre peuvent varier selon les espèces végétales, ce qui permet d'identifier la source botanique des pollens présents dans les échantillons analysés. Les apertures peuvent prendre différentes formes et positions selon les espèces de plantes et elles sont souvent utilisées comme critères de classification. Les types d'apertures les plus courants comprennent les apertures colporés, porés, et les apertures zonocolporés (**Reille, 1990**).

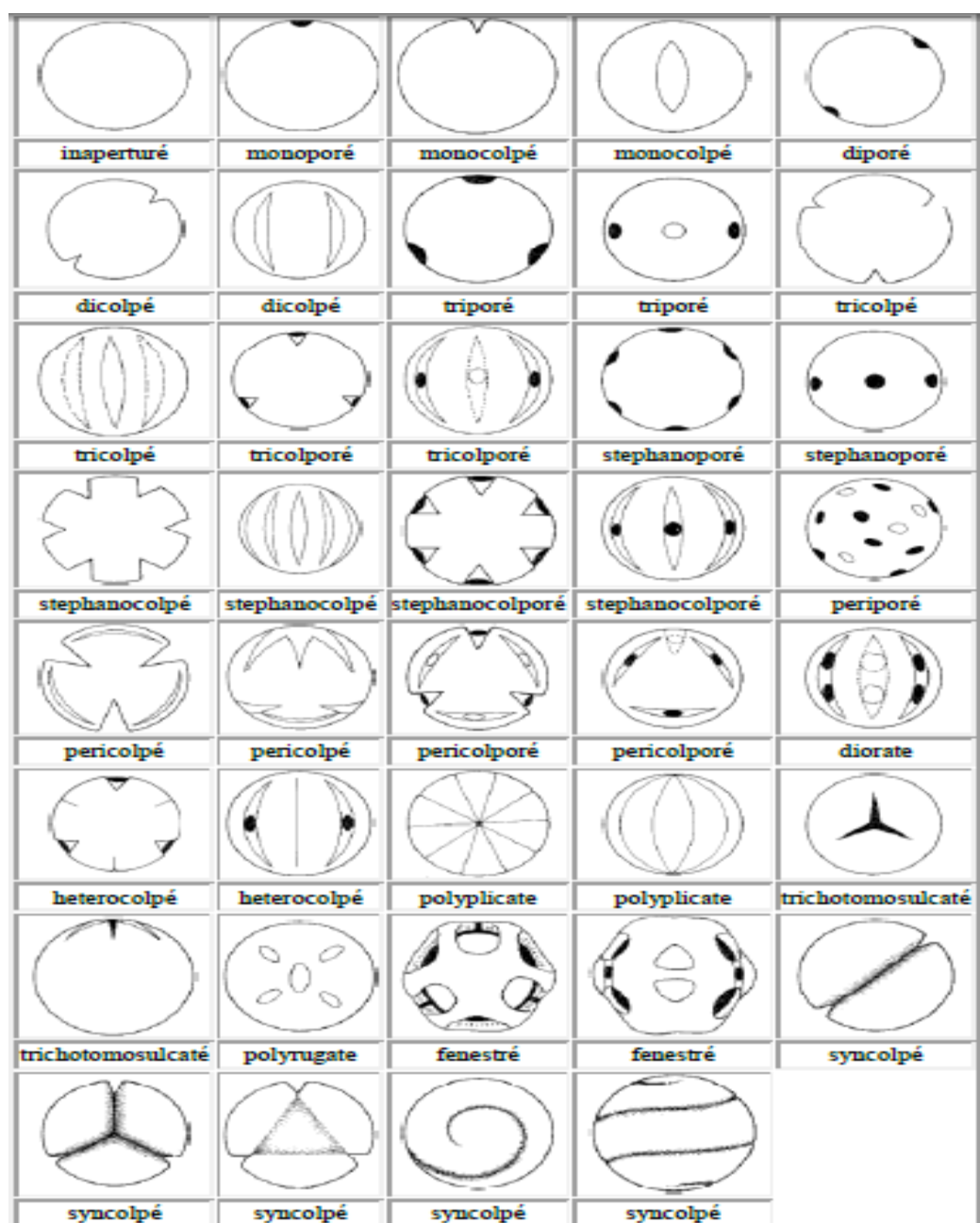


Figure 7: Principaux types d'ouvertures (Renault-Miskovsky et Marguerie, 1992).

V.4. Aspect physique du pollen d'abeille

V.4.1. La forme

Le poids d'une pelote de pollen d'abeille moyenne est d'environ 7,5 à 8 mg, les formes et les tailles des grains qui la constituent peuvent être différentes même si la source florale est la même (**Komosinska-Vassev et al., 2015**). Le pollen provenant des plantes anémophiles est plus léger et séché donnant des pelotes plus grosses et moins disposées tandis que celui des plantes entomophiles est plus petit et plus compacté (**Friedman et Barrett, 2009**).

Le pollen frais peut prendre différentes formes : cylindrique, rond, triangulaire ou en forme de cloche, tandis que les pastilles de pollen séché ayant un diamètre de 0,01 à 0,05 mm sont généralement sphériques ou en forme de fuseau (**Barene et al., 2015**).

L'étude de Thakur et Nanda (2018) a révélé que les pelotes de pollen varient en fonction de la longueur, la largeur, du diamètre, du poids, la sphéricité, la surface, du volume, de densité et de porosité en raison de leur teneur en humidité. D'autres paramètres ont été signalé par Wang et Dobritsa (2018), tels que la texture de la surface des grains dont l'exine présente des structures et des propriétés distinctes en fonction d'espèces végétales ce qui donne une idée sur la composition botanique des pelotes. Par exemple, le maïs a une exine plus épaisse recouverte entièrement de tectum, l'exine de Brassica est plus fine avec une surface réticulée et l'hibiscus contient des exines densément recouvertes d'épines longues.

V.4.2. La couleur

Le pollen d'abeille se caractérise par sa multitude de couleurs pouvant toucher toutes les nuances existantes du blanc au noir, sa couleur est liée aux pigments végétaux qui y sont naturellement présents en concentrations variables tels que les caroténoïdes et les anthocyanes (**Sattler et al., 2015**). D'ailleurs, De Melo et al. (2016) considèrent les valeurs de la couleur d'un échantillon de pollen comme un indice reflétant sa teneur phénolique totale et son potentiel antioxydant et antimicrobien en observant la corrélation entre ces paramètres.

L'analyse instrumentale des couleurs montre une corrélation entre les teneurs en Ca, Mg et Fe et les valeurs de couleur confirmant ainsi qu'elle peut également être affectée par la composition chimique (**Yang et al., 2013**).

Modro et al. (2009) ont rapporté que des pollens collectés à partir de la même source végétale peuvent avoir des couleurs différentes et parfois le pollen d'abeille provenant de diverses origines botaniques peut être de couleur similaire, cela est expliqué par l'état des thèques florales qui peuvent être soit déjà ouvertes, soit fendues par les abeilles. En outre, la luminosité naturelle du pollen d'anthère diminue en raison de l'ajout d'humidité, en particulier de nectar, pour former une boule de pollen.

Les conditions de traitement influencent également les valeurs de couleur, particulièrement le broyage des pelotes de pollen après déshydratation qui entraîne la suprématie de la couleur jaune. Cela peut être dû aux réactions d'oxydation de certains composés comme les polyphénols lors du séchage (**Silva et al., 2009**).

Chapitre II : Composition et valeur nutritionnelle

Chapitre II : Composition et valeur nutritionnelle

I. Composition

I.1. Eau

Le pollen d'abeille frais contient entre 7 et 30 % d'eau, ce qui le rend vulnérable aux contaminations en raison de sa nature hygroscopique. La teneur en eau est mesurée après séchage qui ne doit pas se faire au soleil ou à l'ombre pour éviter la croissance microbienne. Afin de maintenir les nutriments, le taux d'humidité du pollen séché doit se situer entre 5 et 9 %. Une humidité insuffisante ($< 3\%$) peut causer des changements de couleur et des modifications du goût. Le taux d'humidité affecte la qualité et la durée de conservation du pollen (Nogueira *et al.*, 2012 ; Thakur et Nanda, 2020).

I.2. Glucides

Les glucides constituent la classe principale des composants du pollen d'abeille. Ils représentent environ 40 à 85 % (P/P) de son poids sec (Martins *et al.*, 2011). Cette quantité élevée est due à l'incorporation du miel ou de nectar lors de la formation des pelotes par les abeilles ; ce qui augmente leur quantité. Le pollen d'abeille se distingue du pollen végétal par les quantités élevées de sucres réducteurs. Il est constitué de monosaccharides tels que le fructose et le glucose, d'oligosaccharides (disaccharides précisément) tels que saccharose, turanose, maltose, tréhalose et erlose, et de polysaccharides tels que sporopollénine et cellulose. Le fructose est abondant, suivi du glucose et du saccharose par rapport aux autres composants glucidiques dans le pollen d'abeille (Carpes *et al.*, 2009 ; Thakur et Nanda, 2020).

I.3. Protéines et acides aminés

Les protéines représentent le deuxième composant le plus abondant après les glucides dans le pollen d'abeille. Leur pourcentage varie de 14 à 30 % de son poids sec total avec une moyenne de 22,7 % dont 10,4 % sont des acides aminés essentiels comme la méthionine, la lysine, la thréonine, l'histidine, la leucine, l'isoleucine, la valine, le phénylalanine et le tryptophane. Dans le même contexte, le pollen récolté par les abeilles est souvent considéré comme l'aliment naturel le plus proche de la perfection car il contient tous les acides aminés essentiels requis à l'alimentation des abeilles et de l'être humain. Les variations de teneurs en protéines sont dues à la différence des sources végétales et les régions de récolte (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2018 ; El Ghouizi *et al.*, 2023).

La proline, l'acide glutamique et l'acide aspartique sont les principaux acides aminés retrouvés dans le pollen. La proline particulièrement est d'une importance extrême en raison de ce qu'elle reflète comme degrés de fraîcheur du pollen, c'est ce qu'on appelle l'indice de proline (doit être < 80 %). Les abeilles sont directement responsables du taux de proline qui semble augmenter au cours du stockage en raison de sa synthèse en présence de glutamate déshydrogénase à partir de l'acide glutamique (**Verslues et Sharma, 2010**).

Le pollen d'abeille représente également une source de tryptophane et phénylalanine qui sont considérées comme très importantes pour réduire la dépression et l'anxiété (**Rimpler, 2003**).

Les niveaux élevés de protéines et d'acides aminés font du pollen d'abeille un aliment important répondant aux besoins nutritionnels des abeilles et aussi un excellent exhausteur de nutrition pour l'alimentation animale et humaine (**Li et al., 2018**).

I.4. Lipides et acides gras

Après les glucides et les protéines, les lipides arrivent en troisième position comme constituants abondants du pollen d'abeille. Leur teneur peut varier de 1 à 13 % du poids sec du pollen (**Campos et al., 2008; Sattler et al., 2015 ; Thakur et Nanda, 2020**). De-Melo et De Almeida-Muradian (2017) ont signalé qu'elle peut aller parfois jusqu'à 22 %. Le profil lipidique du pollen d'abeille est peu étudié, la plupart des études se sont concentrées sur les profils glucidique, protéique et antioxydant. La fraction lipidique du pollen d'abeille se présente principalement sous forme de caroténoïdes, stéroïdes et acides gras (**Ares et al., 2018**).

La fraction lipidique est très attirante pour les abeilles. Par conséquent, les plantes ayant du pollen à fortes concentrations lipides sont plus fréquemment visitées (**Negrão et Orsi, 2018**).

La fraction lipidique dans le pollen d'abeille est constituée essentiellement par des acides gras saturés (myristique, stéarique et palmitique) et insaturés (acides oléique, α -linoléique (oméga-3) et linoléique (oméga-6)). Il existe aussi en petites quantités des phospholipides, des triterpènes (acides oléanolique et ursolique) et des stérols végétaux (β -sitostérol) (**El Ghouizi et al., 2023**).

I.5. Vitamines

Le pollen d'abeille peut être considéré comme un trésor alimentaire en raison de la présence de presque toutes les vitamines avec une moyenne de 0,02 à 0,7 % de son contenu total. Il a été constaté qu'il est plus riche en vitamines hydrosolubles qu'en vitamines liposolubles (Tableau I) (Farag et El-Rayes 2016; Kieliszek *et al.*, 2018).

Le groupe de vitamines B est le plus couramment identifié [thiamine (B1), riboflavine (B2), vitamine PP ou niacine (B3), acide pantothénique (B5), pyridoxine (B6), biotine (B7), acide folique (B9) et cobalamine (B12)]. La vitamine C (ou acide ascorbique) peut être identifiée en traces en raison de sa dégradation par les prétraitements thermiques (le séchage que subit le pollen). Le pollen d'abeille contient aussi des vitamines liposolubles telles que les vitamines D, K, E et deux types de vitamine A (β -carotène et rétinol) en quantités faibles et variables selon l'origine botanique et la saison de récolte (Komosinska-Vashev *et al.*, 2015, Aylanc *et al.*, 2021 ; El Ghouizi *et al.*, 2023).

Tableau I: Composition du pollen d'abeille et besoins nutritionnels en vitamines (Campos *et al.*, 2008).

Vitamines	mg dans 100 g	% de l'apport quotidien recommandé pour 15 g de pollen	Apport quotidien recommandé (mg/jour)
Acide ascorbique (vitamine C)	7 – 56	2 – 15	100
bêta-carotène (provitamine A)	1 – 20	30 – 600	0.9
Tocophérol (vitamine E)	4 – 32	8– 66	13
Niacine (B3)	4 – 11	7 – 20	15
Pyridoxine (B6)	0,2 – 0,7	4 – 13	1,4
Thiamine (B1)	0,6 – 1,3	15 – 32	1,1
Riboflavine (B2)	0,6 – 2	12 – 42	1,3
Acide pantothénique (B5)	0,5 – 2	2 – 9	6
Acide folique (B9)	0,3 – 1	20 – 67	0,4
Biotine (H)	0,05 – 0,07	30 – 42	0,045

I.6. Minéraux

Le pollen est une bonne source de minéraux nécessaires pour l'abeille et pour l'être humain, ils représentent entre 2 à 6 % de son contenu avec environ 25 éléments. De ce fait, le pollen d'abeille est un produit à valeur ajoutée (**Campos et al., 2008**). Les minéraux qu'on en trouve sont selon l'ordre décroissant suivant :

Le potassium (K) (400 à 2 000 mg/100 g), le phosphore (P) (0,80 à 6 mg/100 g),

le magnésium (Mg) (20 à 300 mg/100 g), le calcium (Ca) (20 à 300 mg/100 g).

Il est à noter que 15g de pollen d'abeille peut couvrir les apports journaliers recommandés pour l'être humain en K, P, Mg, et Ca à 25, 16, 23 et 7 %, respectivement.

Le sodium (Na) est un macro-élément présent dans le pollen d'abeille avec une teneur inférieure à 2 g/kg (**De-Melo et De Almeida-Muradian, 2017**). Le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le manganèse (Mn) sont des microéléments présents dans le pollen d'abeille pouvant couvrir jusqu'à 37, 79, 36 et 85 % des apports journaliers recommandés, respectivement (Tableau II) (**Campos et al., 2010 ; Bogdanov, 2016**).

Tableau II: Composition du pollen d'abeille en minéraux (**Campos et al., 2008**).

Minéraux	mg dans 100 g	% de l'apport quotidien recommandé pour 15 g de pollen	Apport quotidien recommandé
Potassium (K)	400 – 2000	5 – 27	2000
Phosphore (P)	80 – 600	2 - 16	1000
Calcium (Ca)	20 – 300	0,5 – 7	1100
Magnésium (Mg)	20 – 300	2 – 23	350
Zinc (Zn)	3 – 25	10 – 79	8,5
Manganèse (Mn)	2 – 11	15 – 85	3,5
Fer (Fe)	1,1 – 17	2 – 37	12,5
Cuivre (Cu)	0,2 – 1,6	4 – 36	1,2

I.7. Composés bioactifs

Les composés bioactifs présents dans le pollen d'abeille, tels que les polyphénols et les caroténoïdes, sont des éléments essentiels qui confèrent à ce produit ses propriétés bénéfiques pour la santé.

Les polyphénols sont des composés antioxydants qui aident à neutraliser les radicaux libres dans l'organisme ce qui permet de réduire le stress oxydatif et prévenir les dommages cellulaires. Les caroténoïdes, quant à eux, sont responsables de la couleur vive du pollen d'abeille et ils ont un rôle déterminant dans la protection contre les maladies cardiovasculaires et le renforcement du système immunitaire.

Ces composés bioactifs présents dans le pollen d'abeille ont été associés à de nombreux bienfaits pour la santé, notamment la réduction de l'inflammation, la protection contre les maladies chroniques telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires, ainsi que le soutien de la santé oculaire. De plus, ces composés peuvent également contribuer à améliorer la digestion et à renforcer la fonction cognitive (**Eshete *et al.*, 2021 ; Thakur et Nanda, 2020**).

I.8. Flore microbienne

Les abeilles développent des ferments lactiques à partir du nectar, qui est par la suite utilisé pour former des pelotes de pollen, ce qui explique l'existence des bactéries lactiques dans le pollen frais. Ces bactéries, qui appartiennent majoritairement à la famille des *Lactobacillus*, sont issues de l'intestin des abeilles et incluent des espèces telles que *Lactobacillus kunkeii* et *Lactobacillus plantarum*. On les retrouve également en grande quantité dans le miel et d'autres produits issus de la ruche (**Percie du Sert, 2009 ; Tajabadi *et al.*, 2013**). Les souches de *Lactobacillus* isolées du pollen représentent une alternative prometteuse pour les probiotiques dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique grâce à leur résistance aux conditions digestives et leur capacité de former des biofilms. En outre, on a isolé des bactéries lactiques fructophiles à partir du pollen, qui utilisent le fructose comme son principal aliment. On attribue à la consommation de probiotiques divers avantages pour la santé mettant en évidence le potentiel du pollen d'abeille dans ces secteurs (**Belhamra *et al.*, 2016 ; George Kerry *et al.*, 2018**).

II. Applications alimentaires et statut de sécurité du pollen d'abeille

II.1. Pollen d'abeille : un aliment fonctionnel

L'évolution de la production et de la consommation alimentaires se caractérise par une demande accrue pour des alternatives diversifiées, sans additifs chimiques et riches en composés bioactifs (**Anjos *et al.*, 2019**). Les aliments fonctionnels, qui vont au-delà des valeurs nutritionnelles de base, jouent un rôle clé dans la promotion de la santé et la prévention des maladies.

Ce nouveau concept s'inspire d'Hippocrate, le fondateur de la médecine, et de sa philosophie vieille de près de 2500 ans : "Que ton aliment soit ton médicament et que ton médicament soit ton aliment". Ces aliments ont pour objectif d'améliorer la qualité de vie face à l'augmentation des dépenses de santé et au vieillissement démographique (**Margaoan et al., 2019**).

De nos jours, l'alimentation ne doit pas seulement assurer la nutrition, mais aussi prévenir les maladies et promouvoir le bien-être physique et mental. Considéré comme un aliment fonctionnel, le pollen d'abeille, possède une richesse en protéines, acides aminés, prébiotiques, probiotiques et composés phytochimiques. Selon des études, les polyphénols et flavonoïdes qu'il renferme pourraient avoir un impact positif sur des pathologies telles que le cancer, l'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement prématuré (**Margaoan et al., 2019**).

II.2. Applications et utilisations alimentaires

Le pollen d'abeille se consomme généralement à son état brut. Cependant, suite aux découvertes autour de sa valeur nutritionnelle élevée et de son grand potentiel, des études se sont concentrées sur le développement de nouveaux produits dont le principe est basé sur le mélange du pollen comme un produit alimentaire naturel source de composés bioactifs avec pour objectif final d'augmenter la valeur nutritionnelle des produits résultants et donc améliorer les effets positifs sur la santé, ainsi que sur l'activité de conservation de ces aliments (**Aylanc et al., 2021**). Parmi ces produits, on trouve :

➤ Pain

Le pain sans gluten enrichi avec du pollen polyfloral à 1, 2, 3, 4 et 5 % proposé par Conte et al. (2018) présente des propriétés physicochimiques et sensorielles affirmant que ce pain peut être mis sur le marché parmi des produits sans gluten. En effet, l'ajout de pollen a donné un pain bien levé avec une texture et une couleur améliorée. Ce pain est même plus acceptable sensoriellement.

➤ Biscuits

Krystyjan et al. (2015) ont ajouté du pollen d'abeille aux biscuits pour montrer leur potentiel en tant que compléments alimentaires. Cet ajout n'a pas augmenté la teneur en matières grasses tandis qu'il y a eu une augmentation significative de la teneur en sucre, protéines, fibres, polyphénols et potentiel antioxydant des biscuits.

Dans l'étude de Solgajova et al. (2014), faite sur des produits de boulangerie, le pollen a été mélangé avec la farine du blé à différents pourcentages (de 16 à 32 %) pour en faire des

biscuits. Outre les propriétés nutritionnelles et sensorielles des biscuits, l'activité antioxydante était fortement en corrélation avec le pourcentage de pollen ajouté.

➤ **Viande**

Les études d'Anjos et al. (2019) ont démontré que pollen peut être utilisé dans la conservation de la viande vu ses propriétés antimicrobienne et antioxydation lipidique permettant ainsi de prolonger la durée de conservation.

➤ **Lait fermenté**

Yerlikaya (2014) a ajouté le pollen d'abeille au lait fermenté et il s'est avéré qu'il avait un effet positif sur la viabilité des probiotiques et sans effet négatif sur les propriétés physico-chimiques du lait fermenté.

➤ **Yaourt**

Le yaourt est un autre produit laitier sur lequel l'ajout du pollen d'abeille a été aussi testé par Karabagias et al. (2018). Dans cette étude, l'ajout du pollen d'abeille moulu dans le yaourt a permis d'avoir un produit final ayant une meilleure capacité antioxydante *in vitro* et une concentration plus importante en composés phénoliques totaux, tout en améliorant le goût, l'odeur, l'apparence et la cohésion du yaourt. Ainsi, ces résultats ont abouti à la proposition du yaourt au pollen d'abeille comme un aliment fonctionnel nouveau et peu coûteux constituant une base et ouvrant une nouvelle piste de recherche pour la science alimentaire.

II.3. Sécurité et risques de consommation

La consommation du pollen d'abeille est recommandée en tant que complément alimentaire naturel en raison de ses nutriments nourrissants et sains. Toutefois, sa consommation peut présenter quelques risques en raison de la présence éventuelle de contaminants tels que les toxines bactériennes et fongiques, des métaux lourds, des pesticides et des réactions allergiques. Les conditions de production et de stockage peu hygiéniques peuvent favoriser la présence microbienne, augmentant ainsi les risques sur la santé. Ainsi, bien que la consommation de pollen frais soit déconseillée en raison des risques microbiologiques, le pollen sec est considéré comme sûr (**Mauriello et al., 2017**).

Des métaux lourds toxiques et des résidus de pesticides ont été détectés dans le pollen d'abeille exposé à la pollution environnementale dans certaines régions du monde mais leur niveau de contamination n'est pas considéré comme affectant la santé humaine. Les métaux lourds, tels que le plomb et le cadmium, ont également été identifiés dans le pollen de ces régions mais généralement en dessous des limites maximales autorisées (**Thakur et Nanda, 2020**).

Malgré l'enregistrement de réactions allergiques chez certaines personnes, y compris l'anaphylaxie et le rhume des foins, la tolérance au pollen d'abeille est généralement bonne et il ne semble pas affecter la santé humaine selon les études rapportées. De plus, il a été montré que les principaux risques d'allergie au pollen d'abeille sont dus au mélange du pollen d'abeille avec des allergènes de pollen aérien, des substances allergéniques fongiques croisées, la contamination par des pesticides et l'exercice immédiatement après sa prise. Néanmoins, il est essentiel d'instaurer des critères de sécurité concernant le pollen d'abeille, d'examiner les origines botaniques, les seuils maximaux tolérables de résidus pour les métaux lourds et les pesticides, la quantité de microbes et les méthodes de transformation. Il est aussi primordial de former les apiculteurs afin de garantir la sécurité du pollen d'abeille (**Basista et al., 2012 ; De Oliveira et al., 2016**).

II.4. Législation

Diverses organisations internationales telles que l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale du commerce (OMC) sont responsables de l'établissement de normes de qualité et de sécurité alimentaire. Cependant, il n'existe à ce jour aucune norme mondiale harmonisée pour la sécurité du pollen d'abeille. Quelques pays comme l'Argentine, la Bulgarie, le Brésil et la Pologne ont établi leurs directives pour améliorer la surveillance de la qualité du pollen afin d'accroître la sécurité. Il est urgent de réviser les directives sur le pollen d'abeille en évaluant la source botanique, les limites maximales de résidus pour les métaux lourds et les pesticides, la charge microbienne et les techniques de traitement avant d'introduire le pollen d'abeille sur le marché. De plus, l'étiquetage du pollen d'abeille et de tout aliment contenant du pollen d'abeille devrait inclure des déclarations sur les risques allergènes pour éviter les risques pour les personnes allergiques. Des exigences légales doivent également être établies et adaptées pour les systèmes de traitement de l'échelle agricole aux industries pilotes, aux producteurs et aux étapes de traitement du pollen d'abeille. De plus, une formation efficace des apiculteurs est très nécessaire par les autorités compétentes afin d'assurer la sécurité de ce produit (**Thakur et Nanda, 2020**).

*Chapitre III : Composés
bioactifs et activités
biologiques*

Chapitre III : Composés bioactifs et activités biologiques

I. Composés bioactifs dans le pollen d'abeille

Hippocrate a exprimé l'idée que la nourriture devrait être considérée comme un médicament il y a plus de 2000 ans. Les aliments d'origine végétale apportent des nutriments essentiels et tiennent un rôle fondamental dans la santé humaine. Les études sur les métabolites secondaires des plantes ont montré qu'ils sont, non seulement, importants pour l'adaptation des plantes à leur environnement mais aussi ils contribuent à l'amélioration de la santé humaine grâce aux composés bioactifs (**Rasouli et al., 2017**).

Les composés bioactifs sont définis comme des composés qui se trouvent dans la nature et font partie de la chaîne alimentaire. Ils ont la capacité d'interagir avec un ou plusieurs composés des tissus vivants, en ayant un effet positif sur la santé humaine en raison de leurs propriétés biologiques (**Biesalski et al., 2009**).

I.1. Polyphénols

Les plantes synthétisent des métabolites primaires tels que les glucides, les protéines et les lipides pour maintenir leur croissance et leur vivacité ainsi que des métabolites secondaires qui ne sont pas présents chez tous les êtres vivants, tels que les terpènes, les saponines, les glycosides et les composés polyphénoliques (**Güneş Bayir et al., 2019**).

En réponse à des conditions de l'environnement et pour se défendre contre les agressions extérieures comme les agents pathogènes, les parasites, les rayons UV et les radicaux libres, les plantes supérieures synthétisent des métabolites secondaires appelés les polyphénols. On en trouve dans tous les organes végétatifs de la plante (les feuilles, les fleurs et les fruits) et même dans les graines et l'écorce des arbres ainsi que dans des boissons courantes telles que le café et le thé. Ils constituent ainsi une partie intégrante de l'alimentation humaine. Ils contribuent en partie aux attributs sensoriels et nutritifs des aliments végétaux, tels que l'astringence, la couleur et l'odeur. De plus, les polyphénols ont un effet sur la formation du goût amer chez les plantes. Certains d'entre eux peuvent également se lier et précipiter des macromolécules telles que les protéines alimentaires, les glucides et les enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments (**Bunte et al., 2019 ; Güneş Bayir et al., 2019 ; Bertelli et al., 2021**).

Les polyphénols représentent l'une des classes de métabolites secondaires les plus nombreuses et largement répandues dans le règne végétal avec plus de 8 000 différents composés phénoliques identifiés (**Durazzo et al., 2019**).

De point de vue structurel, les polyphénols possèdent une caractéristique commune qui est la présence d'un noyau aromatique et plusieurs groupes hydroxyles attachés. Dans la littérature, ils sont généralement classés en deux classes principales : flavonoïdes et non-flavonoïdes (**De la Rosa et al., 2010**). Cependant, en fonction du nombre d'anneaux phénoliques qu'ils contiennent, ils pourraient être classés en quatre principales sous-classes : les flavonoïdes (les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanidines et les flavanols), les acides phénoliques (qui sont divisés entre les composés dérivés des acides hydroxybenzoïques, tels que l'acide gallique, et ceux dérivés de l'acide hydroxycinnamique, comme l'acide caféique, férulique et coumarique), les stilbènes et les lignanes (**Truzzi et al., 2021**). Le pollen d'abeille renferme plusieurs classes de polyphénols aux structures et fonctions distinctes : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbénoloïdes, les lignanes et les tanins (**Rzepecka-Stojko et al., 2015**).

I.1.1. Acides phénoliques

Les non flavonoïdes sont représentés par les acides phénoliques qui sont des composés d'anneaux aromatiques avec un groupe acide carboxylique (-COOH) (Figure 8). Ces phénols représentent la principale classe de composés phénoliques d'origine végétale (**Rasouli et al., 2017**). Ils sont divisés en deux classes différentes en fonction des squelettes C1-C6 et C3-C6 qui correspondent respectivement aux dérivés hydroxy d'acide benzoïque et cinnamique et sont souvent trouvés sous forme liée tels que des amides, des esters et des glycosides. Ils ont une activité antioxydante en tant que chélateurs et piègeurs de radicaux libres, avec un impact particulier sur les radicaux peroxy, hydroxyle et peroxy-nitrites (**Tsao, 2010**).

Les acides gallique et chlorogénique, sont des polyphénols abondants dans le pollen d'abeille. Ils sont principalement retrouvés dans les pollens de *Brassicaceae* (ex. colza) et de *Fabaceae* (ex. trèfle), où ils contribuent à la défense antioxydante de la plante. Ces composés présentent des propriétés biologiques notables : l'acide chlorogénique améliore le métabolisme glucidique et protège le foie contre le stress oxydatif, comme démontré dans des études *in vivo*. Leurs effets anti-inflammatoires et antimicrobiens renforcent également la réponse immunitaire (**Thakur et Nanda, 2018 ; Komosinska-Vassev et al., 2015**).

En plus de leur rôle antioxydant, l'acide chlorogénique et l'acide caféique particulièrement sont susceptibles d'inhiber la formation de composés N-nitrosés mutagènes et cancérigènes, et sont donc censés avoir un effet inhibiteur sur la réaction de N-nitrosation *in vitro* (Tsao, 2010).

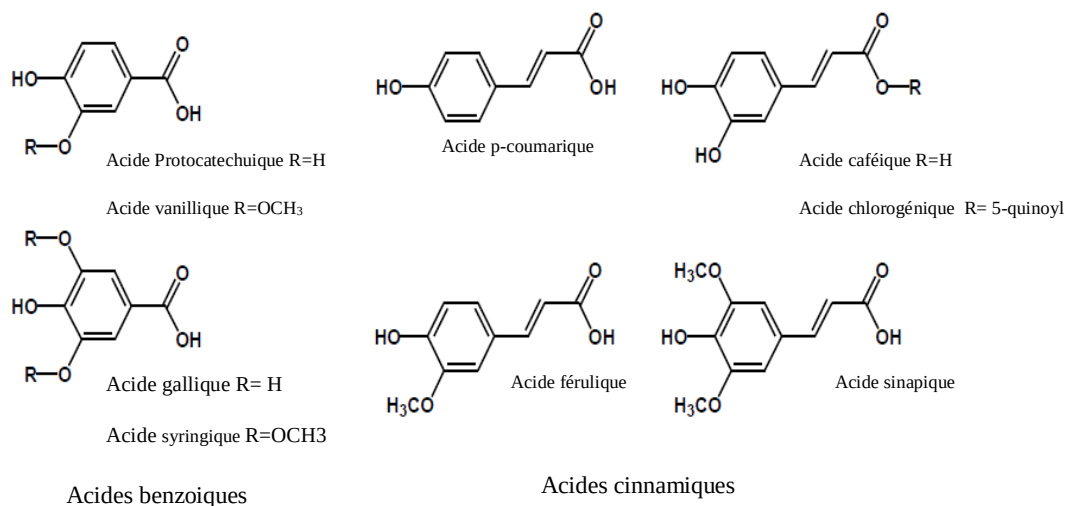


Figure 8 : Structure chimique de quelques acides phénoliques (Tsao, 2010).

I.1.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du latin "flavus" qui signifie "jaune". Outre leurs rôles physiologiques dans les plantes, les flavonoïdes jouent un rôle important dans l'alimentation humaine où ils constituent la classe la plus abondante de polyphénols, avec plus de 9000 structures différentes identifiées. Ce sont des composés de faible poids moléculaire largement répandus dans les plantes, en particulier dans les fruits et légumes, bien qu'ils ne soient pas considérés comme des nutriments. Par conséquent, on peut trouver des flavonoïdes dans des aliments et des boissons tels que les artichauts, les baies, les cerises, les agrumes, les raisins, le persil, les haricots de soja, le thé et le vin, bien que les sources les plus riches soient les oignons (Quideau *et al.*, 2011).

Les atomes de carbone des flavonoïdes sont disposés selon une configuration C6-C3-C6 avec deux cycles aromatiques (A et B) liés de manière covalente à trois atomes de carbone, conduisant ainsi à la formation d'un cycle hétérocyclique oxygéné C. La vaste diversité des structures de flavonoïdes provient des diverses combinaisons de multiples groupes hydroxyle, groupes méthyle, glycosides et substituants acylés sur l'ossature C6-C3-C6 de base (Figure 9).

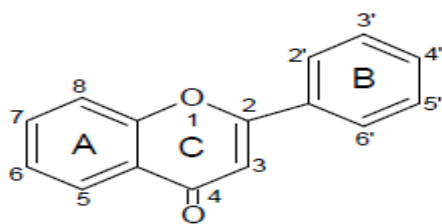


Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes (**Rzepecka-Stojko et al., 2015**).

Les flavonoïdes peuvent se présenter dans la nature sous forme de glycosides, d'aglycones ou de dérivés acétylés, méthylés, prénylés et sulfatés. En fonction du degré d'oxydation du cycle central (cycle C) et du nombre et de la position des groupes hydroxyle, les flavonoïdes sont divisés en six grandes sous-classes à savoir : les anthocyanines, les flavanols (flavan-3-ols), les flavanones, les flavones, les flavonols, les isoflavones, (**Manach et al., 2004**). Les différences individuelles au sein de chaque groupe proviennent de la variation du nombre et de l'agencement des groupes hydroxyle et de leur degré d'alkylation ou de glycosylation. Ces modifications influencent leurs propriétés biochimiques (**Pandey et Rizvi, 2009**).

Dans le pollen d'abeille, on trouve les flavonoides notamment dans la famille des *Asteraceae* (Camomille, tournesol), *Fabaceae* (Trèfle, haricot, soja), *Rosaceae* (Pomme, fraise, cerise), *Lamiaceae* (Menthe, basilic, thym), *Rutaceae* (Agrumes : orange, citron). Leurs propriétés antioxydantes neutralisent les radicaux libres, réduisant le stress oxydatif lié aux maladies chroniques. La quercétine module l'inflammation en inhibant les cytokines pro-inflammatoires (agit sur NF- κ B), tandis que l'apigénine renforce la fonction cardiovasculaire en améliorant la vasodilatation. Ces molécules protègent également le foie et potentialisent l'immunité. Leur synergie avec d'autres polyphénols amplifie leurs effets bénéfiques (**Kumar et Pandey, 2013**).

I.1.2.1. Flavonols

Les flavonols sont composée d'une double liaison entre C2-C3 et d'une fonction carbonyle en C4 (Figure 10). Les flavonols comprennent la quercétine, le kaempférol et la myricétine qui sont des flavonoïdes végétaux ubiquitaires et se trouvent dans des pollens provenant des familles botaniques suivantes : *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae* (fraise), *Lamiaceae* (Menthe, basilic). Des preuves émergentes issues d'essais cliniques ont montré que ces les flavonols ont un potentiel dans le prétraitement et la prévention des maladies

cardiovasculaires, la régénération cellulaire, la prévention de la coagulation sanguine, des maladies gingivales humaines et d'autres maladies liées au cœur (Singla *et al.*, 2019).

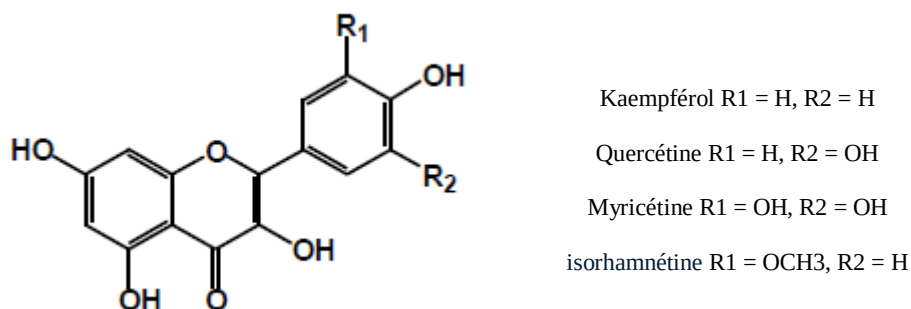


Figure 10 : Structure chimique de quelques flavonols (Tsao, 2010).

I.1.2.2. Flavanols

Les flavanols ou flavan-3-ols sont communément appelés catéchines. Contrairement à la plupart des flavonoïdes, il n'y a pas de double liaison entre C2 et C3, et pas de carbonyle en C4 dans le cycle C des flavanols (Figure 11). Ainsi l'hydroxylation en C3, permet aux flavanols d'avoir deux centres chiraux sur la molécule (en C2 et C3), d'où quatre diastéréoisomères possibles. La catéchine est l'isomère avec une configuration trans et l'épicatéchine est celui avec une configuration cis. Chacune de ces deux configurations a deux stéréoisomères, c'est-à-dire la (+)-catéchine, la (–)-catéchine, la (+)-épicatéchine et la (–)-épicatéchine. La (+)-catéchine et la (–)-épicatéchine sont les deux isomères souvent trouvés dans les plantes alimentaires.

Plusieurs types de pollens d'abeille provenant de différentes familles botaniques peuvent contenir les flavanols, on les trouve notamment dans les *Theaceae* (Thé vert, thé noir), *Rosaceae* (Pomme, poire), *Fabaceae* (Haricots, fèves), *Euphorbiaceae* (ricin) (Aruoma *et al.*, 2003). Les flavanols présents dans le pollen d'abeille offrent de nombreux bienfaits : ils agissent comme antioxydants, améliorent la santé cardiovasculaire, réduisent l'inflammation, favorisent la fonction cognitive et soutiennent le métabolisme. Leur consommation contribue ainsi à une meilleure santé globale et à la prévention de diverses maladies (Karak, 2019).

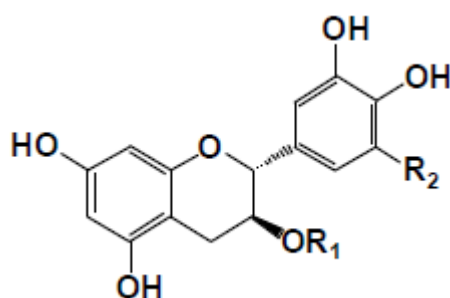
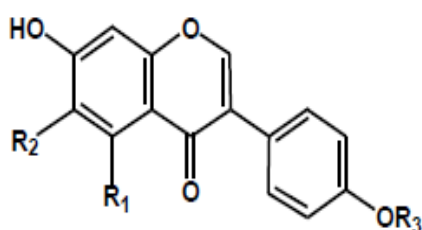


Figure 11 : Structure chimique de base des flavanols (Aruoma *et al.*, 2003).

I.1.2.3. Isoflavones

Les isoflavones présentent des similitudes structurales avec les œstrogènes, en particulier avec le 17- β -œstradiol. Les isoflavones représentent un cycle B attaché au cycle C à la position C3 de ce dernier cycle et présentent des groupes hydroxyle aux positions C7 et C4', similaires à l'œstradiol (Figure 12). Comme les isoflavones peuvent se lier aux récepteurs des œstrogènes, ils sont classés comme phytoestrogènes. On les trouve principalement dans les légumineuses, par exemple les pois chiches, les fèves ou les sojas. Ces derniers sont reconnus comme la source la plus abondante d'isoflavones, où la daidzéine, la génistéine et la glycitine, les trois molécules les plus importantes de cette sous-classe. Elles se présentent principalement sous forme de glycosides par conjugaison avec le glucose, étant donné la sensibilité à la chaleur des isoflavones. Cela conduit souvent à l'hydrolyse de la forme aglycone pendant le traitement et le stockage (Rasouli *et al.*, 2017 ; Singla *et al.*, 2019).

Dans le pollen, les isoflavones se trouvent dans les familles *Fabaceae* et *Papilionaceae* (Haricots, lentilles). Les isoflavones présents dans le pollen d'abeille favorisent la santé cardiovasculaire, préviennent certains cancers, améliorent la santé osseuse et offrent des effets antioxydants. Leur consommation contribue aussi à l'équilibre hormonal et à la protection contre diverses maladies (Mahmoud *et al.*, 2014).



Daidzéine : R1 = H ; R2 = H ; R3 = H

Formononétine : R1 = H ; R2 = H ; R3 = OCH₃

Glycitéine : R1 = H ; R2 = OCH₃

Génistéine : R1 = OH ; R2 = H ; R3 = H

Biochanine A : R1 = OH ; R2 = H ; R3 = OCH₃

Figure 12 : Structure chimique de quelques isoflavones (Tsao, 2010).

I.1.2.4. Flavanones

Les flavanones ont un squelette de 2,3-dihydroflavone, ils manquent d'une double liaison entre C2 et C3 (Figure 13). En conséquence, l'anneau B n'est pas plan. Ils sont généralement glycosylés par un disaccharide ou un glucoside en C7 pour donner un glycoside de flavanone. Ils existent en grande quantité dans les agrumes, les tomates et certaines plantes aromatiques (la menthe). Ils contribuent de manière significative à l'apport quotidien en flavonoïdes, dépassant celui des autres polyphénols, et leur biodisponibilité dépasse également celle des flavonols ou des flavan-3-ols (**Quideau et al., 2011**).

Ces molécules sont présentes dans les pollens appartenant à des familles telles que les *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae* (Myrte, clou de girofle). Elles agissent comme des antioxydants puissants, réduisent l'inflammation, soutiennent la santé cardiovasculaire, possèdent des propriétés antimicrobiennes et favorisent une meilleure digestion, contribuant ainsi à un bien-être général (**Rodríguez-Pólit et al., 2023**).

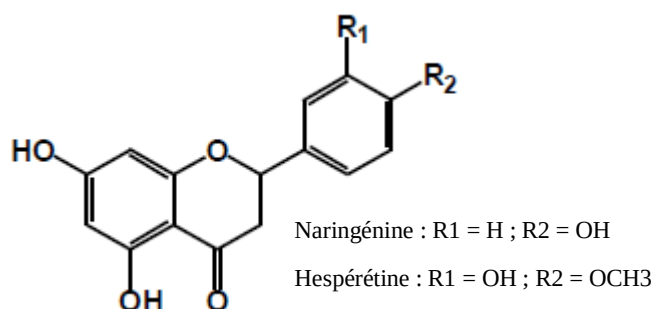


Figure 13 : Structure chimique de quelques flavanones (**Tsao, 2010**).

I.1.2.5. Flavones

Les flavones se caractérisent par la présence d'un noyau de flavone composé de deux cycles aromatiques (A et C) reliés par un cycle lactone (B) (Figure 14). Ils ont également des groupes hydroxyle et peuvent être alkylés ou glycosylés, ce qui contribue à leur diversité structurale et à leurs propriétés biologiques variées.

Les flavones se trouvent couramment dans les pollens des familles botaniques suivantes : *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae* et *Fabaceae*. Ils présentent divers bienfaits pour la santé grâce à leur pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien et cardioprotecteur (**Jiang et al., 2016**).

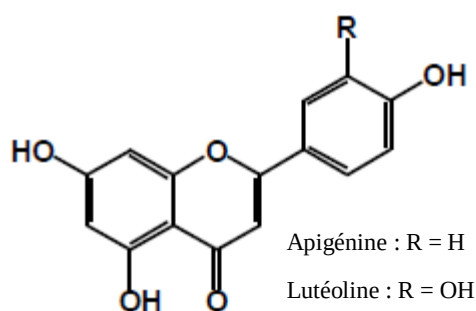


Figure 14 : Structure chimique de quelques flavones (Tsao, 2010).

I.1.3. Anthocyanidines

Les anthocyanidines sont les pigments rouges, bleus et violets qu'on trouve dans les fruits, les fleurs, les légumes et même dans certaines céréales comme le riz noir. Elles existent principalement sous forme glycosidique, appelées anthocyanines, avec 90 % basées sur la cyanidine, la delphinidine et la pelargonidine. Plus de 500 anthocyanines varient selon l'hydroxylation, la méthylation et la glycosylation. Leur couleur dépend du pH : rouges en milieu acide et bleues en milieu basique. D'autres facteurs, comme l'hydroxylation et la méthylation, influencent également leur couleur. Les anthocyanines sont chimiquement stables dans des solutions acides. Les anthocyanidines sont présents dans les pollens dérivant des familles botaniques telles que : *Ericaceae* (myrtilles), *Rosaceae* (cerises, framboises), *Asteraceae* (chardon-marie, certaines fleurs comestible) et *Caryophyllaceae* (silène). Leurs bienfaits résident dans leur capacités antioxydante, anti-inflammatoire et amélioratrice des fonctions cognitives (Anderson et Jordheim, 2006 ; McCallum *et al.*, 2007 ; Ullah *et al.*, 2020).

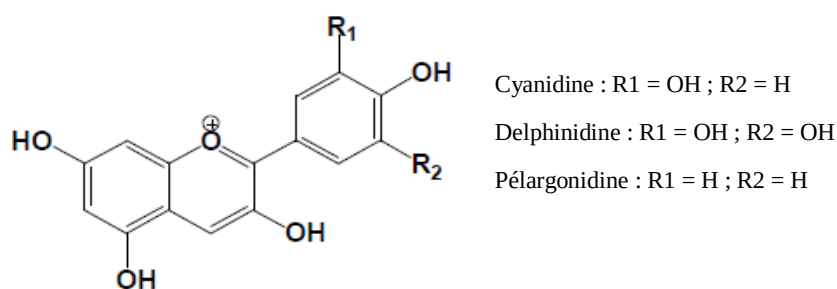


Figure 15 : Structure chimique de quelques anthocyanidines (Tsao, 2010).

I.1.4. Stilbènes

Les stilbènes sont une petite classe de métabolites secondaires. Ils se trouvent dans plusieurs plantes comestibles, par exemple, certains fruits rouges, raisins et arachides. Ils existent également dans les pollens provenant des *Vitaceae* (vigne), *Pinaceae* (pin, sapin) et *Moraceae* (figuier, mûrier). Ils ont une structure distincte composée de deux cycles aromatiques liés par une molécule d'éthylène. Le représentant principal des stilbènes est le resvératrol (cis et trans). Les pollens riches en resvératrol proviennent généralement de fleurs de plantes qui synthétisent naturellement ce composé, comme les vignes (*Vitis vinifera*). Ce stilbène particulier a fait l'objet d'études approfondies au cours des vingt dernières années, mettant en évidence que sa consommation apporte des bienfaits pour la santé en raison de ses propriétés cardiovasculaires, chimiopréventives, anti-obésité, antidiabétiques et neuroprotectrices (**Reinisalo et al., 2015 ; Annunziata et al., 2018**).

I.1.5. Les lignanes

Les lignanes sont des métabolites secondaires qui se trouvent principalement sous forme libre, et rarement sous forme glycosylée. Ils se trouvent dans les pollens des *Linaceae* (lin), *Cannabaceae* (*cannabis sativa*), *Silybaceae* (chardon-marie), *Apiaceae* (carottes, céleri) (**Kumar et al., 2021**). Ces composés possèdent un grand potentiel thérapeutique pour les maladies neurodégénératives (**Quideau et al., 2011**).

I.1.6. Coumarines

Les coumarines constituent une vaste famille de métabolites secondaires présents dans diverses espèces de plantes. Chimiquement parlant, les coumarines sont des hétérocycles organiques et leur noyau est représenté par la benzo-pyrone (2H-1-benzopyran-2-one) (Figure 16). On les trouve dans des pollens des familles *Apiaceae* (Persil, céleri), *Rutaceae* (citrons, oranges), *Fabaceae* (Trèfle), *Asteraceae* (Camomille). Ils sont connus pour leurs bienfaits, notamment antioxydants, anticoagulants et anti-inflammatoires (**Hoult et Paya, 1996; Borges et al., 2005 ; Ullah et al., 2020**).

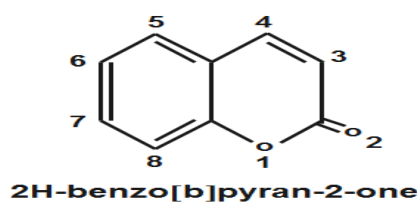


Figure 16 : Structure chimique de la coumarine (**Kostova et al., 2011**).

I.1.7. Tanins

Les tanins sont un groupe hétérogène de composés polyphénoliques hydrosolubles de poids moléculaire élevé (de 500 à 3000 daltons) avec jusqu'à 20 groupes hydroxyle et sont présents dans les plantes, les aliments et les boissons. Ils sont chimiquement réactifs et forment des liaisons hydrogène inter et intra-moléculaires capables d'interagir avec les macromolécules et même les précipiter, telles que les protéines et les glucides. Ils sont également responsables du goût astringent de nombreux fruits et légumes.

Les tanins peuvent être classés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (également appelés tanins de catéchine ou proanthocyanidines) **(De Jesus et al., 2012)**.

➤ Tanins hydrolysables

Ces composés sont hydrolysés par des acides faibles et se décomposent à haute température. Ils sont surtout présents dans les pollens des familles *Fagaceae* et *Rosaceae*. Ces tanins ont un effet antimicrobien et favorisent la digestion et l'absorption des nutriments **(Borges et al., 2005 ; Jiménez et al., 2014)**.

➤ Tanins condensés

Appelés également proanthocyanidines, ce sont les polyphénols d'origine végétale les plus abondants. Ces composés ne sont pas facilement hydrolysés ; ils se décomposent dans des conditions alcooliques acides pour donner des pigments rouges appelés phlobaphènes. On les trouve dans les pollens des *Fagaceae* et *Myrtaceae*. Ils se caractérisent par leur effet antioxydant et astringent aidant à resserrer les tissus et à réduire l'inflammation **(De Jesus et al., 2012 ; Ullah et al., 2020)**.

I.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont un groupe de composés pigmentés constitués d'une seule chaîne carbonée synthétisée par les plantes et certains micro-organismes comme les bactéries et les algues. Les caroténoïdes protègent les plantes contre le stress oxydatif et les photo-dommages **(Abd Alla et Salem, 2020)**. Les caroténoïdes constituent un groupe très diversifié de polyènes responsables de différentes couleurs, comme le jaune, l'orange, le marron et bien d'autres de nombreux produits d'origine végétale notamment le pollen d'abeille qui en représente une

source riche et dont la couleur varie selon l'origine botanique (**Kritchevsky, 1999 ;Thakur et Nanda, 2020**).

La β -cryptoxanthine, la lutéine et le lycopène sont les types de caroténoïdes les plus couramment présents dans les produits apicoles en général (**Margaoan et al., 2014**) tandis que la β -carotène est le plus fréquemment identifié dans le pollen d'abeille (**Milani et al., 2017**) mais il en contient d'autres caroténoïdes tels que la lutéine et le α -carotène (**El Ghouizi et al., 2023**).

La quantité de caroténoïdes trouvée dans les échantillons de pollen d'abeille dans la littérature est comprise entre 5 et 1 233,0 $\mu\text{g/g}$ (**Sattler et al., 2015**). Les caroténoïdes sont très bénéfiques pour la santé humaine grâce à leurs différentes activités biologiques, ils sont des anti-tumoraux, des anti-leucémiques et bénéfique contre les maladies cardiovasculaires (**El Ghouizi et al., 2023**). De plus, grâce à leur structure contenant un système de double liaison conjuguée, ils possèdent une forte activité antioxydante. Ils sont réputés pour être des prédateurs de radicaux libres et contribuent largement à la prévention de diverses maladies chroniques courantes. Ils existent notamment dans les pollens des familles *Asteraceae* (marguerite), *Solanaceae* (tomate), *Brassicaceae* (chou, brocoli) (**Ross, 2010 ; Margaoan et al., 2014**).

II. Activités biologiques du pollen d'abeille

II.1. Activité antioxydante

Le stress oxydatif est un processus physiologique qui résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité du corps à neutraliser leurs effets néfastes. Les radicaux libres, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ERO), sont des molécules instables contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend hautement réactives et capables d'endommager les cellules, les protéines, les lipides et l'ADN. Ce phénomène est impliqué dans le développement de nombreuses maladies, y compris le cancer, les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et les maladies neurodégénératives (**Derochette et al., 2013**).

Les antioxydants sont des molécules capables de neutraliser les radicaux libres en leur fournissant un électron, réduisant ainsi leur potentiel réactif. Ils jouent un rôle crucial dans la protection contre le stress oxydatif en maintenant l'équilibre redox dans l'organisme. Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories principales : enzymatiques et non

enzymatiques. Les antioxydants enzymatiques comprennent des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes agissent en cascade pour neutraliser les ERO et prévenir les dommages cellulaires. Par exemple, la SOD convertit le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, qui est ensuite décomposé en eau et oxygène par la CAT et la GPx (**Tabart et al., 2012**).

D'autre part, les antioxydants non enzymatiques comprennent des molécules telles que la vitamine C, la vitamine E, le glutathion, les flavonoïdes et les caroténoïdes. Ces composés agissent en piégeant les radicaux libres et en inhibant les réactions d'oxydation. Par exemple, la vitamine C peut neutraliser les radicaux hydroxyles, tandis que la vitamine E protège les membranes cellulaires des dommages oxydatifs.

Le pollen d'abeille est une source riche en antioxydants, à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Il contient une variété d'enzymes telles que la SOD, la CAT et la GPx, ainsi que des composés non enzymatiques tels que le glutathion, les flavonoïdes et les caroténoïdes. Ces antioxydants agissent en synergie pour neutraliser les ERO et protéger les cellules contre le stress oxydatif (**Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016**). Dans de nombreuses études, la réduction du stress oxydatif par des antioxydants alimentaires exogènes a été largement documentée. Les effets antioxydants du pollen d'abeille peuvent être attribués à l'activité des enzymes antioxydantes, ainsi qu'à la présence de composés phénoliques, de caroténoïdes, de vitamine C, de vitamine E et de glutathion. Dans ce contexte, une étude a prouvé que l'administration d'extrait de pollen d'abeille (250 mg/kg de poids corporel) a atténué le stress oxydatif induit par les protéines (**Aabed et al., 2019**).

Les acides phénoliques représentent en moyenne 0,19 % du pollen d'abeille, et leurs propriétés sont principalement liées à leur structure. Les flavonoïdes, quant à eux, sont le groupe phénolique le plus important trouvé avec une moyenne de 0,25 à 1,4% de sa composition totale ; ils sont un excellent indicateur de la qualité. Les flavonoïdes se trouvent principalement dans le pollen d'abeille sous forme de glycosides (flavonoïdes associés à des unités de sucre). Cependant, la présence de liaisons glycosidiques diminue l'activité antioxydante des flavonoïdes en raison des effets stériques, c'est pourquoi la teneur en flavonoïdes libres du pollen d'abeille est un bon critère de qualité. Les principaux flavonoïdes identifiés dans le pollen d'abeille sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les principaux flavones sont représentés par l'apigénine, la chrysine et la lutéoline ; les flavanones sont

représentés par la naringénine et la pinocembrine tandis que la génistéine est le principal isoflavone identifié. Pour les stilbènes, le resvératrol est le représentant le plus important.

Il a été démontré que les flavonoïdes présents dans le pollen d'abeille sont capables d'inactiver et de piéger les radicaux libres ERO. L'hydrogène provenant des groupes hydroxyles phénoliques des flavonoïdes capture la chaîne d'oxydation des radicaux libres ainsi ils forment des produits finaux stables qui inhibent toute autre oxydation. Les flavonoïdes se lient également aux ions métalliques et peuvent ainsi éliminer les métaux toxiques du corps **(Rzepecka-Stojko et al., 2015)**.

L'étude faite par Fatrcova-Sramkova et al. (2013) a montré que l'effet antioxydant peut varier en fonction des familles botaniques, par exemple les *Brassicaceae* ont un effet antioxydant meilleur que les *Papaveraceae* et ces dernières sont meilleures que les *Asteraceae*.

II.2. Activité antibactérienne

Plusieurs recherches ont prouvé l'efficacité antibactérienne du pollen d'abeille. D'après la littérature, *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à un extrait éthanolique (70 %) et *Salmonella enterica* est la bactérie la plus sensible à un extrait méthanolique (70 %). *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* sont moins sensibles aux extraits de pollen d'abeille. Les différentes études montrent que l'activité antibactérienne du pollen d'abeille diffère en fonction de la souche, de la composition du pollen et la concentration de l'extrait. L'effet antibactérien du pollen peut être expliqué par l'activité de la glucose oxydase, une enzyme produite par les abeilles et intégrée au pollen lors de la formation des pelotes. On a également prouvé que l'activité microbiologique est associée aux flavonoïdes et aux acides phénoliques. **(Erkmen et Özcan, 2008)**.

Le mécanisme d'action des flavonoïdes et des phénols contre les cellules bactériennes et fongiques est la dégradation de la membrane cytoplasmique, ce qui entraîne une perte d'ions potassium et l'initiation de l'autolyse cellulaire **(Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016)**.

II.3. Activité anti-inflammatoire

Les propriétés anti-inflammatoires du pollen d'abeille sont dues principalement à la présence d'acides phénoliques, de flavonoïdes et des phytostérols. Les différentes études faites sur ce sujet suggèrent que les polyphénols ou les flavonoïdes peuvent exercer des effets bénéfiques sur de nombreuses cellules intervenant dans la réponse immunitaire telles que les macrophages, les lymphocytes T, les lymphocytes B, les mastocytes, les basophiles, les

neutrophiles et les éosinophiles. La quercétine est un flavonoïde connue pour inhiber le métabolisme de l'acide arachidonique. Une diminution du taux d'acide arachidonique réduit le niveau de prostaglandines pro-inflammatoires et produit un effet anti-inflammatoire ce qui conduit à l'élimination de la douleur locale et la prévention de l'agrégation plaquettaire.

Les composés bioactifs du pollen d'abeille peuvent aussi agir sur différents mécanismes de stimulation ou d'inhibition de la phosphorylation des protéines modifiant ainsi les voies de signalisation cellulaire, y compris l'inhibition de la prolifération cellulaire. Ils peuvent également inhiber l'activation du facteur nucléaire NF- κ B dont la voie de signalisation est responsable de l'expression de gènes pro-inflammatoires produisant des cytokines et des molécules d'adhésion. En général, l'activité anti-inflammatoire du pollen d'abeille est comparée à celle de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Pascoal et al., 2014; Choi, 2007**).

II.4. Activité cicatrisante

Le pollen d'abeilles possède un fort effet cicatrisant grâce à son activité anti-inflammatoire permettant de raccourcir le temps de guérison et de diminuer l'inconfort à la fois en termes de durée et d'intensité des maladies et il présente surtout l'avantage d'être moins coûteux. Le mécanisme de l'effet anti-inflammatoire consiste à inhiber l'activité des enzymes responsables du développement des médiateurs du processus inflammatoire dans les tissus. Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont principalement responsables de telles actions mais les acides gras et les phytostérols participent également à ce processus. Les flavonoides tels que le kaempférol et la quercétine sont considérés comme les principaux acteurs dans cette activité. Le kaempférol grâce à sa capacité à inhiber l'activité de deux enzymes : l'hyaluronidase (enzyme catalysant la dépolymérisation de l'acide hyaluronique) et l'élastase (enzyme qui hydrolyse l'élastine) renforce le tissu conjonctif et scelle les vaisseaux sanguins, ce qui conduit à une diminution des réactions inflammatoires et des gonflements ainsi qu'une amélioration de la circulation sanguine. De ce fait, la peau devient humidifiée et tendue. Quant à la quercétine, elle baisse la production de l'histamine dans l'organisme en inhibant l'activité de l'histidine décarboxylase d'un côté. D'un autre côté, elle bloque la cascade du métabolisme de l'acide arachidonique, ce qui, à son tour, baisse le niveau de prostaglandines pro-inflammatoires et confère l'effet anti-inflammatoire, élimine la douleur locale et prévient l'agrégation plaquettaire (**Komosinska-Vassev et al., 2015**).

II.5. Activité antivirale

Le pollen d'abeille comprend une grande diversité de métabolites secondaires tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes ainsi que des acides aminés, des lipides et des vitamines. Ces composés peuvent contribuer à son activité antivirale (**Komosinska-Vassev et al., 2015**).

Etant donné que l'inflammation est souvent associée aux infections virales, la capacité du pollen d'abeille à réduire l'inflammation peut inhiber indirectement la réplication virale. Les études faites sur cette activité fournissent des preuves sur la capacité du pollen à inhiber certaines réplifications virales et à renforcer les réponses immunitaires ce qui peut contribuer à son activité antivirale (**Rodríguez-Pólit et al., 2023**).

II.6. Activité anticancéreuse

Des recherches ont prouvé que la portion stéroïdique d'un extrait chloroformé du pollen d'abeille de *Brassica campestris* stimule considérablement l'activité de l'enzyme caspase-3, tout en provoquant une réduction de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. Cela entraîne une cytotoxicité à l'égard des cellules cancéreuses, notamment celles de la prostate humaine, menant à leur apoptose. Ces résultats indiquent que le pollen d'abeille pourrait être une option thérapeutique prometteuse pour le cancer de la prostate. De plus, des extraits de pollen d'abeille du ciste (*Cistus incanus* L.) et du saule blanc (*Salix alba* L.) ont été testés et ils ont provoqué une diminution de l'étendue des dommages aux lymphocytes humains soumis à des médicaments anticancéreux tels que : bléomycine, mitomycine C et vincristine. Le niveau d'activité dépend de la teneur en polyphénols (**Wu et Lou, 2007**).

L'activité anti-oestrogénique des extraits de pollen d'abeille a été validée à travers des essais *in vivo* et *in vitro*. Les observations suggèrent que le pollen pourrait être utile pour diminuer le risque de maladies liées aux cancers hormonaux du sein, de l'utérus et de la prostate, et aussi pour améliorer la fonction prostatique chez les hommes plus âgés. Des études *in vitro* ont révélé que le pollen d'abeille présente des propriétés angiostatiques grâce à son action sur les mécanismes de régulation de la multiplication et du déplacement des cellules endothéliales. Par conséquent, il pourrait servir de moyen thérapeutique potentiel dans le traitement des maladies proangiogéniques (**Izuta et al., 2009**).

II.7. Effets cardioprotecteurs

Le pollen d'abeille exerce une activité hypolipidémique en réduisant les niveaux de lipides totaux, de triglycérides et de cholestérol. Chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires, la consommation du pollen d'abeille réduit la viscosité du sang et l'agrégation plaquettaire ce qui atténue la formation de la plaque athéroscléreuse. Ces effets du pollen d'abeille sont associés aux acides gras libres (oméga-3) agissant comme précurseurs de la prostaglandine-3, le principal inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. De plus, une activité accrue du système fibrinolytique a été confirmée après la prise de pollen, offrant une protection contre les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux (**Rzepecka-Stojko et al., 2015 ; Denisow et Denisow-Pietrzyk, 2016**).

II.8. Propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiques

Le diabète sucré est un trouble endocrinien caractérisé soit par une sécrétion insuffisante d'insuline et/ou son utilisation défectueuse (**Afsharpour et al., 2019**).

Les enzymes intestinales (α -amylase et α -glucosidase) décomposent les polysaccharides en glucose pour être transporté dans les cellules du corps. Les niveaux de glucose pourraient être modifiés en altérant l'activité de ces enzymes. Les inhibiteurs de ces enzymes peuvent induire un contrôle glycémique. Les extraits aqueux et éthanoliques de pollen d'abeille ont montré une inhibition significative de l' α -amylase (IC_{50} 4,51 mg/ml). Les extraits aqueux de pollen d'abeille ont inhibé l' α -glucosidase avec un IC_{50} de 0,60 mg/ml considéré comme meilleur que le contrôle (acarbose) dont l' IC_{50} est de 11,30 mg/ml. Ainsi, le pollen d'abeille pourrait agir comme un inhibiteur naturel de l' α -glucosidase pour améliorer la glycémie (**khalifa et al., 2021**).

II.9. Activité hépatoprotectrice et détoxifiante

Plusieurs études *in vivo* se sont intéressées aux effets hépatoprotecteurs du pollen d'abeille. Les tests consistent à l'empoisonnement de ces animaux par des composés organiques (éthanol, tétrachlorure de carbone et trichloréthylène, éthionine, fluorure d'ammonium) ou par des médicaments (paracétamol et hydrocortisone) et les résultats ont montré que les composés bioactifs du pollen ont amélioré la fonction hépatique en réduisant les niveaux pathologiques d'enzymes (alanine transaminase, aspartate transaminase, phosphatase acide) et de bilirubines présentes dans le sang des individus empoisonnés (**Eraslan et al., 2009**).

L'activité de détoxification du pollen est associée aux polyphénols, principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques. Un effet de détoxification du pollen d'abeille a été démontré chez des rats intoxiqués par des métaux lourds ou des pesticides (carbaryl, protuxor). Par conséquent, les extraits de pollen d'abeille sont recommandés dans les conditions inflammatoires aiguës et chroniques, les conditions dégénératives initiales, les maladies hépatiques cholestatiques ainsi que dans les lésions toxiques et post-traumatiques de cet organe (**Pascoal et al., 2014**).

II.10. Effet sur l'hyperplasie bénigne de la prostate

L'usage principal du pollen en médecine vise à prévenir et traiter des problèmes de la prostate. Ces problèmes peuvent entraîner des complications ou des douleurs pendant la miction, souvent associées à une sensation de brûlure, un besoin fréquent et urgent d'uriner, ainsi qu'à des douleurs dans le bas du dos ou l'abdomen. L'hyperplasie bénigne de la prostate est une augmentation bénigne du volume de la prostate due à de petites proliférations non malignes au sein de cette glande. La prostatite chronique est très courante chez les hommes âgés, ce qui pourrait être lié à l'âge et aux changements hormonaux. Les traitements conventionnels semblent ne pas satisfaire toujours les patients raison pour laquelle ces derniers se tournent de plus en plus vers la phytothérapie et d'autres traitements complémentaires, y compris la prise du pollen d'abeille. La prostatite peut être causée par des agents pathogènes bactériens ou non bactériens. Dans une étude *in vivo*, il a été découvert que le pollen avait la capacité d'inhiber diverses voies inflammatoires, y compris le facteur nucléaire NF- κ B, la prostaglandine E2 (PGE2) et le malondialdéhyde (MDA) (**Campos et al., 2010**). D'autres mécanismes d'action sont mis en évidence, tels que l'inhibition du gène Mfn1 contribuant ainsi à l'amélioration de l'hyperplasie bénigne de la prostate et la diminution du stress oxydatif dans les cellules prostatiques (**Chen et al., 2020**). Le pollen d'abeille peut aussi moduler le microbiote intestinal, ce qui a une incidence directe sur la santé de la prostate. Un ajustement bénéfique du microbiote pourrait diminuer l'inflammation systémique et améliorer la balance des bactéries bénéfiques, ce qui aiderait à réduire l'hypertrophie de la prostate (**Qiao et al., 2023**).

Partie
expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

Chapitre I : Matériel et méthodes

Dans cette étude, 14 échantillons de pollen d'abeilles ont été récoltés en 2018 de différentes régions d'Algérie (Adekar, Akbou, Beni Ourtilane, Blida, Bordj Bou Arreridj, Boukhelifa, Boumerdès, Feraoune, Kherrata, Melbou, Sidi Aich, Tazmalt, Tizi Ouzou et Toudja) (Tableau III). La sélection des échantillons était aléatoire et simple.

Tableau III : Régions de récolte des échantillons et leurs images respectives.

Echantillons	Régions (Wilaya)	Photographies des échantillons de pollen d'abeille	
P1	Adekar (Bejaia)	P1	P2
P2	Akbou (Bejaia)		
P3	Beni Ourtilane (Sétif)	P3	P4
P4	Blida		
P5	Bordj	P5	P6
P6	Boukhelifa (Bejaia)		
P7	Boumerdès	P7	P8
P8	Feraoune (Bejaia)		
P9	Kherrata (Bejaia)	P9	P10
P10	Melbou (Bejaia)		
P11	Sidi Aich (Bejaia)	P11	P12
P12	Tazmalt (Bejaia)		
P13	Tizi Ouzou	P13	P14
P14	Toudja (Bejaia)		

Tous les échantillons ont été récoltés en 2018 puis broyés afin d'obtenir une poudre fine.

I. Analyses polliniques

Les analyses polliniques sont réalisées selon le protocole de Louveaux et al. (1978). Une quantité de 1 g de pollen broyé est dissoute dans 50 ml d'eau distillée. Après agitation et homogénéisation pendant 20 min, le surnageant est éliminé et 60 μ l de l'homogénat sont étalés sur une lame de verre. Après séchage à l'étuve, les lames sont recouvertes de gélatine glycérinée et une observation par microscopie électronique à balayage (MEB) est effectuée. L'identification des grains de pollen est réalisée grâce aux bases de données du Centre de Recherche Apicole de la Moselle, France (CETAM).

II. Préparation des extraits de pollen

Les extraits de pollen sont préparés selon la méthode de Carpes et al. (2007). Une quantité de 0,5 g de pollen d'abeille est mélangée avec 70 ml d'éthanol à 70 %. Après une agitation de 2h, la solution obtenue est filtrée et gardée au frais à 4 °C.

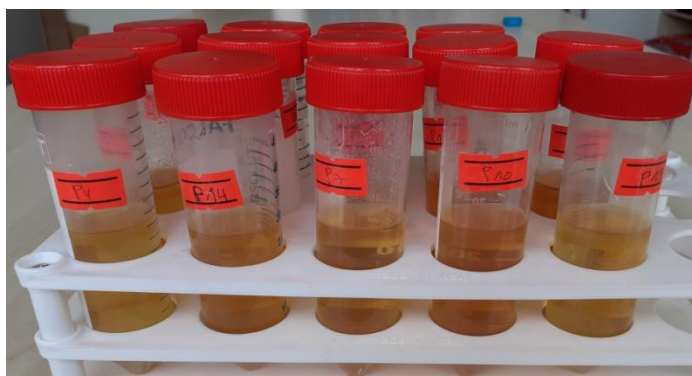


Figure 17 : Les extraits des échantillons de pollens d'abeilles.

III. Analyses physico-chimiques

III.1. Couleur

Une quantité de 0,07 g de pollen d'abeille est dissoute dans 10 ml d'éthanol à 70 %. Après agitation et filtration, l'absorbance est lue à 450 nm (**Bathe et Singh, 1999**).

III.2. Dosage des protéines

Pour déterminer la teneur en protéines des échantillons de pollen d'abeilles, la méthode décrite par Azeredo et al. (2003) est suivie. Cette méthode colorimétrique utilise le colorant bleu de Coomassie G250 qui change de couleur lorsqu'il se lie à des protéines solubles. Le colorant forme d'abord un complexe avec les résidus d'acides aminés protonés qui modifient la conformation de la protéine, exposant ses régions hydrophobes. Ensuite, le colorant se lie à ces régions, changeant sa couleur du rouge au bleu (Lau et al., 2022).

Pour 5 ml du réactif de Bradford, 100 µl d'extrait de pollen sont ajoutés. Après homogénéisation, l'absorbance est lue à 595 nm. Les concentrations des protéines sont exprimées en mg d'équivalent d'albumine de sérum bovin (BSA) pour 1g d'échantillon de pollen (mg d'EBSA/1g) en se référant à la courbe d'étalonnage de BSA (Annexe 1, figure 1).

III.3. Dosage des minéraux

Les quantités de différents minéraux dans les échantillons de pollen d'abeille sont étudiées par spectroscopie d'émission optique à plasma couplé inductivement (ICP OES) suivant la méthode décrite par Kostić et al. (2015). Pour cela, 300 mg de pollen d'abeille sont mis dans le récipient de digestion auquel 5 ml d'acide nitrique et 3 ml de peroxyde d'hydrogène sont ajoutés. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, ils sont digérés dans un système de digestion micro-ondes fermé et les solutions obtenues sont diluées avec de l'eau bidistillée à 50 ml avant de mesurer les différents minéraux (Ca, K, Mg, Na, Al, Fe, Mn et Zn) aux longueurs d'ondes respectives et appropriées (422,7 ; 766,5 ; 285,2 ; 589,0 ; 396,15 ; 238,2 ; 257,61 ; 213,9 nm). L'appareil ICP-OES est calibré en utilisant des solutions standards des différents minéraux et les résultats sont exprimés en mg/Kg.

IV. Dosage des antioxydants

IV.1. Composés phénoliques totaux

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique. Dans le test colorimétrique du dosage des polyphénols totaux, ces acides sont réduits en oxyde bleu de tungstène et de molybdène respectivement par l'oxydation des phénols présents dans le pollen d'abeille. La couleur bleue résultante de cette réaction d'oxydo-réduction est proportionnelle au taux des composés phénoliques dans l'échantillon (Adepado et al., 2009).

La teneur en composés phénoliques est déterminée en utilisant la méthode de Naithani et al. (2006). Pour un volume de 100 µl d'extrait de pollen d'abeille, 100 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (50 %) sont ajoutés. Ensuite, 2 ml de la solution de carbonate de sodium sont additionnés (Na_2CO_3 , 2 %) au mélange réactionnel. Ce dernier est laissé 30 minutes dans l'obscurité et l'absorbance est déterminée à 750 nm.

Les concentrations en composés phénoliques sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique pour 1g d'échantillon de pollen d'abeille (mg EAG/1g) en utilisant la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 1, figure 2).

IV.2. Flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes par cette méthode repose sur l'ajout de nitrite de sodium (NaNO_2) en premier pour produire une oxydation et former de l'acide nitreux. Ensuite, l'addition du chlorure d'aluminium (AlCl_3) permet de former des chélates rouges avec des flavonoïdes en milieu alcalin (**Huang et al., 2018**).

La teneur totale en flavonoïdes est déterminée selon la méthode décrite par Fukumoto et Mazza (2000). Un volume de 100 µl d'extrait de pollen d'abeille est mélangé avec 4 ml d'éthanol et 300 µl de NaNO_2 (5 %). Le mélange est laissé 5 minutes puis 300 µl de AlCl_3 (10%) sont ajoutés, ce mélange est laissé 6 minutes et à la fin une quantité de 2 ml de soude (NaOH , 1M) est ajoutée. L'absorbance du mélange est lue à 510 nm. Les concentrations en flavonoïdes sont exprimées en mg équivalent de catéchine pour 1g d'échantillon de pollen d'abeille (mg ECA/1g) en référence à la courbe d'étalonnage la catéchine (Annexe 1, figure 3).

IV.3. Proanthocyanidines

Par l'utilisation du chauffage acide, les liaisons carbone-carbone entre les unités structurales des proanthocyanidines sont rompues. Il en résulte la libération de molécules de flavanols et des carbanions instables qui seront oxydés pour produire des anthocyanes rouges (**Thompson et al., 1972**).

L'évaluation des quantités des proanthocyanidines dans les échantillons est déterminée par la méthode HCl/Butanol (**Maksimovic et al., 2005**). Pour cela, 500 µl d'extrait de pollen sont mélangés avec 2 ml du réactif HCl/butanol (2:3). Après 1 heure d'incubation dans un bain-marie à 95 °C, l'absorbance est lue à 530 nm. Les concentrations des proanthocyanidines sont exprimées en mg équivalent de catéchine pour 1g de pollen d'abeille (mg ECA/1g) en se basant sur la courbe d'étalonnage de la catéchine (Annexe 1, figure 4).

IV.4. Caroténoïdes

Pour réaliser le dosage des caroténoïdes contenus dans les échantillons du pollen d'abeille, une méthode d'extraction solide-liquide des caroténoïdes à partir de cette matrice est nécessaire. Pour cela, un mélange de trois solvants de différentes polarités est utilisé à savoir : l'hexane, l'acétone et l'éthanol. L'hexane représente la phase apolaire qui permet la récupération des caroténoïdes tandis que l'éthanol et l'acétone représentent la phase polaire qui élimine les interférents tels que les polyphénols (**Amorim-Carrilho et al., 2014**).

Les caroténoïdes sont extraits par la méthode de Sass-Kiss et al. (2005). Pour cela, 20 ml d'un mélange de solvants : hexane, acétone, éthanol : (2/1/1) sont ajoutés à 0,2 g de pollen d'abeille broyé. Après 2 heures d'agitation, trois phases distinctes se forment dont la phase hexanique qui est récupérée et son absorbance est déterminée à 450 nm. Les concentrations en caroténoïdes sont exprimées en mg équivalent de β carotène pour 1g d'échantillon de pollen d'abeille (mg E β C/1g) en se référant à la courbe d'étalonnage de la β carotène (Annexe1, figure 5).

V. Activités antioxydantes

V.1. Activité anti-radicalaire DPPH (Scavenger)

C'est la méthode la plus simple et la plus largement rapportée pour détecter l'activité antioxydante dans de nombreux échantillons. Dans cet essai, le radical chromogène violet 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) est réduit par un agent antioxydant/réducteur en hydrazine de couleur jaune pâle. L'agent antioxydant cède un atome d'hydrogène ou un électron et conduit ainsi à la formation de la forme réduite (DPPH₂) qui se manifeste par une décoloration de la solution et l'apparition d'une couleur jaune pâle due à la présence de groupement picryl. La procédure implique la mesure de la diminution de l'absorbance du DPPH à son maximum d'absorption de 517 nm. Cette diminution est proportionnelle à la concentration des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (**Boligon et al., 2014**).

L'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH par les échantillons de pollen d'abeille est faite en utilisant la méthode de Cuendet et al. (1997). Un volume de 100 μ l d'extrait de pollen d'abeille à la concentration de 7,14 mg/ml est mélangé avec 2 ml d'une solution de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 15 minutes puis l'absorbance est mesurée à 517 nm. Ensuite, le pourcentage de scavenging est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de scavenging DPPH (\%)} = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

A_c : Absorbance du contrôle (2 ml de la solution DPPH + 100 μ l d'éthanol à 70 %).

A_e : Absorbance de l'échantillon.

V.2. Activité anti-radicalaire ABTS

La réaction entre le sel ABTS et un agent oxydant puissant (tel que le persulfate de potassium) produit le radical cationique ABTS $\bullet^+$ par l'arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS ce qui va donner une solution de couleur bleue-verte. En présence d'antioxydants donneurs d'électrons, le radical cationique ABTS $\bullet^+$ regagne un électron et retrouve son état initial et stable ABTS permettant ainsi la décoloration de la solution (Boligon *et al.*, 2014).

Pour réaliser ce test, une quantité de 100 μ l d'extrait de pollen d'abeille (7,14 mg/ml) est mélangée à 1 ml de la solution d'ABTS. Ensuite, le mélange est laissé incuber pendant 7 minutes à l'obscurité puis l'absorbance est lue à 734 nm (Re *et al.*, 1999). Enfin, le pourcentage de réduction du radical ABTS est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage de réduction ABTS (\%)} = [(A_c - A_e) / A_c] \times 100$$

A_c : Absorbance du contrôle (1 ml de la solution ABTS + 100 μ l d'éthanol à 70 %).

A_e : Absorbance de l'échantillon.

V.3. Test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Dans un milieu réactionnel à faible pH et en présence d'antioxydants, le complexe ferrique 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (Fe $^{3+}$ -TPTZ) est réduit pour donner la forme ferreux colorée en bleu intense (Fe $^{2+}$ -TPTZ). La forme Fe $^{2+}$ -TPTZ a un maximum d'absorbance à 593 nm (Alvarez-Suarez *et al.*, 2010).

Le test FRAP est réalisé selon le protocole décrit par Benzie & Strain (1999). Brièvement, le réactif FRAP est préparé en mélangeant 3 solutions : tampon acétate (300 Mm, pH 3,6), 2,4,6-tripyridyls-triazine (TPTZ ; 10 mM TPTZ dans 40 mM HCl) et FeCl $_3$ (20 mM) avec des ratios respectifs de (10:1:1). Un volume de 100 μ l d'extrait de pollen dilué de 1/5 est mélangé à 1 ml de la solution de FRAP. Après 5 min, l'absorbance est lue à 593 nm. Les concentrations sont exprimées en μ mol équivalent sulfate de fer (II) pour 1g d'échantillon de pollen d'abeille (μ mol E FeSO $_4$ /1g) en utilisant la courbe d'étalonnage de sulfate de fer (II) (Annexe 3, figure 1).

V.4. Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur reflète le potentiel des substances de réduire le chlorure ferrique (FeCl_3) en chlorure ferreux (FeCl_2) dans un milieu réactionnel acidifié par l'acide trichloroacétique et en présence d'un agent chromogène (le ferricyanure de potassium). La forme réduite (FeCl_2) donne une couleur verte qui absorbe à 700 nm (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).

L'évaluation du pouvoir réducteur est faite selon le protocole décrit par Beretta et al. (2005). Un volume de 500 μl d'extrait de pollen est homogénéisé avec 1500 μl de tampon phosphate (pH 6,6) et 1500 μl de ferricyanure de potassium [$(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$] (1%). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min, puis 1500 μl de trichloroacétate (TCA, 10%) y sont ajoutés. Un volume de 1250 μl est prélevé du mélange et dilué dans 1250 μl d'eau distillée et 250 μl de chlorure ferrique (FeCl_3) (0,1 %) sont additionnés. Après 10 min, l'absorbance est lue à 700 nm. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique pour 1g d'échantillon de pollen d'abeille (mg EAG/1g) en se basant sur la courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe 3, figure 2).

VI. Analyse HPLC: High performance liquid chromatography

Un volume de 35 ml d'éthanol à 70 % est ajouté à 3 g d'échantillon de pollen d'abeilles broyé. Ensuite, le mélange est agité avec un agitateur pendant 24 heures à température ambiante. Les échantillons sont filtrés avec du papier filtre Whatman puis avec un filtre seringue de 0,45 micromètre et concentrés dans un évaporateur rotatif à 40 °C.

Après évaporation de l'éthanol, le résidu de chaque échantillon est dissous dans 10 ml d'eau distillée acidifiée (pH = 2). Les échantillons sont ensuite extraits par addition de 10 ml d'éther diéthylique et agitation pendant 15 min à 200 rpm puis 5 ml d'éther diéthylique et agitation à nouveau à 200 rpm pendant 15 min. L'acétate d'éthyle est un autre solvant utilisé pour l'extraction deux fois, d'abord en ajoutant 10 ml à chaque échantillon et en agitant pendant 15 min à 200 rpm puis en ajoutant 5 ml de ce solvant, en agitant 15 min à 200 tr/min également. Progressivement après chaque étape d'agitation, le surnageant est collecté pour être évaporé ultérieurement par un évaporateur rotatif. Le résidu final de chaque échantillon est redissous dans 2 ml de méthanol et filtré par un filtre seringue de 0,45 micromètre. Les échantillons sont dilués au 1/5 avec du méthanol avant analyse HPLC.

L'HPLC avec un détecteur UV est utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des standards et des échantillons (longueur d'onde de 280 nm). La séparation est effectuée sur une

colonne avec une colonne C18 en phase inverse (150 mm × 4,6 mm, 5 µm ; Fortis), dans les systèmes de solvants à gradient A (2 % d'acide acétique dans l'eau) et le solvant B (70 :30, acétonitrile/eau) qui a été soniqué avant agitation et dégazé en continu par le système HPLC intégré. Le volume d'injection d'échantillon est de 20 µl, la température de la colonne est de 30 °C et le débit est de 0,75 ml/min. Le gradient utilisé est détaillée dans le Tableau IV.

Dix-neuf standards de composés phénoliques sont utilisés dans cette étude. Pour l'analyse quantitative de chaque composant phénolique, des courbes d'étalonnage avec des coefficients de corrélations compris entre 0,998 et 1,000 sont utilisées.

Tableau IV : Programme de gradient du détecteur RP-HPLC-UV.

Temps (min)	Solvant A (2% acide acétique, eau ultra pure)	Solvant B (70 %: acétonitrile, (30 %: eau ultra pure)
0,01	95,00	5,00
3,00	95,00	5,00
8,00	85,00	15,00
10,00	80,00	20,00
12,00	75,00	25,00
20,00	60,00	40,00
30,00	20,00	80,00
35,00	95,00	5,00
50,00	95,00	5,00

RP HPLC: Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography

(Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Rétrograde).

VII. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des différents échantillons de pollen d'abeille est testée contre 8 bactéries et 2 souches de levures comme suit :

➤ Les bactéries

**Bacillus subtilis* ATCC 6633

**Salmonella typhimurium* ATCC 14028

**Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

**Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922

**Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

**Yersinia pestis* ATCC 25924

**Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22019

➤ Les levures

**Candida albicans* ATCC 10231

**Candida parapsilosis* ATCC 22019.

VII.1. Test de sensibilité

Pour étudier l'activité antimicrobienne, les deux méthodes : diffusion sur disque et concentration minimale d'inhibition (CMI) sont utilisées selon la méthodologie standard du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Après avoir été prélevées sur un stock de glycérol congelé à -20 °C, les bactéries sont ensemencées en bouillon Mueller-Hinton (MHB) et incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C, tandis que les levures sont cultivées en bouillon Sabouraud Dextrose (SDB) pendant 48 heures à 30 °C. Ensuite, des cultures de gélose fraîches sont préparées.

Des suspensions de cellules bactériennes de 1,108 UFC/ml (norme de densité 0,5 McFarland) et des suspensions de levures de 3,108 UFC/mL (norme de densité 1 McFarland) sont préparées à partir de différentes cultures d'une nuit afin de réaliser les inoculums. Plus tard, les différents disques sont mis dans chaque boîte de culture. La gentamicine et l'ampicilline sont utilisées comme antibiotiques de contrôle positif pour les bactéries Gram positives et Gram négatives, respectivement. Les échantillons sont testés à une concentration de 142 µg/ml, obtenue par dilution des extraits originaux avec de l'eau distillée tandis que les contrôles à une concentration de 100 µg/ml.

Les diamètres des zones d'inhibition (DZI) sont donnés en mm et les échantillons sont classés selon l'échelle d'activité antimicrobienne estimée suivant la méthode de Yerlikaya (2014) comme suit: non sensible (<8 mm), sensible (8–14 mm), très sensible (15–19 mm) et extrêmement sensible (>20 mm).

VII.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les CMI représentent les concentrations les plus faibles empêchant la croissance microbienne. Ce test n'est réalisé qu'avec les souches bactériennes sensibles ayant montré une zone d'inhibition dans le test de sensibilité précédent selon la méthodologie standard du CLSI.

Pour déterminer les CMI, une suspension de 0,5 Mc est préparée à partir d'une culture d'une nuit pour chaque souche. Ensuite, chaque suspension est diluée au 1/100 et 100 µl sont placés dans chaque puits des microplaques à 96 puits. Pour tous les dosages, des solutions mères des extraits testés sont préparées à 10 mg/ml, ensuite 100 µl d'extrait approprié sont ajoutés au premier puits et des microdiluions en série sont préparées. Le MHB seul et le MHB avec des bactéries sont utilisés respectivement comme témoins positifs et négatifs dans ce test. Les résultats de CMI sont évalués visuellement en observant l'aspect de croissance bactérienne et par mesure d'absorbance spectrophotométrique à 620 nm.

VIII. Activités enzymatiques

L'activité enzymatique des échantillons est étudiée avec 3 enzymes :
Acétylcholinestérase (AChE), α -glucosidase et la superoxyde dismutase (SOD).

VIII.1 Activité anti-AChE

L'acétylcholinestérase hydrolyse son substrat qui est l'acétylcholine et produit de l'acétate et de la choline. Les groupements thiols (SH) de cette dernière réagissent avec un chromogène nommé l'acide 5,5'-dithiobis[2-nitrobenzoïque] (DTNB) pour former un anion de couleur jaune TNB^- (5-thio-2-nitrobenzoate). L'intensité de la couleur est proportionnelle avec l'activité de l'acétylcholinestérase. Le suivi de l'évolution de la concentration de TNB^- à 412 nm reflète l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase (**Worek et al., 2012**).

Les effets d'inhibition de l'AChE des extraits sont mesurés selon la méthode (**Barut et al., 2017**). La galantamine est utilisée comme témoin positif. Tampon Tris-HCl à pH 8 (50 μl , 50 mM), acide 5,5-dithio-bis (2 nitrobenzoïque) (DTNB) (125 μl , 3 mM), AChE (25 μl , 0,2 U/ml) et les extraits à différentes concentrations (50 ; 100 ; 200 ; 400 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) sont ajoutés dans la microplaque et incubés pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, 25 μl de 15 mM de substrat (AChE) sont ajoutés pour démarrer la réaction enzymatique et une incubation est faite pour 15 minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est lue à 412 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE est calculé en utilisant la formule suivante puis les IC_{50} sont calculés.

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: Activité de l'enzyme en absence de l'échantillon

B: Activité de l'enzyme en présence de l'échantillon

VIII.2. Activité anti- α -glucosidase

L'hydrolyse du p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside (pNPG) par l'enzyme α -glucosidase conduit à la libération du p-nitrophénol (pNP). Dans cette méthode, la quantité libérée du produit formé (pNP), caractérisé par une couleur jaune, est suivi en mesurant son absorbance à 405 nm. La diminution de la production du pNP dans le milieu réactionnel reflète l'inhibition de l'activité de l'enzyme α -glucosidase (**Zhang et al., 2019**).

Le test d'inhibition de l' α -glucosidase est effectué suivant la méthode décrite par Şöhretoğlu et al. (2017). L'acarbose est utilisé comme témoin positif et les extraits sont dilués avec tampon phosphate (50 mM, pH 6,9) afin de préparer différentes concentrations pour chaque échantillon de pollen (50 ; 100 ; 200 ; 400 et 1000 $\mu\text{g/ml}$). Pour réaliser ce test, 50 μl

de l'extrait sont ajoutés à 100 µl de l' α -glucosidase (0,5 U/ml). Après incubation de 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante, du p-nitrophényl- α -glucopyranoside (4-pNPG) (50 µl, 5 mM) est ajouté et le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Les pourcentages d'inhibition de l' α -glucosidase sont calculés en utilisant la formule suivante et les valeurs des IC_{50} sont également déterminées.

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: Activité de l'enzyme en absence de l'échantillon

B: Activité de l'enzyme en présence de l'échantillon

VIII.3. Activité SOD

Dans ce test, l'inhibition de la réduction du Nitroblue TetrazoliumTest (NBT) par la SOD est mesurée suivant la méthode décrite par Sabuncuoğlu et Şöhretoğlu (2012).

Pour cela, un mélange réactionnel contenant 250 mM de tampon phosphate (pH 7,8), EDTA (0,1 mM), NBT (75 µM) et méthionine (13 mM) est préparé. Une quantité de 2740 µl de ce mélange est additionné de 60 µl riboflavine (2 µM) et de 200 µl d'extrait avec différentes concentrations (50 ; 100 ; 200 ; 400 et 1000 µg/ml) et le tout est incubé à température ambiante pendant 15 minutes. Les absorbances sont lues à 560 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'anion superoxyde généré est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition de réduction de NBT par SOD} = [(DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{traitement}} / DO_{\text{contrôle}})] \times 100$$

$DO_{\text{contrôle}}$: la densité optique mesurée dans le groupe témoin (sans traitement).

$DO_{\text{traitement}}$: la densité optique mesurée en présence de l'échantillon.

IX. Test de viabilité cellulaire

Le test de viabilité cellulaire est réalisé par la technique micro culture tetrazolium (MTT). C'est un test colorimétrique dont le principe repose sur la réduction du sel de tétrazolium jaune (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT) en cristaux de formazan violets par des cellules métaboliquement actives (c'est-à-dire celles qui sont vivantes). Cette réaction est due à l'activité des enzymes oxydoréductases dépendantes du NAD(P)H contenues dans les cellules viables qui réduisent le MTT en formazan (Berridge et Tan, 1993).

Dans ce test, la cytotoxicité d'échantillons de pollen d'abeille est testée par la méthode MTT décrite par Takenouchi et Muneakata (1998) et Rza dkowska et al. (2016).

Après 24 heures d'incubation (37 °C; 5 % CO₂), les cellules HaCaT, Vero et HeLa sont cultivées dans des plaques de 96 puits avec le milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) contenant 5 % de sérum bovin fœtal et 1 % de pénicilline/streptomycine, pour obtenir 10⁴ cellules par puits. Après une nouvelle incubation de 24 heures, la densité cellulaire est vérifiée au microscope, et le test de cytotoxicité commence. Les échantillons de pollen d'abeille sont filtrés avec un filtre de 0,22 µm et préparés à différentes concentrations (0 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 et 150 µg/ml). Les plaques sont ensuite incubées avec ces extraits pendant 24 heures. Après incubation, le milieu est remplacé avec 100 µl de DMEM frais additionné de 10 µl de MTT. Après 3 heures, chaque puits est traité avec 50 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'absorbance est déterminée à 570 nm. L'apparition de couleur violette dans les puits indique les cellules viables et les incolores indiquent les cellules mortes. La viabilité cellulaire est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = [(\text{absorbance de l'échantillon} / \text{absorbance du contrôle})] \times 100$$

X. Test de cicatrisation (Scratch assay)

Le test de cicatrisation est fréquemment utilisé dans des études relatives à la guérison des blessures pour étudier la migration des cellules. Il s'agit de générer une « bande » dans une culture cellulaire confluente et d'observer ensuite la capacité des cellules à migrer et à combler le vide préalablement créé (Liang *et al.*, 2007).

Afin d'évaluer le pouvoir cicatrisant du pollen d'abeille, les échantillons préalablement sélectionnés selon les résultats du test MTT à savoir P4, P7, P8 et P14 à une concentration de 100 µg/ml sont testés pour leur capacité à cicatriser les plaies selon la méthode décrite par Şahin *et al.* (2019). Pour cela, des cellules HaCaT sontensemencées dans des plaques à 6 puits avec une densité de 10⁶ cellules/puits dans le milieu DMEM additionné de 10 % de FBS. Chaque puits est gratté à l'aide d'un embout stérile de 1000 µl et les cellules sont lavées avec du tampon PBS pH 7,4 avant de mettre dans chaque puits l'extrait approprié. L'aspect visuel des rayures est contrôlé au microscope avant incubation des plaques (37 °C ; 5 % CO₂). Des photos sont prises au même endroit de la rayure pour chaque échantillon à différents moments d'incubation 0, 24, 48 et 72 h à l'aide d'un microscope inversé avec un appareil photo numérique.

XI. Activité antivirale

Le test antiviral *in vitro* pour le cas de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) repose sur l'évaluation de la capacité d'un composé à inhiber la réplication virale dans des cultures cellulaires. D'abord les cellules sont infectées par le virus HSV-1. Après infection, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de l'agent antiviral potentiel puis laissées incuber pour permettre la réplication virale. L'inhibition de la réplication virale est mesurée par la conservation de l'intégrité cellulaire **(De Clercq, 2004)**.

L'activité antivirale est évaluée suivant la méthode décrite par Chiamenti et al. (2019). Pour effectuer le test d'activité antivirale, les cellules Vero sontensemencées pendant 24 h (37 ° C; 5 % de CO₂) dans du milieu DMEM avec 10 % de FBS afin d'avoir une monocouche de 240 000 cellules dans chaque puits. Après cela, les cellules sont infectées par la suspension Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1). Après incubation pendant 1 h, la suspension de HSV-1 est retirée et remplacée par des extraits de pollen d'abeilles à 100 µg/ml. Pour l'échantillon P7, plusieurs concentrations sont étudiées (50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 µg/ml). Les diverses cultures sont réalisées dans des microplaques de 24 puits et elles sont observées à 0, 24 et 48h de l'expérience pour suivre la formation de plaques qui est l'indice d'infection. Les différents puits sont photographiés et examinés à l'aide d'un microscope inversé.

Dans ce test, le contrôle négatif ne contient que le milieu de culture alors que le contrôle positif renferme de l'acyclovir à 100 µg/ml. A la fin, un test MTT est réalisé pour les échantillons montrant les meilleurs résultats afin de confirmer la vitalité des cellules.

XII. Activité protectrice d'ADN

XII.1. Effets des extraits sur l'ADN

Ce test permet d'évaluer l'effet des échantillons du pollen d'abeille sur l'ADN en observant les modifications de migration de l'ADN plasmidique **(Barut et Demirbaş, 2020)**.

Les deux échantillons présentant les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, à savoir P6 et P10, sont testés pour mettre en évidence leur effet sur l'ADN du plasmide pR322.

Pour cela, la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose décrite par Barut et Demirbaş (2020) est suivie. L'ADN plasmidique pBR322 surenroulé est incubé avec des concentrations croissantes d'échantillons de pollen d'abeille (500, 1000 et 2000 µg/ml) dans le tampon contenant du Tris-HCl (50 mM, pH 7,0). Tous les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 1 h. Ensuite, un tampon de chargement (bleu de bromophénol, xylène cyanol, glycérol, EDTA

et SDS) est ajouté et les mélanges sont chargés sur du gel d'agarose (0,8%) avec une coloration EB dans un tampon TAE (acide tris-acétique-EDTA). L'électrophorèse est réalisée à 100 V pendant 90 min et les résultats sont visualisés par le système BioRad Gel Doc XR et analysés à l'aide du programme logiciel Image Lab Version 5.0.1.

XII.2. Protection de l'ADN contre la réaction de Fenton

Cette méthode consiste à déclencher la réaction de Fenton en présence de l'ADN et Les extraits de pollen d'abeille dans le milieu réactionnel pour mettre en évidence la capacité des antioxydants présents dans les extraits à protéger l'ADN des radicaux libres générés par la réaction de Fenton (**Barut et al. 2019**).

Les propriétés protectrices de l'ADN plasmidique pBR322 surenroulé des extraits P6 et P10 vis-à-vis des réactifs de Fenton sont étudiées en utilisant une électrophorèse sur gel d'agarose selon la méthode décrite par Barut et al. (2019). Dans ce travail, le mélange contenant 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), ADN plasmidique, FeSO₄ (1 mM), H₂O₂ (2 %) et extraits à 500, 1000 et 2000 µg/ml sont traités à 37 °C pendant 1 h. L'électrophorèse est réalisée selon la méthode détaillée préalablement. Les résultats sont visualisés par le système BioRad Gel Doc XR et analysés à l'aide du programme logiciel Image Lab Version 5.0.1.

XIII. Analyses statistiques

Dans ce travail, les résultats sont exprimés par la moyenne de trois essais $\pm$ l'écartype. L'analyse statistique est réalisée par le logiciel STATISTICA 7.1 en appliquant une analyse de variance (A.N.O.V.A) pour tous les paramètres. A partir de statistiques élémentaires, des matrices de corrélation sont réalisées afin d'étudier la corrélation entre les différents paramètres. Les résultats sont classés par ordre décroissant a> b> c> d> e> f> g>h>i>j. Les valeurs avec la même lettre n'ont pas de différence significative. Les valeurs IC₅₀ sont calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

Les photos d'analyse pollinique et de cultures cellulaires sont prises à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) avec le logiciel Zen 3.0 lié à AxioCam ERc5s et AxioCam ICc1, respectivement. Le logiciel Image Lab Version 5.0.1 est utilisé pour visualiser l'aspect de l'ADN dans l'activité de protection de l'ADN.

Chapitre II : Résultats et discussion

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Analyses polliniques

L'origine botanique du pollen d'abeille est généralement déterminée par la méthode palynologique appelée aussi analyse pollinique, où les grains de pollen constitutifs sont identifiés par leur forme au microscope (**Komosinska-Vassev *et al.*, 2015**).

Les informations sur l'origine botanique des échantillons de pollen sont cruciales, elles peuvent servir d'indicateur des valeurs nutritionnelles, phytochimiques, de l'activité biologique et influencer sa qualité commerciale (**Campos *et al.*, 2010**). Les pollens d'abeilles varient en apparence (taille, forme et couleur) en fonction de la région géographique et des espèces végétales sources (**Aylanc *et al.*, 2021**).

Les travaux de Louveaux (1978) sont pionniers dans ce sens, il considérait la classification des pollens d'abeilles comme une étape nécessaire pour l'estimation de leur valeur nutritionnelle, authenticité et sécurité.

En termes d'origine végétale, il existe deux types de pollens d'abeilles: le "pollen monofloral" dont au moins 45 % des grains proviennent d'une seule espèce végétale et le "pollen polyfloral" composé de grains provenant de diverses sources végétales sans qu'aucune ne soit dominante. Actuellement, la détermination de l'origine botanique du pollen d'abeille revêt une grande importance en raison de la différence de valeur économique entre les produits de pollen d'abeille monofloraux et polyfloraux (**Alimogluet *et al.*, 2021**).

Les différentes familles botaniques, au nombre de 16, qui sont présentes dans les échantillons de pollen d'abeille analysés sont présentés dans la figure 18 et le tableau V.

Lors de l'examen microscopique, les pollens présents dans chaque échantillon sont regroupés en 4 sections en fonction de leur abondance: pollen dominant (≥ 45 %), pollens secondaires (16 à 45 %), pollens minoritaires (> 3 à 15 %) et pollens très minoritaires (< 3). Dans le cas d'existence d'un pollen dominant avec un pourcentage ≥ 45 %, cela indique que l'échantillon est monofloral (**Alimogluet *et al.*, 2021**).

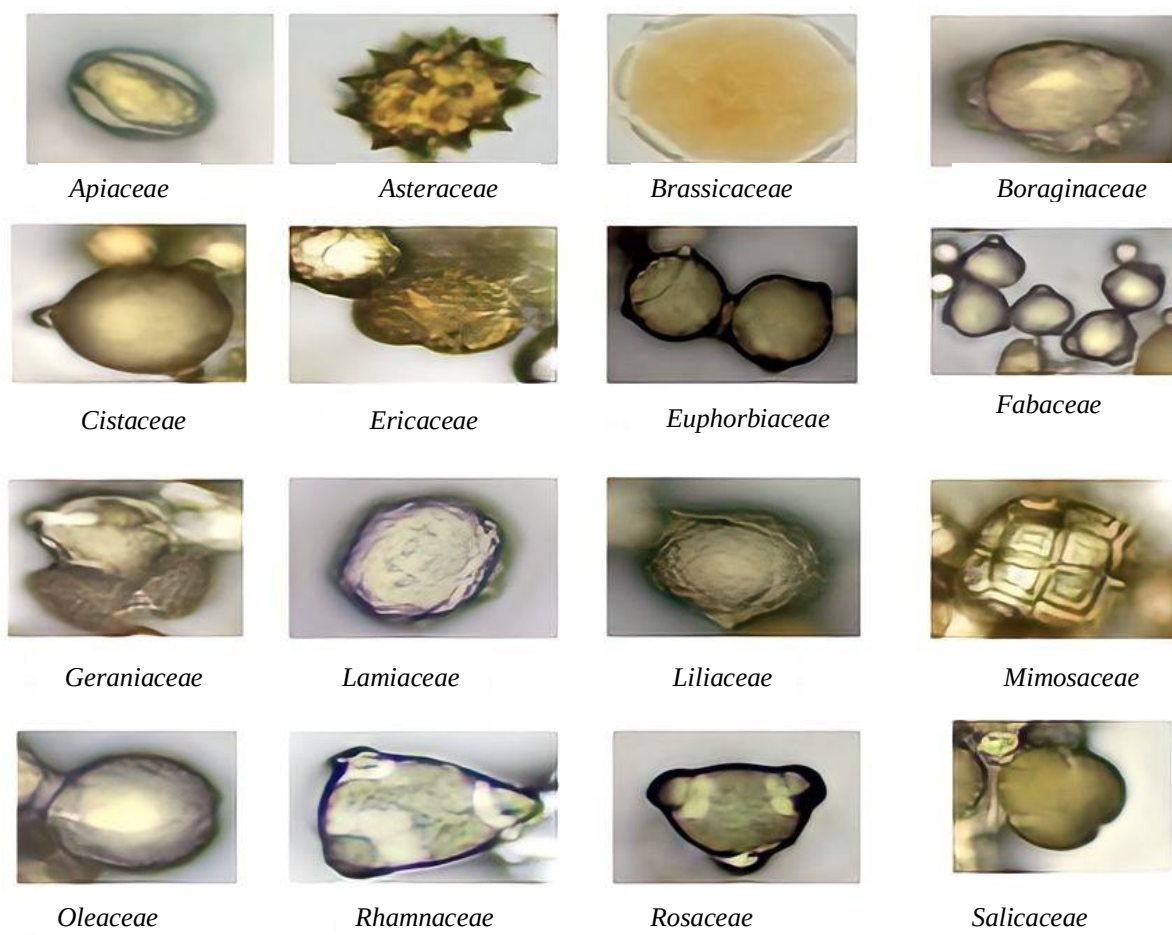


Figure 18: Les familles botaniques identifiées dans les échantillons de pollens étudiés.

Les familles identifiées dans les échantillons de pollen d'abeille sont de gauche à droite : *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Boraginaceae* (*Echium*), *Cistaceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Mimosaceae*, *Oleaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae* et *Salicaceae*.

Sur cette base de distribution des familles botaniques, les 14 échantillons de pollen d'abeille étudiés dans ce travail peuvent être classés en deux catégories (tableau V) :

- Des échantillons monofloraux: P1, P3, P4, P6, P8, P9, P10 et P12 ; avec les familles botaniques dominantes (plus de 45%) respectives : *Cistaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *Boraginaceae* et *Asteraceae*.
- Des échantillons polyfloraux : P2, P5, P7, P11, P13 et P14.

En se basant sur les différentes couleurs des grains de pollen, les échantillons analysés incluent différentes espèces botaniques car les abeilles butinent différentes plantes. Selon Féas et al. (2012), le pollen d'abeille est souvent un mélange de sources différentes.

La famille *Brassicaceae* présente comme une famille dominante dans 3 échantillons monofloraux (P3, P6 et P10), suivie par la famille des *Apiaceae* avec 2 échantillons (P4 et P9). Cependant, les familles *Cistaceae*, *Fabaceae* et *Asteraceae* se trouvent dominantes dans un seul échantillon (P1, P8 et P12, respectivement).

- ***Brassicaceae***: L'analyse pollinique révèle une forte présence des *Brassicaceae* dans les échantillons comme famille dominante dans 3 pollens (P3, P6 et P10) et secondaire dans 5 d'autres (P1, P4, P5, P7 et P9). Selon Bakchiche et al. (2020), cette dominance peut s'expliquer par la large disponibilité de cette famille dans tout le nord Algérien surtout qu'elle représente des légumes qui sont souvent cultivées dans cette région (chou, chou-fleur, navets). De plus, cette dominance peut également être attribuée à la capacité des *Brassicaceae* à attirer les abeilles. En effet, les abeilles butineuses préfèrent collecter principalement du nectar à partir d'espèces végétales appartenant à la famille des *Rhamnaceae*, alors qu'elles choisissent de collecter principalement du pollen à partir des plantes appartenant à la famille des *Brassicaceae*.
- ***Apiaceae***: Cette famille figure comme famille dominante dans les deux échantillons P4 et P9 et en tant que secondaire dans les pollens P11 et P13. Les plantes de cette famille comme le fenouil, la carotte, et le céleri sont particulièrement attractives pour les abeilles car elles produisent des fleurs riches en nectar et en pollen en plus de leur structure florale qui facilite l'accès au nectar. Elles se caractérisent également par une période de floraison prolongée ce qui signifie qu'elles fournissent une source alimentaire stable pour les abeilles sur une plus longue durée (**Buchmann et Nabhan, 1996**).
- ***Cistaceae*** : Cette famille est dominante dans l'échantillon P1(Adekar) et secondaire dans les échantillons P6, P7, P9, P12 et P14 avec des pourcentages allant de 23 à 34 %. Elle comprend principalement des plantes herbacées et des arbustes, souvent originaires des régions méditerranéennes (**Ropars et al., 2020**), ce qui pourrait expliquer sa forte présence dans les échantillons notamment celui d'Adekar, une région connue pour sa végétation riche et dans les régions telles que boukhlifa et Boumerdes qui sont relativement plus proche de la méditerranée que les autres régions de récolte. Leur présence pourrait aussi être expliquée par leur attractivité telle que l'explique l'étude de Manetas et Petropoulou (2000) qui a montré que les *Cistaceae* sont particulièrement attractives pour les abeilles en raison de leur haute teneur en sucre, leur possession de fleurs grandes et colorées et leur richesse en nectar ce qui les rend particulièrement attractives pour les abeilles qui recherchent des sources alimentaires.

- **Fabaceae** : Les *Fabaceae* se caractérisent par leur richesse en nectar et en pollen et des fleurs colorées et parfumées qui attirent les pollinisateurs, notamment les abeilles. Les *Fabaceae*, avec leur vaste gamme d'espèces, sont présentes dans une multitude d'écosystèmes, ce qui accroît la probabilité de leur interaction avec les abeilles (**Aslan et al., 2016**). Cette famille est dominante dans le pollen P8 (Feraoune) et secondaire dans les pollens P1(Adekar), P2 (Akbou) et P3 (Beni Ourtilane). Cela pourrait s'expliquer par une activité agricole liée aux légumineuses fourragères ou alimentaires ou à un écosystème naturel particulièrement riche en espèces appartenant à cette famille à Feraoune. Cependant, pour Adekar, d'Akbou, et de Beni Ourtilane, la végétation est plus diversifiée avec une agriculture différente ou des conditions écologiques moins optimales pour leur dominance.
- **Asteraceae** : Cette famille est dominante dans le pollen P12 (Tazmalt), secondaire dans les pollens P2, P5, P8, P10, P11 et P14 minoritaire dans P1, P3, P4, P7 et très minoritaire dans P9. Elle existe dans 10 pollens parmi les 14 étudiés. Cette large fréquence peut s'expliquer par plusieurs facteurs. En effet, cette famille est la plus importante en nombre d'espèces en Algérie (**Gordo et Mostafa, 2021**). Elle se distingue par des fleurs regroupées en capitules, ce qui augmente la quantité de pollen et de nectar disponible pour les abeilles, en plus ces fleurs sont de couleurs vives avec des guides à nectar visibles aux UV qui attirent les abeilles. Les *Asteraceae* sont connues par leur distribution géographique étendue et leur adaptabilité ce qui explique leur existence quasi universelle dans une grande variété de sols et de climats de différentes régions ce qui favorise leur abondance dans divers écosystèmes. Elles fleurissent souvent pendant de longues périodes, fournissant une source continue de pollen et de nectar pour les abeilles (**Negrão et Orsi, 2018 ; Willmer, 2011**).

Le comptage des pollens a révélé que certaines espèces végétales sont plus fréquemment représentées dans les échantillons étudiés. Les taux de fréquences variables entre les espèces végétales reflètent la végétation mixte des régions de récolte. Les familles *Asteraceae* (17,39 %), *Brassicaceae* (11,59 %) et *Salicaceae* (11,59 %) sont les plus fréquemment enregistrées comme présentes dans les différents échantillons. Selon Laha et al. (2017), cela peut être dû à la disponibilité et à la facilité d'accessibilité des fleurs appartenant à ces familles botaniques par les abeilles butineuses ainsi que la longueur des périodes de floraison pour les espèces végétales disponibles dans les zones de récolte des échantillons.

Les résultats révélés par cette étude sont similaires à ceux obtenus par Bakchiche et al. (2020) sur les pollens d'abeilles Algériens. La similitude réside dans les familles détectées dans les différents échantillons mais surtout concernant la dominance de la famille des *Brassicaceae*. A l'échelle internationale, une étude polonaise faite par Borycka et al. (2016) et une autre brésilienne faite par Carpes et al. (2013) ont révélé toutes les deux aussi la dominance des *Brassicaceae*, notamment celle de Carpes et al. (2013) qui précise en outre que la famille *Asteraceae* était la famille la plus fréquemment présente dans un résultat complètement similaire à celui de la présente étude.

Cependant, les résultats de l'étude faite par El Ghouizi et al. (2021) sur des pollens Marocains sont différents où elle montre la dominance des *Fabaceae* dans la plupart des échantillons étudiés.

D'autres familles sont présentes avec des pourcentages plus faibles. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces types de pollens possèdent moins de pouvoir d'attraction aux abeilles. Ils serviraient donc comme de ressources secondaires. Ces types de pollen pourraient éventuellement servir de complément aux besoins alimentaires de la colonie et deviennent importants pour maintenir leur équilibre, pendant de courtes périodes, lorsque l'approvisionnement en ressources est soumis à des variations saisonnières (**Modro et al., 2011**). En revanche, d'autres familles sont jugées minoritaires et même très minoritaires telles que les *Lamiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Geraniaceae*, *Oleaceae* et *Liliaceae* ; ce qui peut être dû à la rareté de ces familles dans les régions en question ou peut être qu'elles sont moins attractives aux abeilles butineuses qui ont d'autres préférences.

Tableau V: Résultats de l'analyse pollinique des 14 échantillons de pollen d'abeille.

Echantillons	Origine botanique	Pollens dominants (≥45%)		Pollens secondaires (16-44%)		Pollens minoritaires (3-15%)		Pollens très minoritaires (< 3%)	
		Type de pollen	%	Type de pollen	%	Type de pollen	%	Type de pollen	%
P1	Monoflorale	<i>Cistaceae</i>	50	<i>Brassicaceae</i> <i>Fabaceae</i>	21 18	<i>Oleaceae</i> <i>Salicaceae</i> <i>Asteraceae</i>	3 3 4	<i>Lamiaceae</i>	1
P2	Polyflorale			<i>Fabaceae</i> <i>Salicaceae</i> <i>Asteraceae</i>	28 22 19	<i>Rhamnaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Oleaceae</i>	14 9 5	<i>Euphorbiaceae</i> <i>Geraniaceae</i>	1 2
P3	Monoflorale	<i>Brassicaceae</i>	46	<i>Fabaceae</i> <i>Salicaceae</i>	19 16	<i>Euphorbiaceae</i> <i>Asteraceae</i>	7 12		
P4	Monoflorale	<i>Apiaceae</i>	45	<i>Salicaceae</i> <i>Brassicaceae</i>	27 18	<i>Asteraceae</i>	10		
P5	Polyflorale			<i>Brassicaceae</i> <i>Asteraceae</i>	44 42	<i>Boraginaceae</i>	14		
P6	Monoflorale	<i>Brassicaceae</i>	49	<i>Cistaceae</i> <i>Mimosaceae</i>	32 19				
P7	Polyflorale			<i>Brassicaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Cistaceae</i>	31 29 26	<i>Asteraceae</i>	12	<i>Ericaceae</i>	2

Echantillons	Origine botanique	Pollens dominants (≥45%)		Pollens secondaires (16-44%)		Pollens minoritaires (3-15%)		Pollens très minoritaires (< 3%)	
		Type de pollen	%	Type de pollen	%	Type de pollen	%	Type de pollen	%
P8	Monoflorale	<i>Fabaceae</i>	48	<i>Asteraceae</i> <i>Salicaceae</i>	18 17	<i>Ericaceae</i> <i>Boraginaceae</i>	9 5	<i>Rosaceae</i> <i>Liliaceae</i>	2 1
P9	Monoflorale	<i>Apiaceae</i>	46	<i>Cistaceae</i> <i>Brassicaceae</i>	23 21	<i>Salicaceae</i>	8	<i>Asteraceae</i>	2
P10	Monoflorale	<i>Brassicaceae</i>	51	<i>Boraginaceae</i> (<i>Echium</i>) <i>Asteraceae</i>	20 18	<i>Geraniaceae</i>	11		
P11	Polyflorale			<i>Apiaceae</i> <i>Salicaceae</i> <i>Asteraceae</i> <i>Rosaceae</i>	24 23 21 19	<i>Boraginaceae</i> (<i>Echium</i>)	12	<i>Liliaceae</i>	1
P12	Monoflorale	<i>Asteraceae</i>	52	<i>Cistaceae</i>	34	<i>Salicaceae</i> <i>Mymosaceae</i>	8 6		
P13	Polyflorale			<i>Ericaceae</i> <i>Apiaceae</i>	35 27	<i>Euphorbiaceae</i> <i>Rosaceae</i> <i>Rhamnaceae</i>	15 14 9		
P14	Polyflorale			<i>Asteraceae</i> <i>Cistaceae</i> <i>Rosaceae</i>	43 32 25				

II. Analyses physico-chimiques

II.1. Couleur

Les résultats révèlent une variation dans la couleur des échantillons de pollen d'abeille examinés de 0,09 (P7) à 0,15 (P6) (Figure 19). Ces résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Pérez-Pérez et al. (2012) qui ont travaillé sur le pollen de Venezuela et qui ont des résultats allant de 0,11 à 0,90.

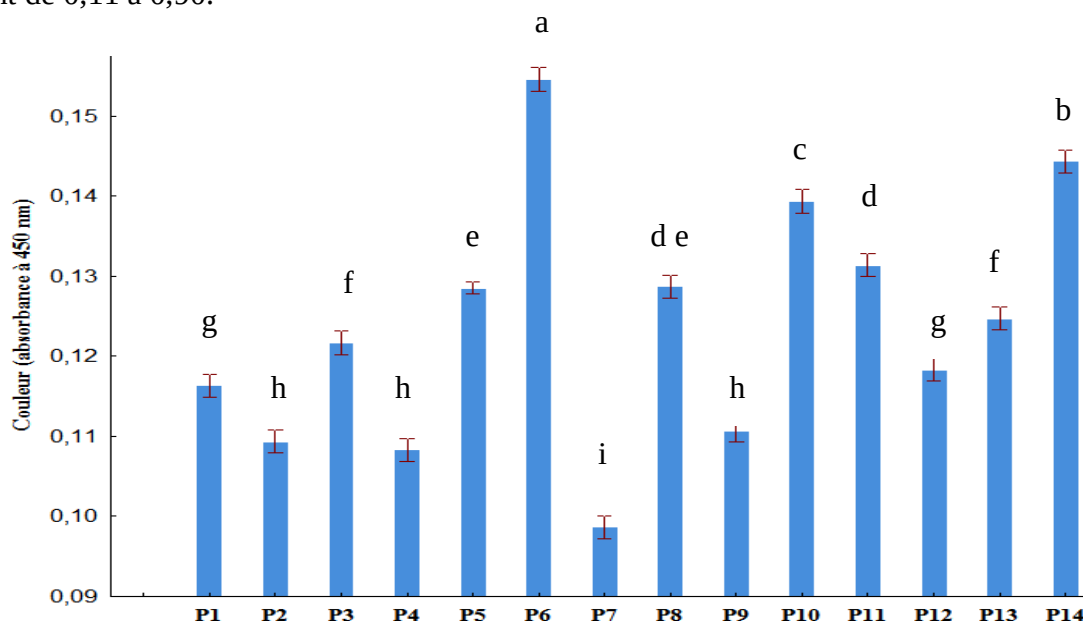


Figure 19: Couleur des pollens d'abeilles à 450 nm.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

Le pollen d'abeille se caractérise par une grande diversité de couleurs qui peuvent aller du noir jusqu'au blanc passant par toutes les couleurs existant entre ces deux extrémités (**Komosinska-Vassev et al., 2015**). Dans la présente étude, les pollens étudiés possèdent différentes couleurs et cela est reflété par les différences d'absorbance enregistrées. Cette différence de couleur peut être attribuée à plusieurs facteurs tels que l'espèce botanique d'origine et le patrimoine génétique des échantillons de pollen étudiés, le degré de maturité et les composés pigmentaires tels que les caroténoïdes, les flavonoïdes et les anthocyanines qui se trouvent naturellement à des concentrations différentes dans les échantillons de pollen et qui sont responsables de la couleur (**Thakur et Nanda, 2018**).

Le pollen d'abeille peut être monochromatique (grains de même couleur) ou polychromatique (grains de différentes couleurs). Dans ce travail, tous les échantillons sont polychromatique et pourtant, il en existe des monofloraux et des polyfloraux et cela confirme

les résultats de Bleha et al. (2021) qui expliquent que la couleur peut être affectée par des éléments tels que le type de plante, les pigments et le stade de maturité mais elle ne peut pas servir à identifier de façon précise l'origine botanique, puisque le pollen monochromatique ou polychromatique peut être monofloral (provenant d'une seule espèce) ou polyfloral (provenant de plusieurs espèces).

Malgré cette complexité, l'évaluation de la couleur reste une technique fréquemment employée. Ce paramètre est déterminé par la composition des pigments des grains de pollen qui sont essentiellement les caroténoïdes et les flavonoïdes. La mesure de la couleur donne une idée approximative sur la qualité du pollen d'abeille et elle représente un paramètre important dans la commercialisation du produit (**Thakur et Nanda, 2018 ; Bleha et al., 2021**).

II.2. Teneurs en protéines

Il est connu que le pollen représente la source principale des protéines pour les abeilles. Pour cela, il est considéré comme un aliment indispensable pour le développement de la ruche (**Campos et al., 2008**).

Le dosage des protéines des différents échantillons révèle que P3 est le plus riche avec une teneur de 32,22 mg EBSA/1g. La plupart des échantillons dépassent le seuil de 20 mg EBSA/1g à l'exception des deux échantillons P7 et P8 qui enregistrent 16,39 et 14,68 mg EBSA/1g, respectivement (Figure 20).

Ces résultats sont similaires à ceux des pollens du Maroc (19,86 à 30,32 mg EBSA/1g) rapportés par El Ghouizi et al. (2021). Cependant, ils sont inférieurs à ceux donnés par une étude américaine faite par Lau et al. (2022) (89 à 313 mg EBSA/1g).

Les grains de pollen sont la source la plus importante de protéines pour les abeilles en raison de leur forte teneur en protéines (**Bogdanov, 2011 ; Kieliszek et al., 2018**).

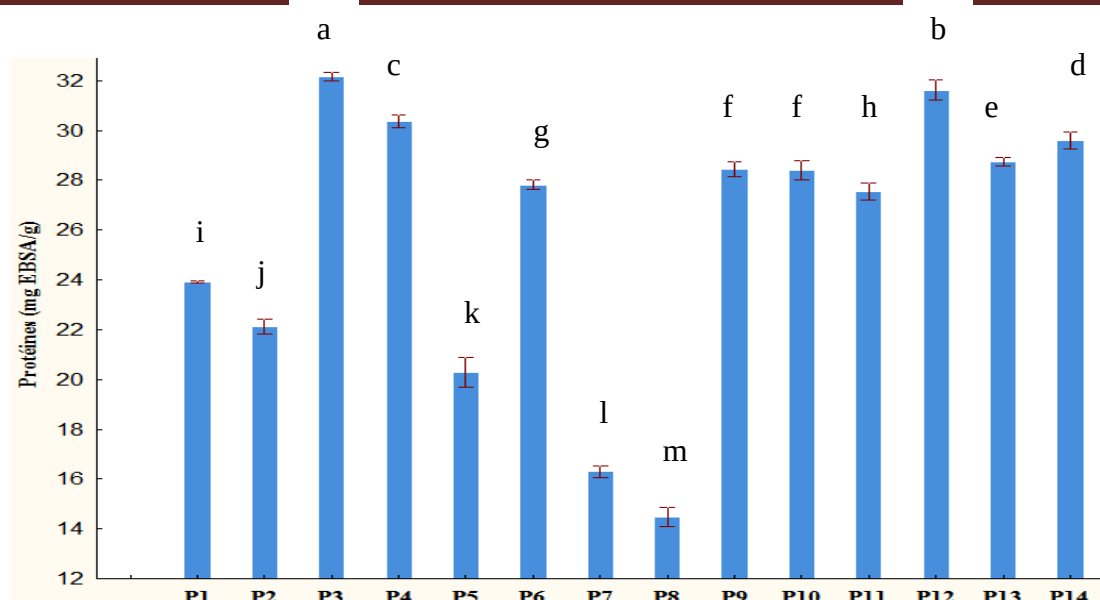


Figure 20: Teneurs en protéines des pollens d'abeilles.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

La variabilité des teneurs en protéines trouvées dans les échantillons peut s'expliquer par la variation naturelle de leur composition due à la différence des plantes sources distinctes dont ils sont issus (**Almeida-Muradiana et al., 2005**). En effet, dans le cas présent, les échantillons de Beni Ourtilane (P3), Blida (P4), Sidi Aich (P11) et Tazmalt (P12) sont plus riches en protéines que les échantillons de Bordj (P5) ou Feraoune (P8), ce qui peut s'expliquer par le fait que ces régions (Beni Ourtilane, Blida, Sidi Aich et Tazmalt) sont plus riches et plus diversifiées en termes de végétation.

L'étude menée par Negrão et Orsi (2018) a montré que même la saison peut affecter la composition du pollen d'abeille, en particulier en ce qui concerne les protéines. De plus, des différences au sein de la même espèce végétale poussant dans des conditions environnementales différentes ont également été signalées (**Almeida-Muradiana et al., 2005**). La teneur en protéines varie considérablement, non seulement dans le pollen provenant de différentes sources végétales mais également entre des échantillons ayant la même origine botanique (monofloraux) issus de régions différentes. La raison possible de cela est le mélange du nectar dans le pollen d'abeille. Il convient de souligner que le pollen le plus riche en protéines a été identifié comme provenant d'une plante très nectarifère (**Thakur et Nanda, 2020 ; Nicolson et Human, 2012; Human et Nicolson, 2006**).

II.3. Teneurs en minéraux

Le pollen d'abeille est une source riche en minéraux tels que le calcium, le potassium, le magnésium et le zinc (**Prashanth et al., 2015**). Afin d'étudier les profils minéraux des pollens analysés, la spectrométrie d'émission optique à plasma couplé par induction (ICP-OES) est utilisée dans ce travail et l'ensemble des résultats figure dans le tableau VI.

Tableau VI: Teneurs minérales des 14 échantillons de pollen d'abeille (mg/Kg).

Echantillons	Ca	K	Mg	Na	Al	Fe	Mn	Zn	Somme
P1	375,36	800,57	195,79	10170,46	17,56	18,20	2,55	7,35	11587,84
P2	400,72	827,83	165,65	106,10	44,07	22,55	3,50	7,94	1578,36
P3	467,65	841,97	233,57	101,91	28,69	23,63	2,31	8,94	1708,67
P4	501,29	812,65	173,71	107,47	53,58	38,48	3,61	8,57	1699,36
P5	438,67	859,91	196,31	108,02	29,48	27,12	2,71	8,64	1670,86
P6	433,84	969,80	216,32	113,38	21,13	21,92	2,88	6,97	1786,24
P7	433,32	908,21	185,44	122,06	56,70	15,87	3,05	7,71	1732,36
P8	258,75	817,65	124,03	107,12	7,80	9,87	1,74	6,73	1333,69
P9	481,62	804,54	158,10	109,50	43,28	40,19	2,93	8,66	1648,82
P10	433,32	889,41	213,56	121,10	21,22	23,46	3,14	7,56	1712,77
P11	491,45	986,18	206,83	117,71	28,31	29,79	5,42	8,78	1874,47
P12	515,43	882,68	199,24	113,42	30,43	28,19	2,67	9,14	1781,2
P13	455,57	865,26	168,43	116,82	39,74	35,85	3,09	8,28	1693,04
P14	412,79	884,58	170,12	114,85	29,19	27,41	4,54	6,99	1650,47
Moyenne	435,69	867,94	186,22	830,70	32,22	25,89	3,15	8,01	
Ecartype	64,45	57,80	28,41	2688,17	13,80	8,50	0,92	0,80	

Le meilleur résultat pour chaque minéral est marqué en gras.

Les quantités trouvées pour tous les échantillons et tous les minéraux se situent dans la même fourchette que celles de Bakour et al. (2022) qui ont étudié le pollen d'abeille Marocain et beaucoup plus élevées que les résultats du pollen Colombien étudié par Fuenmayor et al. (2014), mais moins élevées que les résultats obtenus par Altunatmaz et al. (2017) pour le pollen d'abeille de Turquie.

En comparant la somme totale des quantités des minéraux, le pollen P1 enregistre la valeur la plus élevée avec 11587,84 mg/Kg, cela est dû à la valeur aberrante obtenue pour le Na pour cet échantillon. Cependant, si on prend en considération tous les autres minéraux, le pollen P11 est l'échantillon le plus riche ayant un total de 1874,47 mg/Kg avec les quantités les plus élevées en K (986,18 mg/Kg) et en Mn (5,42 mg/Kg). Cela peut s'expliquer par son origine botanique et la nature des familles qu'il contient, notamment la famille des *Asteraceae* qui est connue comme la famille botanique la plus riche en K (**Ciocarlan et al., 2024**).

Selon des études antérieures, précisément Campos et al. (2008) et Szczesna et Rybak-Chmielewska (1998), le minéral le plus abondant dans le pollen d'abeille est le K avec un pourcentage d'environ 60 % de la teneur totale en minéraux, ce qui est confirmé par les

résultats de cette étude. En effet, les teneurs en potassium (K) sont les plus élevées de tous les minéraux et pour tous les échantillons, à l'exception de P1, allant de 800,57(P1) à 986, 96 mg/Kg (P11) avec une moyenne de 867,94 mg/Kg. Cependant, dans la littérature, il a été rapporté que le Mg représente environ 20 % de la teneur totale en minéraux, le Na et le Ca représentent 10 % (**Campos et al., 2008 ; Szczesna et Rybak-Chmielewska,1998**). Cette répartition des proportions est différente de celle de cette étude où le Ca vient en deuxième position suivi du Mg et du Na.

Les échantillons les plus riches en Ca sont P12, P4 et P11 avec des teneurs respectives de 515,43 ; 501,29 et 491,45 mg/Kg. Dans la littérature on trouve que la teneur en calcium peut être déterminée par l'origine botanique et les facteurs géographiques tels que le climat et le sol (**Rojo et al., 2023**). Dans la présente étude, on suppose que les facteurs géographiques ont plus d'impact sur les teneurs en Ca car dans l'analyse pollinique ne figure pas les familles connues pour être les plus riches en Ca telles que les *Fabaceae*.

Certaines plantes sont réputées pour leur capacité à accumuler du sodium comme forme d'adaptation aux sols salins, elles sont appelées halophytes. Certaines familles telles que les *Cistaceae* et les *Brassicaceae* ont la capacité d'accumuler le Na. On trouve fréquemment les *Cistaceae* dans les zones méditerranéennes, elles ont la capacité de se développer dans des sols naturellement riches en sodium, comme les régions côtières ou dans des sols salins. La plante absorbe ces minéraux présents dans le sol et les concentre dans ses tissus, y compris dans le pollen. Des recherches scientifiques attestent que la composition minérale du pollen reflète l'environnement local. Ainsi, une concentration élevée de sodium indique que la plante mère a été exposée et a assimilé une quantité importante de cet élément (**Flowers et Colmer, 2008**). Cela pourrait expliquer la teneur du sodium remarquablement élevée dans l'échantillon P1. Le P1 est un échantillon monofloral avec une dominance des *Cistaceae*, ainsi la teneur très élevée de Na peut être due à la grande quantité de Na accumulée par cette famille dans cet échantillon. Les pollens P7 (*Brassicaceae* 31 % , *Cistaceae* 26 %) et P10 (*Brassicaceae* 51 %) viennent en deuxième et troisième position, respectivement. D'après l'analyse pollinique, l'impact des deux familles *Cistaceae* et *Brassicaceae* sur les teneurs en sodium est confirmé.

De cette étude, des différences et des similitudes peuvent être observées entre les échantillons en termes de teneurs en minéraux. De nombreux facteurs peuvent influencer les variations, tels que les sources florales, le pays, le sol, le climat, l'origine géographique et les espèces botaniques en termes de capacité des plantes à accumuler les sels minéraux dans leur pollen, ainsi que l'ajout de nectar au pollen pendant le processus de production, ce qui peut également avoir un impact (**Carpes, 2008 ; Kostić et al., 2015**). Abdou (2015) a rapporté que l'origine florale est le facteur de variation le plus déterminant, suivi d'autres facteurs tels que le sol, l'eau d'irrigation, l'origine géographique et les eaux souterraines utilisées pour l'irrigation.

De leur côté, Altunatmaz et al. (2017) ont conclu que les teneurs de minéraux sont liées au type de plante plutôt qu'à tout autre facteur, sans négliger l'impact des activités agricoles sur la composition du sol (fertilisation et pulvérisation agricole), les variétés de fleurs de pollen d'abeille, le climat et les conditions environnementales, la situation géographique et la composition génétique des espèces végétales.

Une recherche effectuée par Taha et Al-Kahtani (2020), dans l'oasis d'Al-Ahsa en Arabie Saoudite, a examiné la composition minérale des pelotes de pollen collectées par les abeilles. Les sources florales principales étaient le colza, le tournesol, la courge d'été et le palmier à dattes. Les pelotes de printemps et d'hiver affichaient les teneurs les plus hautes en Na, K, Ca, Mg, P et Mn, alors que le Cu et le Fe prédominaient durant l'automne et le Zn pendant l'été. Ces résultats confirment donc que la composition minérale varie en fonction de la saison de récolte.

III. Teneurs en antioxydants

III.1. Composés phénoliques totaux

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'étude des composés bioactifs d'origine végétale, tels que les polyphénols provenant des aliments. Les polyphénols aussi connus par « les composés phénoliques » sont des métabolites secondaires synthétisés exclusivement par les plantes, on en trouve dans toutes les parties de ces dernières (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois). Grace à leurs propriétés antioxydantes, les polyphénols sont impliqués dans plusieurs activités biologiques et présentent beaucoup d'avantages potentiels pour la santé des humains (**Singla et al., 2019 ; Borycka et al., 2016**).

Les résultats de dosage des polyphénols totaux des échantillons de pollen montrent une variation de valeurs d'un échantillon à un autre partant de 18,62 (P2 et P7) jusqu'à 38,88 mg EAG /1g (P6) (Figure 21).

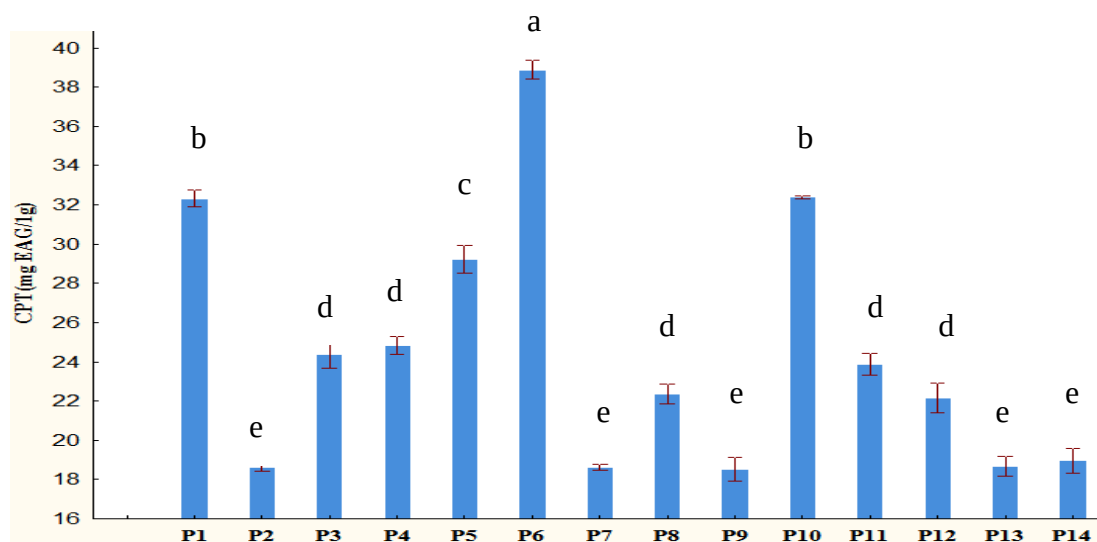


Figure 21: Teneurs en composés phénoliques totaux des pollens d'abeilles analysés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement. **CPT** : Composés phénoliques totaux.

Les concentrations des polyphénols totaux trouvés dans cette étude sont beaucoup plus élevées que celles d'une étude menée par Feàs et al. (2012) sur le pollen d'abeille de 9 espèces végétales dans le parc naturel international du Douro au Portugal (12,9 à 19,8 mg EAG / 1g). Ils sont également plus élevés que les résultats d'El Ghouizi et al. (2021) dont les valeurs vont de 8,07 à 32,38 mg EAG / 1g pour les pollens du Maroc. En outre, les résultats obtenus dans cette étude sont beaucoup plus élevés que ceux de l'étude de Bakchiche et al. (2020) faite sur un extrait hydroéthanolique du pollen algérien et donnant une valeur de 11,70 mg EAG / 1g.

Dans la présente étude, il a été constaté que les trois échantillons les plus riches en polyphénols sont monofloraux et proviennent de Bejaia, à savoir P1, P6 et P10 avec des teneurs respectives : Adekar : 32,32 ; Boukhelifa : 38,88 et Melbou : 32,38 mg EAG /1g. Il serait donc convenable de déduire que la région a un impact sur le contenu du pollen d'abeille.

La teneur en composés phénoliques du pollen d'abeille est étroitement liée aux familles botaniques dont proviennent les plantes butinées par les abeilles. Ces dernières

collectent le pollen de diverses plantes au cours de leurs activités de pollinisation et la composition du pollen d'abeille reflète donc la diversité des plantes butinées.

Plusieurs études ont examiné la relation entre les teneurs en composés phénoliques dans le pollen d'abeille et les familles botaniques. Ces études ont révélé que certaines familles botaniques sont plus riches en composés phénoliques que d'autres.

Les familles botaniques les plus riches en composés phénoliques dans le pollen d'abeille comprennent notamment les *Asteraceae*, les *Brassicaceae*, les *Fabaceae*, les *Rosaceae* et les *Lamiaceae*. Ces familles botaniques sont souvent associées à une grande diversité de plantes à fleurs, ce qui explique en partie leur richesse en composés phénoliques (Smith et Williams, 2020). Une étude menée par Vargas de la Fuente et al. (2017) a montré que le pollen collecté à partir des plantes de la famille des *Asteraceae* présente une teneur élevée en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes tels que la quercétine et la lutéoline. De même, une recherche réalisée par Santos et al. (2015) a mis en évidence la présence abondante de composés phénoliques dans le pollen provenant de plantes de la famille des *Fabaceae*, tels que l'acide caféique et les flavonoïdes comme la génistéine.

Effectivement, cela est en accord avec les résultats de ce travail où les familles révélées comme les plus riches en polyphénols figurent avec des pourcentages importants dans les trois échantillons P1, P6, P10 présentant les meilleures valeurs de composés phénoliques qui sont respectivement : 32.32 ; 38.88 et 32.38 mg EAG / 1g.

- Dans l'échantillon P1, les familles *Brassicaceae* et *Fabaceae* figurent comme des composantes de pollens secondaires avec des pourcentages respectifs de 21 et 18 %, il contient aussi les *Asteraceae* (4 %) et les *Lamiaceae* (1 %).
- L'échantillon P6 contient la famille des *Brassicaceae* comme une famille dominante avec 49 %.
- Quant à P10, il contient comme famille dominante les *Brassicaceae* avec 51 % et les *Asteraceae* apparaissent comme pollens secondaires avec 18 %.

La composition de ces échantillons en termes de familles botaniques peut alors expliquer leur richesse en polyphénols.

Le contenu qualitatif et quantitatif des polyphénols et d'autres composants varie dans le pollen d'abeille en fonction de nombreux facteurs tels que l'origine botanique, la saison de l'année, du lieu de collecte, les conditions climatiques, le type de sol, la disponibilité des plantes mellifères, les activités des apiculteurs et les conditions d'extraction (type de solvant pour l'extraction, durée de l'extraction et type d'extraction) (Hudz et al., 2017).

Selon Carpes et al. (2007), la quantité des composés phénoliques extraite du pollen dépend également du solvant utilisé et l'extraction la plus efficace se produit avec de l'éthanol à 60-80 %. Cela peut expliquer les teneurs élevées de composés phénoliques totaux obtenues dans cette étude où l'éthanol à 70 % a été utilisé.

Il convient donc de conclure que la relation entre les teneurs en composés phénoliques dans le pollen d'abeille et le type des familles botaniques qu'il contient est un sujet complexe mais fascinant. Les études scientifiques ont mis en évidence que certaines familles botaniques sont plus riches en composés phénoliques que d'autres, ce qui souligne l'importance de comprendre la diversité botanique pour évaluer la qualité nutritionnelle du pollen d'abeille (Smith et Williams, 2020).

III.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la principale classe de composés présents dans le pollen d'abeille. Ils présentent différentes caractéristiques structurales et montrent plusieurs activités biologiques (Almeida-Muradiana *et al*, 2005).

Les teneurs en flavonoïdes des échantillons de pollen étudiés oscillent de 3,09 (P4) à 5,467 mg ECA / 1g (P8) (Figure 22).

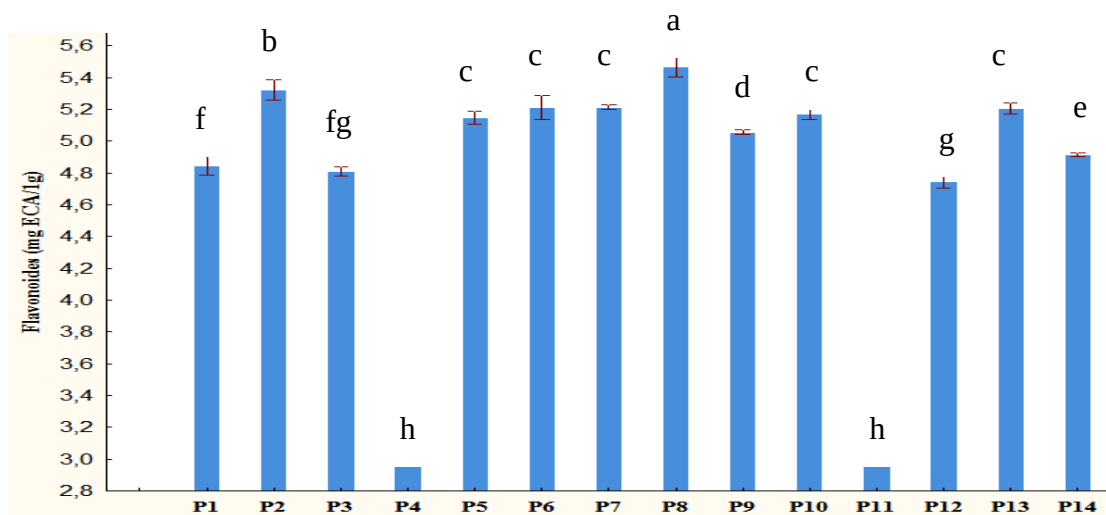


Figure 22: Teneurs en flavonoïdes dans les pollens d'abeilles analysés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type (n=3). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

Ces résultats sont dans la même gamme que ceux trouvés par Féas et al. (2012) pour des pollens du Portugal (4,5 à 7,1 mg ECA/1g) et par Hemmami et al. (2020) pour des pollens Algériens (2,07 à 5,50 mg ECA / 1g). Cependant, ils sont légèrement plus faibles des résultats de Pascoal et al. (2014) donnés pour les pollens brésiliens (3,71 à 10,14 mg ECA / 1g).

Les flavonoïdes sont la classe des polyphénols la plus fréquemment trouvée dans le pollen d'abeille, notamment la quercitrine, le kaempférol, l'apigénine et la lutéoline. Leurs teneurs dans le pollen d'abeille peuvent être influencées par plusieurs facteurs. La composition florale environnante joue un rôle majeur car les abeilles collectent le pollen à partir de différentes plantes, ce qui se reflète dans la diversité des flavonoïdes présents. Le climat, l'environnement et les pratiques apicoles peuvent également impacter la teneur en flavonoïdes. Des études ont montré que les conditions météorologiques, telles que l'exposition au soleil et les précipitations, peuvent influencer la production de flavonoïdes dans les plantes, et par conséquent dans le pollen d'abeille. En outre, la période de récolte du pollen d'abeille peut également affecter sa teneur en flavonoïdes. La saison, la durée de stockage et les méthodes de récolte sont des variables importantes à prendre en compte. Par exemple, une récolte précoce ou tardive du pollen peut impacter sa composition phytochimique, y compris la teneur en flavonoïdes. De même, des pratiques de récolte inappropriées peuvent entraîner une dégradation des composés bioactifs, réduisant ainsi la quantité de flavonoïdes présents dans le pollen d'abeille (**Campos et al., 2003 ; Pascoal et al., 2014 ; Komosinska-Vassev et al., 2015**).

III.3. Proanthocyanidines

Les proanthocyanidines, également appelées tanins condensés, sont des composés phénoliques présents dans le pollen d'abeille. Ces composés ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs propriétés antioxydantes et de leurs potentiels effets bénéfiques sur la santé (**Reed, 2001**).

Les taux de proanthocyanidines obtenus varient de 19,82 (P9) à 33,34 mg ECA /1g (P14) (Figure 23).

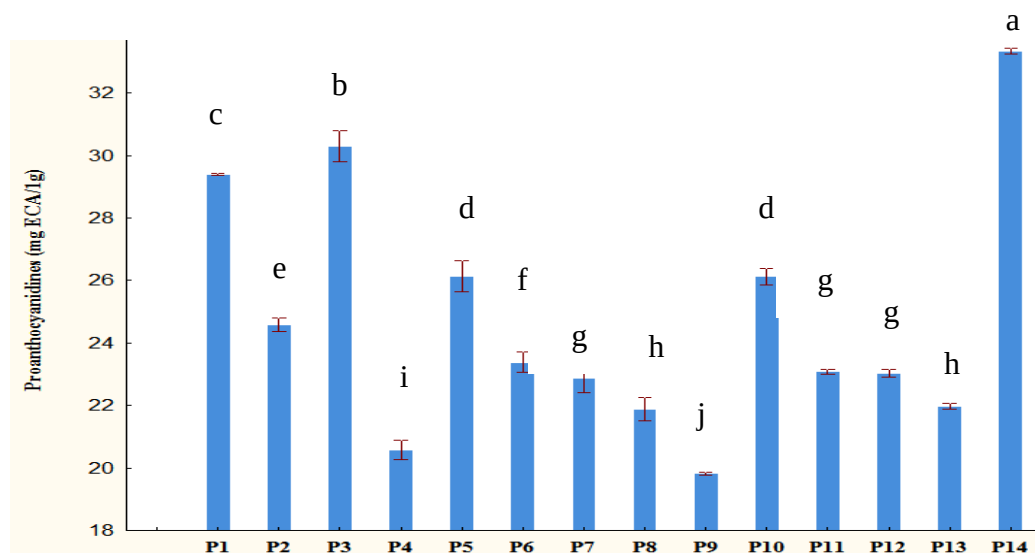


Figure 23: Teneurs en proanthocyanidines dans les pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par les deux études faites par Sahin et Kemal (2019) en Turquie (0,86 mg ECA /1g) et Qiu et al. (2017) en Chine (0,84 mg ECA /1g).

Dans la littérature, les études qui se sont intéressées aux proanthocyanidines dans le pollen d'abeille sont très limitées, pour cela les données disponibles sur cette classe de composés sont relativement faibles. Cependant, les études qui se sont intéressées à ce sujet confirment que leurs taux dans le pollen d'abeille peuvent être influencés par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la source végétale joue un rôle crucial car différentes plantes produisent des pollens avec des profils phytochimiques distincts. En outre, les conditions climatiques, telles que l'ensoleillement, la pluviométrie et la température, peuvent influencer la biosynthèse des proanthocyanidines dans les plantes productrices de pollen. De plus, la saison de récolte peut également avoir un impact sur la teneur en proanthocyanidines car les conditions environnementales varient tout au long de l'année (Ng et al., 2000; Campos et al., 2008).

III.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels qui confèrent au pollen d'abeille sa couleur jaune vif, allant du jaune pâle à l'orange foncé (Arvayo-Enriquez et al., 2013).

L'échantillon P6 (Boukhlifa) affiche la teneur en caroténoïdes la plus élevée (1,37 mg E β CA / 1g) avec une différence significative par rapport aux autres échantillons. Cependant, P7 (Boumerdès) présente la valeur la plus faible avec 0,52 mg E β CA / 1g (Figure 24).

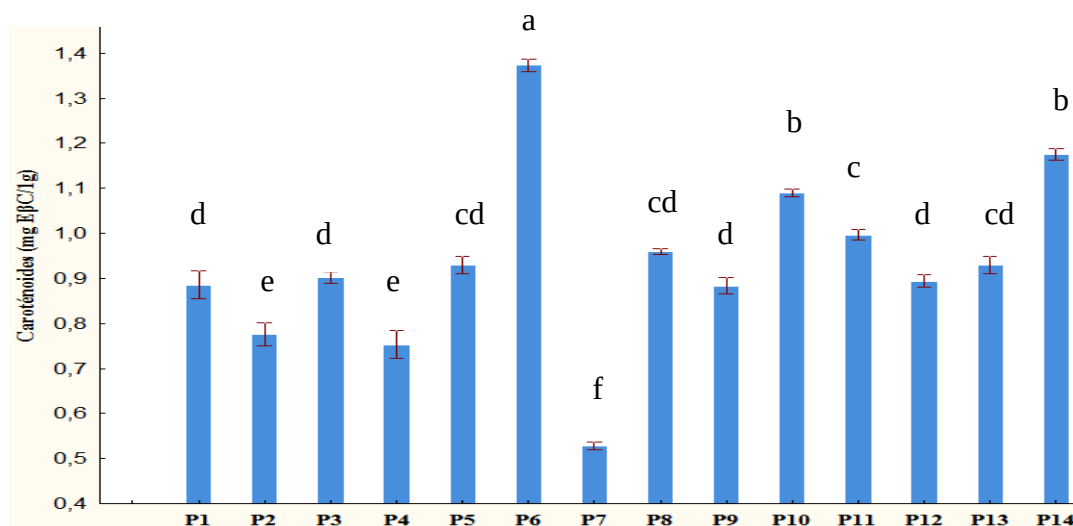


Figure 24: Teneurs en caroténoïdes des pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

D'après l'analyse statistique, il existe 6 groupes d'échantillons et ils présentent des différences significatives entre eux ($p < 0,05$). Ces groupes sont les suivants : (P6), (P10, P14), (P5, P8, P11 et P13), (P1, P3, P5, P8, P9, P12 et P13), (P2 et P4) et (P7).

Les échantillons P1, P3, P9 et P12 ne présentent pas une différence significative entre eux et forment ainsi un groupe homogène ($p < 0,05$).

Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus par Almeida-Muradian et al. (2005) pour des pollens de Brésil (0,013 à 0,48 mg E β CA / 1g). Ils sont également supérieurs aux teneurs enregistrées par Margaoan et al. (2014) dans les pollens de la Roumanie (0,06 et 0,52 mg E β CA / 1g).

La quantité et la diversité des caroténoïdes varient en fonction de l'origine florale du pollen, autrement dit, la qualité et la quantité des caroténoïdes contenus dans un échantillon donné dépend de la plante dont il dérive d'où l'importance de préserver la biodiversité des plantes mellifères pour garantir un apport adéquat en caroténoïdes pour les abeilles (**Kopsell et Kopsell, 2006**).

D'après les résultats de cette étude, les échantillons de pollens analysés auraient un bon potentiel thérapeutique. En effet, **Ross (2010)** a rapporté que les caroténoïdes sont très bénéfiques pour la santé humaine grâce à leurs différentes activités biologiques, ils sont des anti-tumoraux, des anti-leucémiques et bénéfique contre les maladies cardiovasculaires. Ils ont également une forte activité antioxydante et contribuent ainsi à la prévention de nombreuses maladies chroniques courantes.

IV. Analyse HPLC

Le pollen d'abeille est un produit réputé pour sa richesse en différents constituants notamment les composés phénoliques ce qui lui confère des propriétés biologiques. Dans la littérature, on trouve que les polyphénols contenus dans le pollen sont d'une grande diversité structurelle (**Herken et al., 2009; Gungor et Sengul, 2008**).

Dans ce travail, 19 composés phénoliques ont été détectés par HPLC et leurs teneurs ont été déterminées par une méthode spectrophotométrique. Les chromatogrammes des composés phénoliques standards sont présentés dans la figure 25.

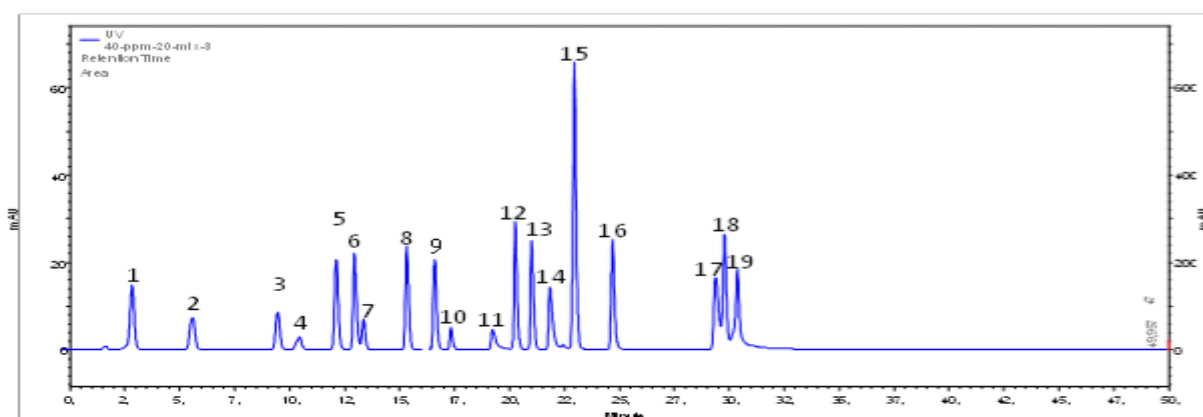


Figure 25: Chromatogrammes des composés phénoliques standards.

1. acide gallique, 2. acide protocatéchique, 3. acide p-hydroxybenzoïque, 4. catéchine, 5. acide caféique, 6. acide syringique, 7. épicatechine, 8. acide p-coumarique, 9. acide férulique, 10. rutine, 11. myricétine, 12. resvératrol, 13. daïdzéine, 14. lutéoline, 15. acide t-cinnamique, 16. hespérétine, 17. chrysine, 18. pinocembrine, 19. CAPE.

Les quantités des composés phénoliques sont données dans le tableau VII en $\mu\text{g/g}$ d'échantillon. La plupart d'entre eux absorbent dans l'ultraviolet (UV) à une longueur d'onde de 280 nm (**Aliyazicioglu et al., 2013**), ils ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux des étalons authentiques.

L'analyse HPLC a permis d'identifier 8 acides phénoliques (acides gallique, protocatéchique, caféique, syringique, p-OH benzoïque, p-coumarique, férulique et t-cinnamique), 8 flavonoides (myricétine, rutine, catéchine, hespérétine, pinocembrine, daïdzéine, lutéoline et chrysine), un stilbène (resvératrol) et un ester phénolique (CAPE).

L'échantillon P8 est le plus riche en composés phénoliques avec un total de 1169,18 $\mu\text{g/g}$. Cependant, le pollen P10 présente le total le plus faible avec 275,12 $\mu\text{g/g}$.

D'après les résultats obtenus, l'acide gallique et l'acide p-coumarique existent dans tous les échantillons.

L'acide gallique varie de 8,48 (P2) à 43,74 µg/g (P5) avec une moyenne de 20,88 µg/g. Ces quantités sont supérieures aux résultats trouvés par Ulusoy et Kolayli (2014) dont la moyenne est de 11,79 µg/g d'acide gallique et inférieure à celles trouvées par Rabiai et al. (2014) où ils ont enregistré 349,29 µg/g. Les teneurs d'acide p-coumarique oscillent de 1,93 (P1) à 29,91 µg/g (P3). Elles sont inférieures à celles enregistrées par Kizilpinar-Temizet et al. (2022) (1,9 à 88,4 µg/g) pour des pollens d'abeilles turcs.

L'acide gallique et ses dérivés sont abondants dans différents types de fruits et de plantes. Cet acide phénolique a été largement étudié dans d'autres études et il a été constaté que l'acide gallique présente une forte capacité antioxydante *in vitro* (Perron et Brumaghim, 2009).

L'acide proto-catéchique n'existe que dans l'échantillon P3 (8,14 µg/g). Cependant, chacun de l'acide t-cinnamique et CAPE est détecté dans tous les pollens analysés à l'exception de P4 et P10, respectivement.

L'acide caféique est un composé phénolique qu'on peut trouver dans de nombreuses ressources naturelles différentes, telles que les fruits, les légumes et les herbes, et qui possède de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante (Gupta *et al.*, 2010 ; Yim *et al.*, 2012). Il est présent dans tous les échantillons à l'exception de P8 et P14. Il varie de 2,74 (P7) à 53,14 µg/g (P2) avec une moyenne de 21,41 µg/g. C'est moins que les résultats trouvés par Ulusoy et Kolayli (2014) et Rebiai et al. (2014) où ils ont trouvé des moyennes de 35,42 µg/g et 31,658 µg/g, respectivement.

Parmi les flavonoïdes détectés, l'hésperétine est le seul à exister dans tous les échantillons contrairement à l'épicatéchine qui n'existe dans aucun d'entre eux. Sa teneur varie de 5,91 (P7) à 67,35 µg/g (P14). Chacun de rutine, catéchine et pinocembrine existe dans deux pollens uniquement qui sont respectivement (P2 et P14), (P1 et P3) et (P10 et P13). Pour myricétine, daïdzéine, lutéoline et chrysine, leurs existence et teneurs varient d'un échantillon à un autre tel que le montre le tableau VII.

Le resvératrol et la myricétine sont les deux composés dont les niveaux sont les plus élevés dans les échantillons variant de 42,32 (P12) à 394,69 µg/g (P6) et de 25,32 (P6) à 766,07 µg/g (P8), respectivement. Les teneurs de flavonoïdes et du resvératrol obtenus dans

ce travail sont dans le même intervalle que celles obtenues par Boulfous et al. (2025) sur des pollens de la région de Mila en Algérie.

L'analyse réalisée par Rocchetti et al. (2018) a montré que les familles botaniques les plus abondantes en composés phénoliques sont les *Fabaceae* et les *Rosaceae*. Ces résultats corroborent ceux présentés dans cette étude où les deux échantillons présentant les plus grandes teneurs en composés phénoliques P8 (1169,18 μ /g) et P2 (1072,07 μ g/g) renferment ces familles botaniques. En effet, dans le pollen P8, la famille *Fabaceae* est dominante à 48 % et *Rosaceae* se trouve parmi les pollens très minoritaires à 2 %. Dans l'échantillon P2, les *Fabaceae* se trouvent à 28 % (secondaire) et les *Rosaceae* à 9 % (minoritaire).

Parmi les composés phénoliques détectés, 4 sont présents dans tous les échantillons (acide gallique, acide p-coumarique, resvératrol et hespéridine). En revanche, l'épicatéchine ne se trouve dans aucun échantillon. Pour les autres composés, leurs quantités diffèrent d'un échantillon à un autre. Selon Morais et al. (2011) et Leja et al. (2007), cette variabilité en termes de composition en composés phénoliques d'un échantillon à un autre peut être expliquée par la diversité des sources végétales et des plantes dont le pollen provient. Les plantes synthétisent des métabolites secondaires, des polyphénols précisément, cependant la quantité et la qualité de ces derniers dans le pollen d'abeille peut dépendre de plusieurs facteurs tels que les conditions de stress subis par les plantes, la situation géographique et de la végétation autour des ruchers qui ont conditionné la floraison. Was et al. (2017) ont rapporté que leur teneur dépend également de la méthode d'extraction et du stockage des extraits de pollen d'abeille.

Tableau VII: Composés phénoliques des 14 échantillons de pollen d'abeille détectés par HPLC (µg/g). (ND : non détecté).

Composés phénoliques	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Acides phénoliques:														
Acide gallique	33,34	8,48	27,34	11,92	43,74	19,91	14,78	31,60	11,34	17,31	18,11	6,17	19,46	28,80
Acide Proto-catéchique	ND	ND	8,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acide caféique	49,27	53,14	37,60	7,16	20,28	38,66	2,74	ND	5,55	3,93	13,98	7,87	16,71	ND
Acide syringique	15,31	2,24	ND	3,48	11,36	8,78	5,28	5,35	2,75	1,34	ND	3,83	2,29	2,96
Acide p-OH benzoïque	4,22	3,62	3,76	ND	ND	4,02	5,45	2,39	3,14	1,53	ND	2,74	2,90	3,72
Acide p-coumarique	1,93	3,95	29,91	9,61	19,80	9,36	2,69	22,67	6,17	2,01	3,69	8,28	13,02	5,78
Acide férulique	2,32	ND	ND	ND	ND	2,78	ND	ND	ND	1,43	8,00	ND	2,05	3,54
Acide t-cinnamique	26,53	58,17	8,89	ND	41,57	28,00	31,33	77,26	48,07	27,27	54,75	6,82	30,67	208,82
Flavonols														
Myricétine	97,18	530,15	ND	351,67	116,47	25,32	106,88	766,07	243,13	72,87	162,23	199,14	297,91	170,38
Rutine	ND	17,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	44,27
Flavan-3-ol														
Épicatéchine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Catéchine	3,85	ND	5,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flavanones														
Hespérétine	30,26	33,22	10,32	37,69	54,74	8,29	5,91	19,57	30,54	10,83	63,18	28,79	32,38	67,35
Pinocembrine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53,285	ND	ND	10,45	ND
Isoflavones														
Daidzéine	ND	ND	ND	ND	ND	12,595	ND	ND	30,52	3,06	12,85	16,96	ND	ND
Flavones														
Lutéoline	ND	ND	ND	ND	36,26	30,37	15,73	21,19	17,13	ND	71,78	41,62	ND	47,39
Chrysine	13,69	ND	6,33	ND	ND	7,16	9,57	ND	36,30	ND	65,34	ND	14,27	21,35
Stilbènes														
Resvératrol	278,70	293,83	205,12	91,18	243,26	394,69	373,12	212,77	89,87	80,26	69,82	42,32	108,13	89,58
Esters phénoliques														
CAPE	9,42	68,04	8,89	271,27	69,60	11,54	5,75	10,31	42,32	ND	175,89	255,01	278,32	57,63
Somme	566,02	1072,07	351,31	783,98	657,08	601,47	579,23	1169,18	566,83	275,12	719,62	619,55	828,56	751,57

V. Activités antioxydantes

Les radicaux libres, sous forme d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, font partie intégrante de la physiologie normale, ils peuvent se produire dans le corps humain ou dans les systèmes alimentaires. Un déséquilibre dans le système de défense antioxydant induit généralement une surproduction de ces espèces réactives, cela provoque le stress oxydatif qui conduit à son tour à la formation des radicaux libres. Le danger de ces espèces réactives réside dans leur réactivité avec les biomolécules ce qui peut causer des maladies. Les études scientifiques ont prouvé que les aliments contenant des antioxydants offrent une protection contre ces maladies. Les antioxydants alimentaires peuvent renforcer les défenses cellulaires et aider à prévenir les dommages oxydatifs aux composants cellulaires (Wong et al., 2006).

Dans ce travail, l'activité antioxydante des 14 échantillons de pollen d'abeille est évaluée *in vitro* par 4 méthodes : le piégeage du radical synthétique DPPH, la réduction du radical ABTS, le test FRAP et le pouvoir réducteur.

V.1. Activité anti-radicalaire DPPH (Scavenger)

Le radical DPPH est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des composés naturels *in vitro* en raison de sa stabilité et de sa facilité d'utilisation. Lorsqu'il est réduit, le radical DPPH change de couleur, passant du violet au jaune pâle, ce qui permet de suivre facilement la réaction d'antioxydation (Villaño et al., 2007).

Les résultats dans la figure 26 montrent une activité anti-radicalaire maximale de 84,85% enregistrée par P1, tandis que la minimale est celle de P8 avec 58,55%.

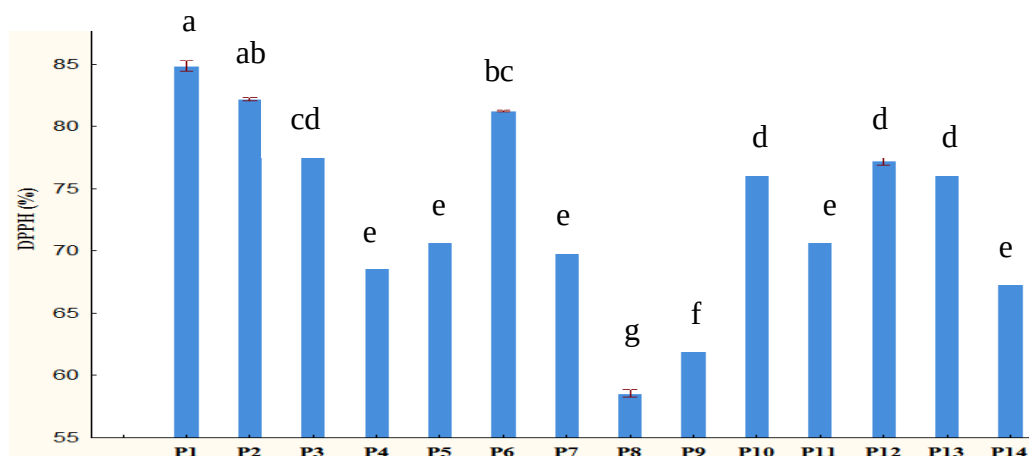


Figure 26: Activité antiradicalaire DPPH des pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

Ces pourcentages de piégeage sont plus élevés que ceux trouvés par Dos Santos Vasconcelos et al. (2017) qui ont travaillé sur des échantillons de pollens de Brésil dont les pourcentages sont entre 42,35 et 78,58 %. Ils sont également plus élevés que ceux des pollens du nord de l'Espagne étudiés par Rojo et al. (2023) et qui donne des résultats compris entre 17 et 88,2%.

D'après la littérature, plusieurs métabolites naturels interfèrent dans l'activité du piégeage des radicaux libres mais il semble que les acides phénoliques et les flavonoïdes soient les principaux responsables de cet effet (**Rojo et al., 2023**). Effectivement, cela est vérifié dans le cas présent où les échantillons enregistrant les pourcentages les plus élevés de l'activité scavenger présentent les taux les plus élevés en acides phénoliques et en flavonoïdes, notamment P1 et P2.

L'échantillon P1 est le deuxième plus riche échantillon en acide gallique avec 33,34 µg/g et le deuxième en acide caféique avec 49,27 µg/g. Il contient également des flavonoïdes tels que : myricétine (97,18 µg/g), hespérétine (30,26 µg/g), chrysinine (13,69 µg/g) et catéchine (3,85 µg/g).

L'échantillon P2 est le plus riche en acide caféique avec 53,14 µg/g et il vient en deuxième position en termes de teneur en myricétine avec 530,15µg/g.

Plusieurs études qui ont été faites ces dernières années pour comprendre la relation structure-activité prouvent l'existence d'éléments structuraux spécifiques requis pour exercer l'activité antioxydante. Les polyphénols, notamment les acides phénoliques et les flavonoïdes, sont capables de réduire le radical DPPH en donnant un électron pour neutraliser le radical, ce qui les rend efficaces pour lutter contre les dommages oxydatifs (**Pereira et al., 2013**).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la réduction du radical DPPH par les polyphénols. Parmi ces mécanismes, on trouve la déprotonation des groupes phénoliques des polyphénols, la formation de complexes entre les polyphénols et le radical DPPH et la réaction de transfert d'hydrogène. Ces mécanismes peuvent se produire simultanément ou de manière séquentielle, en fonction de la structure chimique des polyphénols et des conditions expérimentales.

La déprotonation des groupes phénoliques des polyphénols est l'un des mécanismes les plus couramment cités pour expliquer la réduction du radical DPPH. Les polyphénols contiennent des groupes phénoliques (OH) qui peuvent facilement céder un proton pour former un radical phénoxy. Ce radical phénoxy peut alors réagir avec le radical DPPH en lui cédant un

électron pour former un produit réduit. Cette réaction de déprotonation dépend du pKa des groupes phénoliques des polyphénols, de leur disponibilité pour réagir avec le radical DPPH, ainsi que de leur concentration dans la solution (**Gulcin et Alwaseel, 2023**).

La formation de complexes entre les polyphénols et le radical DPPH est un autre mécanisme possible pour expliquer la réduction du radical. Les polyphénols peuvent former des complexes stables avec le radical DPPH, ce qui facilite la réaction de transfert d'électron. Ces complexes peuvent être formés par des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène, ou des interactions hydrophobes entre les polyphénols et le radical DPPH. La formation de ces complexes peut augmenter l'efficacité de la réduction du radical DPPH par les polyphénols.

La réaction de transfert d'hydrogène est un mécanisme important pour expliquer la réduction du radical DPPH par les polyphénols. Lors de cette réaction, un atome d'hydrogène est transféré des groupes phénoliques des polyphénols au radical DPPH, ce qui conduit à la formation d'un produit réduit. Cette réaction de transfert d'hydrogène dépend de la force des liaisons hydrogène entre les polyphénols et le radical DPPH, ainsi que de la disponibilité des atomes d'hydrogène dans les polyphénols (**Sánchez-Moreno et al., 1998 ; Gulcin et Alwaseel, 2023**).

Des études ont confirmé que certaines caractéristiques des flavonoïdes sont importantes pour la capacité antioxydante telle que la structure o-dihydroxy dans le cycle B, qui confère une plus grande stabilité à la forme radicalaire et participe à la délocalisation électronique, une double liaison C2=C3 en conjugaison avec une fonction 4-oxo dans le cycle C responsable de la délocalisation électronique du noyau aromatique, des groupes 3-OH et 5-OH avec une fonction 4-oxo dans les cycles A et C. Toutes ces structures et fonctions leur donnent un potentiel maximal de piégeage des radicaux (**Pereira et al., 2013**).

D'après les résultats obtenus dans ce travail, il s'est avéré que les deux échantillons P2 et P6, qui sont parmi les plus riches en flavonoïdes, exercent une bonne activité anti-radicalaire. Ils viennent en deuxième et troisième position respectivement en termes de piégeage du radical DPPH avec des pourcentages respectifs de 82,15 et 81,11%. Ces résultats confirment ce qui a été décrit dans la littérature.

V.2. Activité anti-radicalaire ABTS

Dans ce test, la décoloration du radical ABTS témoigne de l'existence des antioxydants dans les extraits étudiés (Boligon *et al.*, 2014).

L'évaluation des pourcentages de réduction des échantillons de pollen d'abeille a abouti à l'obtention de résultats compris entre 88,19 (P9) et 90 % (P14) (Figure 27).

Ces valeurs sont supérieures à celles des pollens de l'Espagne rapportées par Rojo *et al.* (2023) qui sont dans l'intervalle 32,80 et 79,30 %. Elles sont aussi supérieures à celles des pollens de la Grèce étudiés par Atsalakisa *et al.* (2017).

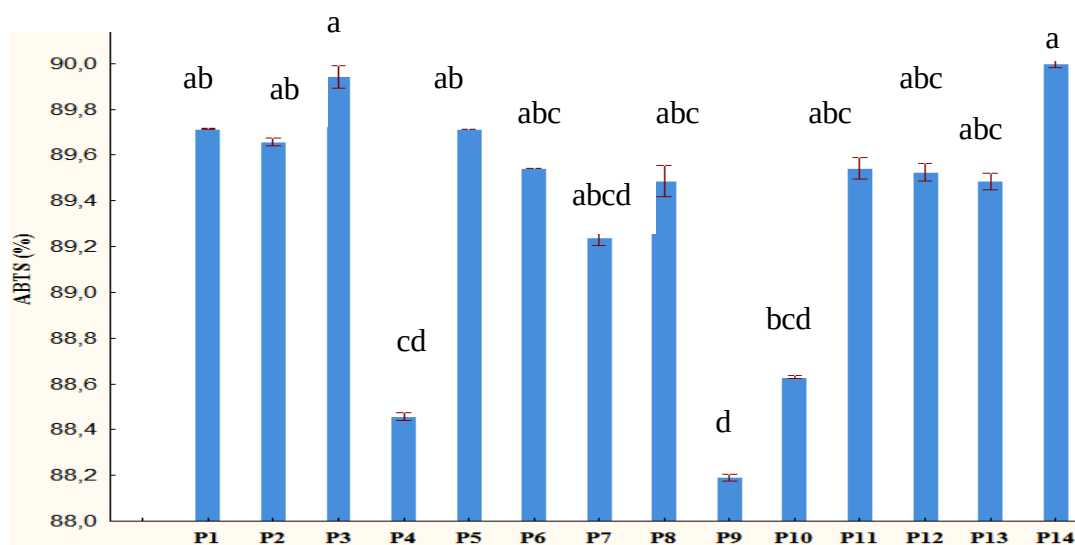


Figure 27: Activité antiradicalaire ABTS des pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

Plusieurs études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes antioxydants. Dans le cas du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, l'étude faite par Seedi *et al.* (2012) dans le but d'examiner les sources naturelles et les propriétés pharmaco-cinétiques des acides hydroxycinnamiques, explique que les acides hydroxycinnamiques sont les plus efficaces pour réduire le radical ABTS notamment l'acide caféique, sinapique, férulique et p-coumarique. Le mécanisme impliqué est principalement la capacité des acides hydroxycinnamiques à agir comme des donneurs d'hydrogène, ce qui leur permet de stabiliser les radicaux phénoxyles résultants. Cela se fait via le système conjugué comprenant l'arène et la chaîne latérale carboxylate. La position des groupes hydroxyles dans les cinnamates hydroxylés joue également un rôle très important dans la détermination pour de l'activité antioxydante (Seedi *et al.*, 2012).

Une autre étude faite par Pannala et al. (2001) s'est intéressée à l'activité antioxydante des flavonoïdes notamment les différentes catégories structurales de l'anneau B, en mettant l'accent sur les propriétés de réduction des radicaux libres. Il s'est avéré d'après cette étude que le groupe catéchol dans l'anneau B des flavonoïdes est un facteur clé pour l'activité antioxydante en raison du potentiel de réduction favorable. De plus, les composés phénoliques contenant trois groupes hydroxyles adjacents, tels que la delphinidine et l'épigallocatechine, sont plus efficaces que leurs homologues dihydroxylés.

Selon la même étude, les composés les plus efficaces dans la réduction du radical ABTS sont en particulier les composés trihydroxylés tels que le gallate d'épigallocatechine, l'épigallocatechine, la lutéoline, la quercétine, l'acide caféique et l'acide gallique. Le mécanisme d'action prédominant de ces composés qui leur permet de réduire les radicaux consiste probablement en la donation d'un électron pour former un semi-quinone, suivi de la formation d'une quinone.

En effet, dans le présent travail, tous les échantillons montrent une très bonne activité de réduction du radical ABTS, cela peut être expliqué par la composition des échantillons qui contiennent tous des acides phénoliques préalablement mentionnés comme très efficaces tels que les acides gallique et p-coumarique qui existent dans tous les échantillons. L'acide caféique se trouve dans tous les échantillons à l'exception de P8 et P14. Pour les deux flavonoïdes trihydroxylés myricétine et hespérétine, ils sont présents dans tous les échantillons à l'exception de P3 qui ne contient pas de myricétine. Il convient donc de déduire que l'activité antiradicalaire (ABTS) des échantillons est due à leur composition en composés phénoliques présentant des structures et des fonctions chimiques favorisant la neutralisation des radicaux.

V.3. Test de FRAP

Pour ce test FRAP, la capacité de réduction des échantillons de pollen d'abeille varie entre 29,72 (P4) et 243,86 $\mu\text{mol E FeSO}_4 / 1 \text{ g}$ (P6) (Figure 28). Cela montre que ces échantillons ont la capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) grâce aux antioxydants qu'ils contiennent.

Les résultats obtenus pour ce test se situent dans la même fourchette que ceux rapportés par Bakchiche et al. (2020) et Saral et al. (2019).

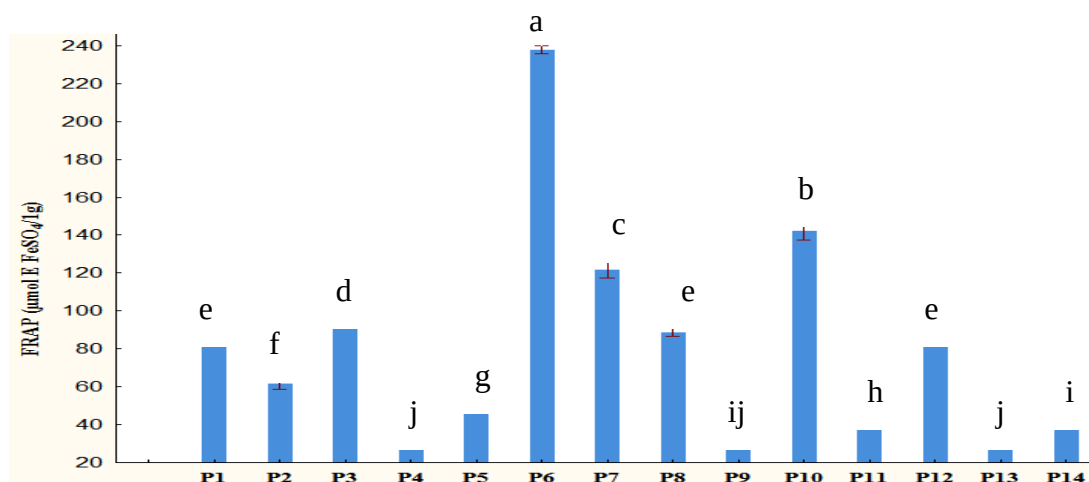


Figure 28: Activité FRAP des pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

D'après ces résultats, on remarque qu'il existe une variation dans la capacité des échantillons à réduire le fer dans ce test. Cette variation peut être expliquée par les différences existantes entre les échantillons en termes de composition en composés phénoliques.

L'étude faite par deGraft-Johnson et al. (2007) a montré que les polyphénols qui possèdent une forte capacité FRAP sont le catéchol, l'acide chlorogénique, protocatéchique, la quercitrine, la rutine, la catéchine, 3,4-dihydroxycinnamique, 3,4-dihydroxyhydrocinnamique, 3,4-dihydroxyphénylacétique, férulique, gallique et la quercétine. Les polyphénols réduisent le fer dans le test FRAP grâce à la présence des groupes phénoliques -OH, en particulier la structure de catéchol dans la molécule des polyphénols. La substitution aliphatique à un anneau de catéchol et la présence d'une double liaison dans une substitution aliphatique conjuguée à un anneau aromatique de catéchol contribuent également à la capacité de réduction du fer (deGraft-Johnson et al., 2007).

Dans ce travail, tous les pollens analysés contiennent des acides phénoliques et des flavonoïdes qui renferment le noyau catéchol notamment l'acide gallique, férulique, cinnamique, la rutine, la catéchine et la myrécétine. Ce qui explique la capacité de ces échantillons à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}).

L'échantillon P6 dépasse considérablement tous les autres échantillons en termes de réduction de fer (243,86 μmol équivalent FeSO_4 / 1 g). En se basant sur l'étude de deGraft-Johnson et al. (2007), on peut suggérer que cela est dû à sa grande teneur en resvératrol

(394.69 $\mu\text{g/g}$) qui contient la structure catéchol classée comme la plus efficace dans la réduction du fer dans le test FRAP.

V.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des échantillons de pollen varie de 51,27 (P4) à 96,11 mg EAG / 1g (P14) (Figure 29). Par conséquent, les pollens analysés ont l'aptitude de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} et plus l'absorbance du mélange réactionnel est élevée plus l'échantillon possède un caractère réducteur.

Ces résultats sont largement supérieurs à ceux obtenus par Aylanc et al. (2023) dans des échantillons de pollen du Maroc dont les valeurs sont comprises entre 0,03 et 0,05 mg EAG /1g.

L'analyse statistique donne 3 groupes homogènes ($p < 0.05$): 1^{er} groupe : P1, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P4, P12, P13 et P14 ; 2^{ème} groupe : P1, P2, P3, P5, P6, P11 et P12 et 3^{ème} groupe : P1, P2, P4, P5 et P12.

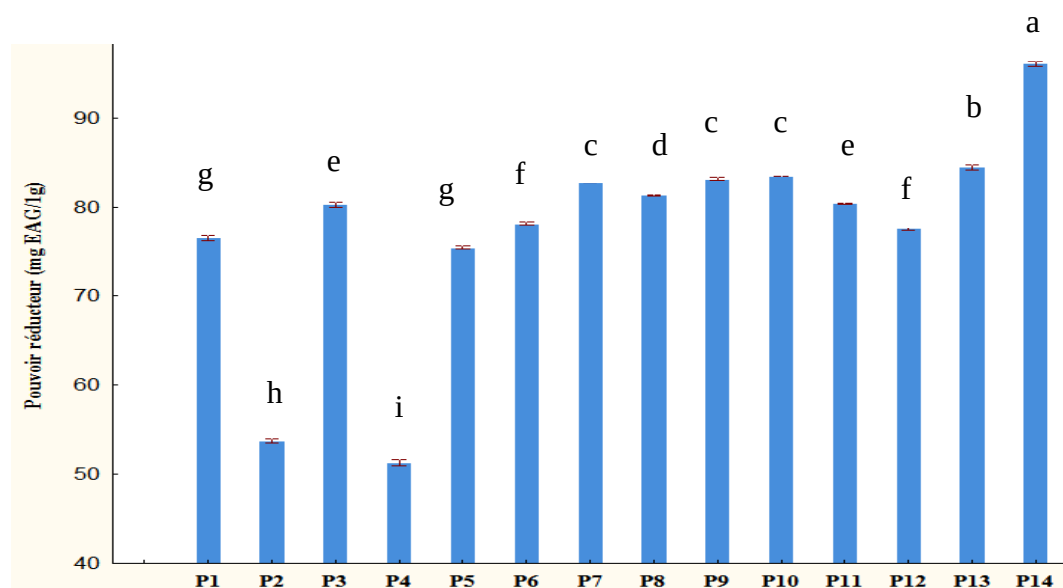


Figure 29: Pouvoir réducteur des pollens d'abeilles étudiés.

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne $\pm$ écart type ($n=3$). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement.

D'après Perron et Brumaghim (2009), les groupements catéchols et l'acide gallique jouent un rôle important pour réduire le fer dans le test du pouvoir réducteur. Cela peut expliquer les résultats obtenus ici où tous les échantillons contiennent des acides phénoliques tels que l'acide gallique, l'acide caféique, p-coumarique et trans-cinnamique, ils contiennent aussi le resvératrol. Tous ces composés possèdent une structure catéchol favorisant ainsi la réduction du fer.

Chiorcea-Paquim et al. (2020) expliquent aussi que les acides phénoliques et les flavonoïdes ont la capacité de réduire le fer grâce à leurs caractéristiques structurales. En effet, les flavonoïdes et les acides phénoliques exercent leur effet via les groupements –OH attachés aux cycles de leurs structures. La capacité antioxydante de ces composés est proportionnelle au nombre des groupes –OH attachés au cycle aromatique.

VI. Activité antimicrobienne

La méthode de diffusion sur disque de gélose est suivie pour mesurer les diamètres des zones d'inhibition (DZI), puis les concentrations minimales d'inhibition (CMI) sont calculées (Tableau VIII). Seules les 3 bactéries figurant dans ce tableau ont montré une sensibilité aux échantillons de pollen d'abeille étudiés.

Tableau VIII: Résultats de l'activité antibactérienne des échantillons de pollen d'abeille.

Echantillons	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Yersina pestis</i>	
	DZI (mm)	CMI (mg/ml)	DZI (mm)	CMI (mg/ml)	DZI (mm)	CMI (mg/ml)
P1	-	-	-	-	-	-
P2	-	-	-	-	14	5
P3	-	-	-	-	-	-
P4	16	5	-	-	14	5
P5	-	-	-	-	-	-
P6	18	2,5	-	-	13	5
P7	-	-	12	5	-	-
P8	18	2,5	-	-	-	-
P9	16	2,5	-	-	-	-
P10	-	-	15	5	15	5
P11	-	-	-	-	-	-
P12	15	5	-	-	15	5
P13	17	2,5	-	-	-	-
P14	-	-	-	-	-	-
Contrôle positif	20	-	19	-	21	-

- : absence d'effet.

Dans ce travail, les 14 échantillons de pollen d'abeille sont testés sur 8 bactéries et 2 souches de levures. Les échantillons P1, P3, P5, P11 et P14 n'ont montré aucun effet antibactérien, tandis que pour l'activité antifongique, aucun des échantillons n'a montré d'efficacité. Les échantillons P2, P4, P6, P7, P8, P9, P10, P12 et P13 ont une activité antibactérienne contre les souches *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersina pestis*.

Selon ces résultats, il semble que les échantillons de pollen d'abeille étudiés ici sont plus efficaces contre les souches Gram négatif, en particulier *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis* (Figure 30).

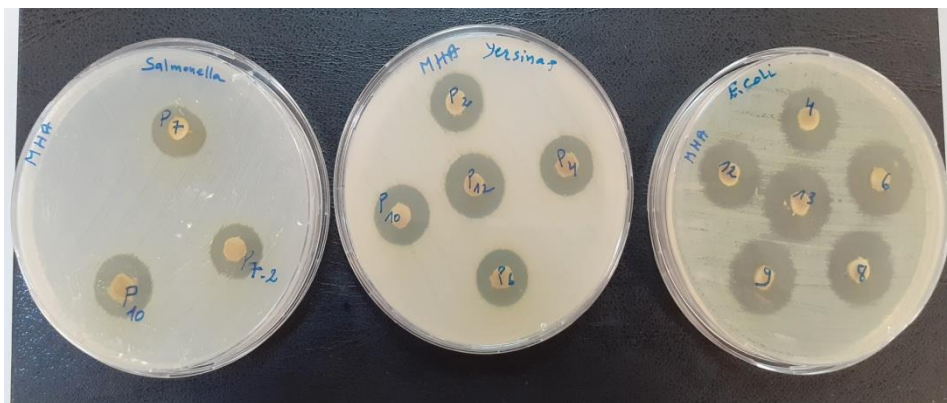


Figure 30: Photographie des résultats de l'activité antibactérienne.

De gauche à droite : *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* et *E. coli*.

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux obtenus par une étude slovène où il a été démontré que l'extrait éthanolique du pollen d'abeille était plus efficace sur les bactéries Gram négatif que sur les bactéries Gram positif. Cela peut s'expliquer par les différences structurelles existantes entre les membranes bactériennes Gram positif et Gram négatif.

La souche *E. coli* est sensible à 5 échantillons monofloraux (P4, P6, P8, P9 et P12) et à un échantillon polyfloral (P13). Les DZI varient de 15 à 18 mm pour les échantillons et atteignent 20 mm pour la gentamicine (le contrôle positif).

Les plus fortes inhibitions sont observées avec P6 et P8 contre *E. coli*, avec un DZI de 18 mm pour chacun des deux extraits. Ces résultats sont meilleurs que ceux trouvés par Ilie et al. (2022) dont les DZI sont entre 14,40 et 16 mm.

Le DZI d'*E. coli* par P6 et P8 est assez important (18 mm) reflétant ainsi l'efficacité de ces extraits. Les résultats de ce test confirment les conclusions de l'étude menée par Kacaniová et al. (2012) qui ont montré que la souche la plus sensible à l'extrait éthanolique du pollen d'abeille est *E. coli*.

La souche *Salmonella typhimurium* est sensible uniquement à deux échantillons de pollen d'abeille, à savoir P7 et P10, avec des DZI de 12 et 15 mm, respectivement. Ces résultats sont beaucoup plus élevés que ceux trouvés par Abd Elhamid et Elbayoumi (2017) dans l'étude menée sur le pollen d'abeille d'Égypte et dont les DZI sont entre 3 à 10 mm.

La souche *Yersinia pestis* est sensible à 5 échantillons (P2, P4, P6, P10 et P12). Les zones d'inhibition sont entre 13 mm (P6) et 15 mm (P10 et P12). Ces diamètres sont plus importants que ceux trouvés par Gerçek et al. (2022) qui ne dépassent pas 11 mm.

Les valeurs de CMI pour les trois souches *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis* dans cette étude varient de 2,5 à 5 mg/ml, ce qui signifie qu'elles se situent dans la même fourchette que celles de Soares de Arruda et al. (2021) sur l'extrait éthanolique de pollen d'abeille brésilien à 70 %. En outre, les résultats obtenus sont meilleurs que ceux rapportés par l'étude de Gercek et al. (2022), où les CMI varient de 2,5 à 10 mg/ml.

Ces données montrent l'effet antibactérien des échantillons de pollen d'abeille Algériens confirmant ainsi ce qui a été rapporté dans la littérature où plusieurs études indiquent que le pollen exerce un effet antibactérien surtout les extraits éthanoliques (**Komosinska-Vassev et al., 2015**). Effectivement, dans le cas présent l'extraction est faite avec de l'éthanol à 70 % et on a obtenu une bonne activité antibactérienne. Cette activité peut être expliquée par la composition phytochimique des extraits de pollen caractérisée par la présence des polyphénols notamment les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Didaras et al., 2020**). Cependant, cette activité est sélective où les pollens étudiés montrent une activité uniquement contre les bactéries Gram négatif.

Des études antérieures ont indiqué que les composés phénoliques, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes, présents dans le pollen d'abeille, exercent leur action antibactérienne en endommageant la membrane cellulaire, ce qui entraîne une fuite de potassium et déclenche l'autolyse cellulaire (**Erkmen et Ozcan, 2008**). De plus, Vinnikov et al. (1994) ont signalé que les flavonoïdes exercent leur effet antimicrobien en initiant des dommages à la membrane, ce qui entraîne une série d'événements, notamment une diminution de l'activité biosynthétique et une inhibition de la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. Ces dommages à la membrane affectent également la chaîne respiratoire et la production d'ATP. Ils peuvent également agir en inhibant les enzymes bactériennes et en privant les bactéries de certains métaux comme le fer (**Papuc et al., 2017**).

On peut conclure que l'effet antibactérien du pollen d'abeille est dû à sa composition phytochimique et à la structure membranaire bactérienne plutôt qu'à l'origine botanique de l'échantillon car des échantillons efficaces et non efficaces ont été trouvés des deux types (monofloraux et polyfloraux). D'autres facteurs peuvent également influencer comme le solvant d'extraction utilisé et sa concentration (**Šimunovic et al., 2019**).

VII. Activités enzymatiques

Dans ce travail, l'effet des extraits des 14 pollens d'abeilles est étudié sur 3 enzymes tel que le montre le tableau IX.

Tableau IX: Résultats des activités enzymatiques des pollens étudiés.

Echantillons	IC ₅₀ AChE (µg/ml)	IC ₅₀ α glucosidase (µg/ml)	IC ₅₀ SOD (µg/ml)
P1	3203,50±152,23 ^k	892,75±53,25 ^k	-
P2	2501,50±146,09 ⁱ	550,20±34,18 ^j	-
P3	2735,50±142,13 ^j	317,95±19,87 ^g	-
P4	1506±90,36 ^g	280,30±16,82 ^f	205,13±20,12 ^c
P5	1351±81,42 ^f	300,70±18,94 ^g	-
P6	1735,50±105,67 ^h	257,40±15,87 ^e	-
P7	868,50±52,11 ^c	382,45±24,38 ⁱ	515,85±22,42 ^d
P8	1040,70±68,56 ^e	217,35±12,78 ^c	103,31±14,96 ^b
P9	798,25±47,89 ^b	173,35±12,34 ^b	-
P10	1022,85±38,77 ^e	214,40±14,89 ^c	-
P11	1341±72,58 ^f	309,40±18,56 ^g	-
P12	552,90±15,32 ^a	134±8,02 ^a	-
P13	1343,50±76,42 ^f	337,05±21,69 ^h	-
P14	928,30±55,03 ^d	239,65±14,38 ^d	15,97±2,63 ^a
Contrôle positif	Galantamine 8,42±0,52	Acarbose 190,45±14,75	-

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne ± écart type (n=3). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes statistiquement (p<0,001).

VII.1. Activité anti- AChE

L'acétylcholine joue un rôle essentiel dans la transmission des signaux nerveux. L'enzyme AChE décompose l'acétylcholine qui arrête la neurotransmission et influence la mémoire. Selon la théorie cholinergique, une carence en acétylcholine est associée aux troubles de la mémoire observés dans la maladie d'Alzheimer. Pour cela, les thérapies sont basées sur l'inhibition de l'AChE afin d'augmenter les concentrations d'acétylcholine dans les synapses, contribuant ainsi à ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer (**Khoirunisa et al., 2016**).

L'activité anti-AChE des extraits de pollen d'abeille sont testés. La meilleure activité inhibitrice est exercée par l'échantillon P12 (Tazmalt) qui enregistre la valeur IC₅₀ la plus faible avec 552,90 µg/ml. En deuxième et troisième position en termes d'efficacité viennent les deux échantillons P9 (Kherrata) et P7(Boumerdès) avec des IC₅₀ respectifs de 798,25 et 868,5 µg/ml.

Les valeurs des IC₅₀ obtenus ici sont plus élevées que celles trouvées par Silva Araújo et al. (2017) pour les pollens de Brésil et qui varient de 26,85 à 967,53 µg/ml.

L'analyse statistique révèle l'existence d'une différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les différents échantillons à l'exception de P5, P11 et P13 qui forment un groupe.

Les études qui ont été faite sur l'activité anti- AChE, notamment celle de Yildiz et al. (2014) et celle de Pascoal et al. (2014) ont confirmé que cette activité est en relation avec les concentrations en polyphénols. Les études qui se sont intéressées au niveau moléculaire des interactions AChE-polyphénols ont révélé que les flavonoïdes présentent les principaux inhibiteurs. En effet les flavonoïdes possèdent dans leur structure un anneau aromatique (anneau B) qui contient des groupes -OH établissant des liaisons avec le site actif de l'enzyme sans pour autant induire de modifications dans sa structure tertiaire, ce qui signifie que le processus d'inhibition se produit en raison du blocage de l'entrée du site actif. D'autres composés phénoliques ont été aussi qualifiés comme des inhibiteurs de l'AChE tels que les acides hydroxy-benzoïques et hydroxy-cinnamiques.

La quercétine, comme exemple de flavonoïdes, établit plusieurs liaisons hydrogène avec les résidus d'acides aminés au site anionique. La fraction carbonyle dans l'anneau C et le groupe -OH en position C5 de l'anneau A établissent des liaisons hydrogène avec Tyr133, tandis que le groupe -OH en position C3 de l'anneau C établit des liaisons hydrogène avec le résidu Trp86 dans le site anionique. Enfin, le groupe -OH du côté phényle (anneau B) montre des liaisons hydrogène avec les résidus dans le site actif. Ces liaisons hydrogène confèrent aux flavonoïdes une activité inhibitrice de l'AChE améliorée par rapport à d'autres composés phénoliques tels que l'acide caféique et l'acide rosmarinique. L'existence d'un groupe -OH en position C3 de l'anneau C semble être cruciale pour augmenter l'activité (**Roseiro et al., 2012 ; Sz wajgier, 2014**).

Selon l'analyse HPLC des composés phénoliques, tous les pollens étudiés contiennent des flavonoïdes et des acides phénoliques avec des variations d'un échantillon à un autre mais les pollens P12, P9 et P7 possèdent les meilleures activités anti-AChE. Ces échantillons ne présentent pas les valeurs les plus élevées de flavonoïdes et des acides hydroxy-benzoïques ou hydroxy- cinnamiques, cependant ils ont la meilleure activité inhibitrice anti-AChE. D'après ces résultats, la synergie entre les différents composés phénoliques peut jouer un rôle dans l'optimisation de l'activité des échantillons de pollen d'abeille.

L'activité anti-AChE de ces échantillons laisse présumer que le pollen d'abeille pourrait contribuer à l'inhibition de la progression de la maladie d'Alzheimer par l'inhibition de l'enzyme AChE.

VII.2. Activité anti- α -glucosidase

Les résultats relatifs à l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase montrent que les IC_{50} varient de 134 à 892,75 $\mu\text{g/ml}$. Les meilleures activités sont exercées par les échantillons P12, P9 et P10 avec des IC_{50} respectifs de 134 ; 173,35 et 214,40 $\mu\text{g/ml}$. Donc, ils sont éventuellement de bons inhibiteurs d'absorption du glucose au niveau de l'intestin grêle. En effet, Xiao et al. (2013) expliquent que l' α -glucosidase est une enzyme qui joue un rôle important dans la digestion des glucides. Son inhibition permet de prévenir l'absorption excessive de glucose au niveau de l'intestin grêle. Ce contrôle du taux de glucose dans le sang est nécessaire surtout dans le cas des patients diabétiques. Pour cela, les inhibiteurs de l' α -glucosidase sont considérés comme un moyen efficace de prévenir l'aggravation du diabète et de l'obésité.

En revanche, P1(Adekkar) et P2 (Akbou) présentent la capacité d'inhibition la plus faible avec des IC_{50} les plus élevés (892,75 et 550,20 $\mu\text{g/ml}$, respectivement).

Les deux échantillons P9 (Kherrata) et P12 (Tazmalt) sont les plus efficaces. Ils enregistrent des IC_{50} meilleurs que celui de l'acarbose utilisé comme contrôle positif dont l' IC_{50} est de 190,45 $\mu\text{g/ml}$. Cela reflète la grande capacité inhibitrice de P9 et P12.

Les résultats obtenus ici sont meilleurs que ceux de l'étude faite par Bakour et al. (2022) sur les pollens du Maroc dont la meilleure activité a un IC_{50} de 820 $\mu\text{g/ml}$.

L'analyse ANOVA montre que les échantillons sont statistiquement différents les uns des autres et la différence est très hautement significative à l'exception de P3, P5 et P11 qui forment un groupe homogène ($p < 0,001$).

Pour comprendre l'activité inhibitrice de l' α -glucosidase, plusieurs études ont été faites et elles ont abouti à une relation entre l'inhibition de cette enzyme et la structure des polyphénols existant dans les produits d'origine végétale. D'après ces études, l'activité des composés phénoliques est due à leur structure spéciale ou à des groupes fonctionnels qui ont une affinité avec le site actif de l' α -glucosidase, tels que le groupe 3-OH dans le cycle C et le groupe catéchol dans le cycle B des flavonoïdes, contribuant à l'activité inhibitrice de l' α -

glucosidase par liaison hydrogène avec le site actif des enzymes α -glucosidase (**Proença et al., 2017 ; Şöhretoğlu et Sari, 2020**).

Ces polyphénols inhibent principalement l' α -glucosidase en interagissant directement avec l'enzyme, souvent par le biais de liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés situés au niveau ou à proximité du site actif. Cela entrave l'accès au substrat et perturbe l'activité catalytique. La force inhibitrice des polyphénols est considérablement accrue par la présence et l'abondance de groupes galloyles. En effet, ces groupes ont la capacité de s'introduire dans le site actif de l'enzyme et d'établir des interactions puissantes, conduisant à une inhibition compétitive ou mixte (**Sun et al., 2020**).

VII.3. Activité de la SOD

Les résultats montrent que l'échantillon P14 est le plus efficace avec un IC_{50} de 15,97 μ g/ml. L'analyse statistique montre que les échantillons sont différents et la différence est très hautement significative ($p < 0,001$).

La SOD est une enzyme de défense efficace qui catalyse la dismutation des anions superoxyde O_2^- en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elle accélère la réaction spontanée de dismutation de l'anion radical superoxyde par un mécanisme d'oxydation-réduction cyclique d'un ion métallique du site actif (**Zhang et al., 2016**).

Le pollen d'abeille est riche en polyphénols, particulièrement les flavonoïdes et les acides phénoliques considérés comme responsables majeurs de ses propriétés antioxydantes *in vitro* (**Rzepecka-Stojko et al., 2015**). De plus, la capacité antioxydante est souvent associée à la concentration en polyphénols. Les recherches scientifiques ont montré que les polyphénols peuvent moduler l'activité des enzymes SOD. Par exemple, il a été rapporté que les polyphénols agissent en tant qu'antioxydants en augmentant les activités d'enzymes antioxydantes importantes, telles que la SOD. Bien que l'activation directe de l'enzyme SOD par les polyphénols présents dans le pollen d'abeille *in vitro* ne soit pas universellement rapportée, les effets bénéfiques notés dans des modèles déficients en SOD et l'accroissement des niveaux de cette enzyme dans des recherches animales suggèrent que les polyphénols du pollen d'abeille pourraient contribuer à la préservation ou à l'amélioration de la fonction de la SOD lors d'un stress oxydatif (**Guo et al., 2019 ; Caruso et al., 2022**).

Le profil phénolique du pollen d'abeille varie en fonction de l'origine botanique. Cependant, il contient toujours des composés tels que la lutéoline, le kaempférol et la rutin qui

contribuent à ses effets. Généralement, les polyphénols présents dans le pollen d'abeille montrent une puissante activité antioxydante *in vitro* et pourraient renforcer les défenses associées à la SOD face au stress oxydatif (Sawicki *et al.*, 2022).

Dans le cas présent, l'échantillon P14 se distingue par un IC₅₀ très faible reflétant une grande efficacité. Cet échantillon se caractérise par la teneur du composé rutine la plus élevée. Ce résultat confirme ce qui a été rapporté dans la littérature et expliquerait le résultat obtenu.

VIII. Test de viabilité cellulaire

La cytotoxicité des échantillons de pollen d'abeille est évaluée par la technique de tétrazolum en microculture (MTT) sur les trois types cellulaires (HaCaT, Vero et HeLa) et la viabilité des cellules est calculée pour différentes cellules.

Les pourcentages de viabilité des cellules obtenus avec les échantillons de pollen sont tous très élevés et supérieurs à 80 %. Le pourcentage de viabilité le plus faible enregistré est celui de P8 à 150 µg/ml avec les cellules HaCaT qui est de 82,01 %.

Les deux types cellulaires Vero et HeLa présentent des pourcentages de viabilité très élevés avec tous les échantillons. Par conséquent, les extraits des échantillons de pollen d'abeille étudiés ici ne présentent pas de toxicité sur les cellules.

Pour certains échantillons, en particulier P4, P5, P6, P7, P8, P9, P13 et P14, le pourcentage de viabilité cellulaire dépasse parfois les 100%, on peut donc suggérer que les extraits de ces échantillons du pollen ont stimulé la prolifération des cellules étudiées. D'après ces données, les échantillons P4, P7, P8 et P14 sont sélectionnés pour faire le test de cicatrisation des plaies et l'activité antivirale.

IX. Activité cicatrisante

Le test de cicatrisation des plaies sert à évaluer le degré de fermeture des plaies et donc le pouvoir de guérison éventuel des échantillons testés (Wolf *et al.*, 2009).

Après une période de réparation de 72 heures, l'effet des échantillons P4, P7, P8 et P14 sur la prolifération des cellules HaCaT et leur migration vers la zone endommagée est observé au microscopique (Figure 31).

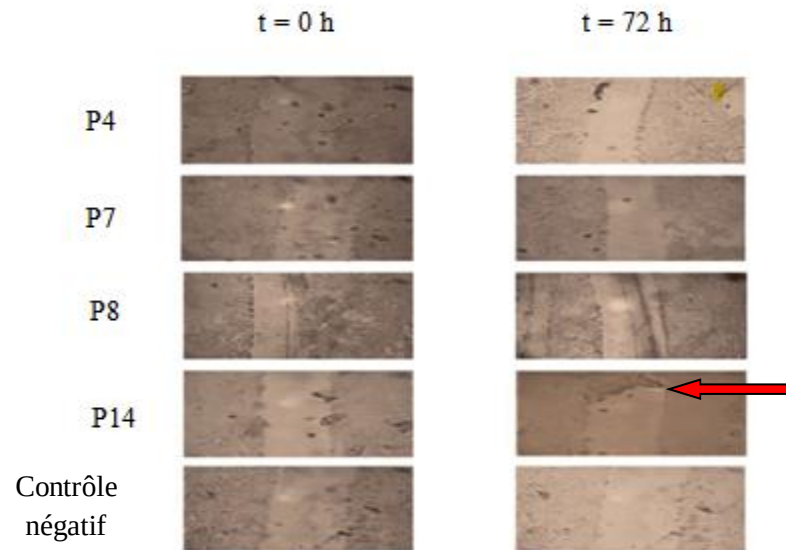


Figure 31: Résultats du test de la cicatrisation.

La fermeture de la plaie précédemment créée est un indice du pouvoir de cicatrisation du pollen d'abeille

(La flèche rouge pointe le lieu de cicatrisation).

Les résultats montrent que seul l'échantillon P14 stimule la prolifération et la migration cellulaire vers les tissus endommagés pour combler les vides et les lésions causées par la plaie et donc il a la capacité de restaurer les tissus. Ces résultats confirment que le pollen d'abeille est un produit très prometteur pour la cicatrisation des plaies. Les résultats trouvés dans ce test sont en accord avec ceux trouvés par Olczyk et al. (2016) qui ont découvert que le pollen d'abeille améliore fortement le processus de guérison et stoppe l'inflammation. Cependant, l'étude faite par Schuh et al. (2019) sur les pollens de Chili n'a révélé aucun effet sur les cellules.

D'après les recherches, le pollen d'abeille contribue à la cicatrisation des cellules grâce à sa composition riche en nutriments et en polyphénols. D'un côté, les différents nutriments qu'il contient ont un rôle nutritif qui permet de nourrir les cellules par les différentes vitamines et minéraux. D'un autre côté, les polyphénols influencent directement la prolifération et la migration des cellules cutanées contribuant ainsi à des étapes cruciales pour la fermeture de la plaie. Dans les tests de scratch *in vitro*, les polyphénols stimulent la faculté des fibroblastes et des kératinocytes à se diviser et à combler activement la zone "blessée" ce qui favorise l'avancement des cellules dans leur cycle de division. En outre, certains polyphénols peuvent interagir avec les protéines du cytosquelette ou les facteurs de croissance, favorisant ainsi la motilité cellulaire, un élément essentiel à la migration (Velnar et al., 2009 ; Dumitru et al., 2022 ; El-Seedi et al., 2022).

D'après le résultat de ce test, seul l'échantillon P14 a donné un effet cicatrisant traduit par la prolifération des cellules. Son effet peut être justifié par sa composition en polyphénols. En effet, l'analyse HPLC montre que le pollen P14 est le plus riche en acide t-cinnamique, rutine et en hespérétine. La rutine, en particulier, pourrait jouer un rôle crucial car selon Zulkefli et al. (2023), elle possède un effet cicatrisant important.

X. Activité antivirale

L'activité antivirale du pollen d'abeille est évaluée par comparaison à un contrôle négatif (milieu de culture seulement) et un contrôle positif (milieu de culture additionné d'acyclovir) (Figure 32).

Les cellules Veroensemencées sans acyclovir ou sans pollen d'abeille (le contrôle négatif) montrent des changements cytopathologiques tels que le gonflement des cellules, l'aggrégation et l'agrandissement nucléaire, ainsi que la perturbation de l'intégrité membranaire. Cependant, la densité de la couche cellulaire est un indice de l'activité anti-HSV-1.

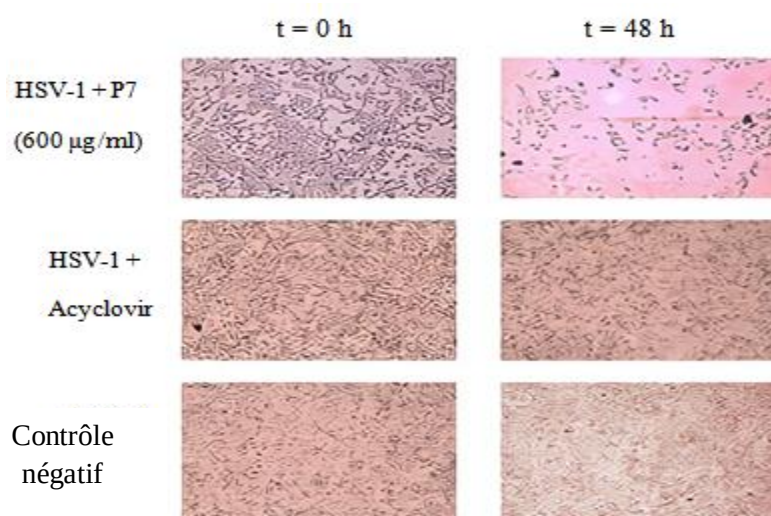


Figure 32: Résultats de l'activité antivirale (anti-HSV-1).

Les quatre échantillons de pollen d'abeille testés (P4, P7, P8 et P14) se comportent de manières différentes vis-à-vis de l'infection par le HSV-1.

- L'efficacité de P4 persiste jusqu'à 48 heures de l'incubation. Après les 48 h, son efficacité diminue et les plaques d'infection sont devenues nombreuses.
- L'activité antivirale de l'échantillon P8 est moyenne et stable tout au long de l'expérience, montrant des signes de bonne vitalité cellulaire à 48 et à 72 heures de

l'expérience, tels que l'adhérence des cellules aux parois des puits de culture même après 72 heures d'incubation.

- P14 est le moins efficace contre le HSV-1, il montre la formation du plus grand nombre de plaques d'infection, en plus du détachement des cellules des parois des puits, ce qui est un signe clair d'infection.
- Quant à l'échantillon P7, il est le plus efficace à 100 µg/ml, montrant un très bon aspect de vitalité cellulaire à 48 heures et une efficacité moyenne à 72 heures. D'après ces résultats prometteurs, d'autres concentrations sont testées (50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 µg/ml). Les trois concentrations de 200, 400 et 600 µg/ml manifestent la meilleure activité antivirale avec des pourcentages de vitalité cellulaire respectifs de 6,97, 7,63 et 20,49 %, et un IC₅₀ de 64,79 µg/ml. Cet IC₅₀ appartient à l'intervalle des valeurs des IC₅₀ recommandées pour les extraits de plantes contre les maladies infectieuses, qui doit être inférieure à 100 µg/ml tel que l'explique Cos et al. (2006).

L'analyse statistique révèle que P7 à 600 µg/ml possède une efficacité différente de manière très hautement significative des deux concentrations 200 et 400 µg/ml ($p < 0,001$) (Figure 33).

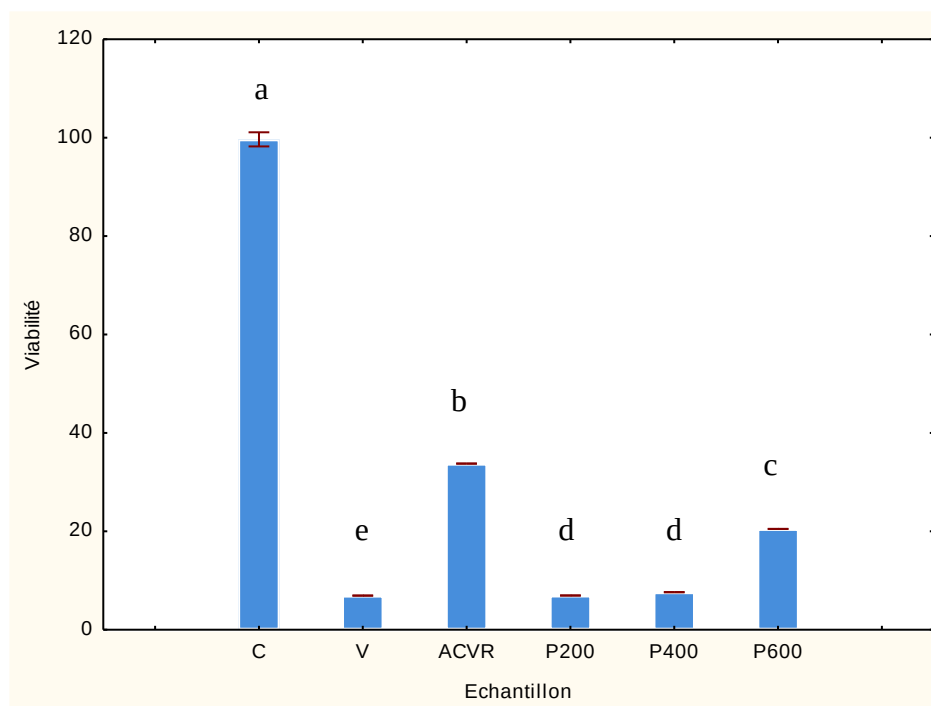


Figure 33 : Viabilité des cellules après contact avec HSV-1.

C : Contrôle ; V : En présence du virus HSV-1

ACVR : avec Acyclovir, P200, P400, P600 : P7 à concentrations 200, 400 et 600 µg/ml.

D'après ces résultats, l'activité anti-HSV-1 du pollen d'abeille n'est pas dose dépendante car le meilleur résultat obtenu est à 600 µg/ml mais lorsque la concentration augmente à 800 et 1000 µg/ml, la protection contre l'infection par le HSV-1 diminue. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chiamenti et al. (2019).

Chiamenti et al. (2019) expliquent que l'activité antivirale n'est pas dose dépendante par rapport à la composition des extraits. Les extraits bruts contiennent de différentes substances à des concentrations élevées. Ces substances peuvent présenter une certaine toxicité à des concentrations élevées mais à faible toxicité elles ont une activité antivirale.

Les substances naturelles en général et les flavonoïdes en particulier ont un effet positif contre les différents types d'infections. Cependant des concentrations élevées peuvent parfois induire une toxicité (**Tang et al., 2012**). Pour cela, l'évaluation de la cytotoxicité dans les tests antiviraux est indispensable pour déterminer les concentrations présentant une toxicité minimale tolérée contre les cellules hôtes utilisées dans l'étude (**Di Nunzio et al., 2017**). Ces paramètres doivent être vérifiés à un stade précoce de l'étude car 30 % des candidats médicamenteux échouent en raison de leurs effets toxiques (**Kola et Landis, 2004**).

Dans la littérature, il a été rapporté que les polyphénols en général ont une activité antivirale mais chaque composé peut agir sélectivement sur un virus et pas sur un autre. Pour l'activité anti-HSV-1, des études ont confirmé que des composés phénoliques tels que la quercitrine, la rutine, l'héspéridine, le resvératrol, la lutéoline, l'acide caféique, l'acide gallique, l'apigénine, la chrysine, la catéchine et d'autres sont d'une grande efficacité (**Montenegro-Landívar et al., 2021**).

En se basant sur ces études, les polyphénols sont responsables de l'activité anti-HSV-1 des échantillons de pollen d'abeille notamment le resvératrol et la myricétine que des études ont mentionné comme efficaces et qui sont présents dans les échantillons étudiés avec de grandes quantités. La différence d'efficacité entre P4, P7, P8 et P14 peut s'expliquer par la différence de composition phénolique entre eux, en particulier les proportions des composés phénoliques et de synergie entre eux au sein de chaque échantillon de pollen d'abeille. D'après les résultats, P7 possède la meilleure combinaison de composés phénoliques ce qui a aboutit à une meilleure activité anti-HSV-1.

Selon Kamboj et al. (2012), des composés phénoliques tels que l'acide gallique, la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine, l'acide ellagique, la rutine, l'acide paraascorbique, la

quercétine, le kaempférol, la morine, la galagénine, l'apigénine, la naringénine, la chrysine, la lutéoline, l'analgin, l'acide rosmarinique et d'autres acides phénoliques sont souvent responsables de l'activité antivirale. Effectivement, cela est confirmé dans ce travail où la plupart de ces polyphénols apparaissent dans la composition des échantillons de pollens suite à l'analyse de composition faite par HPLC.

Ces différents composés phénoliques peuvent agir différemment pour exercer leur effet antiviral. Ils peuvent avoir comme cibles différents niveaux de la structure virale telle que l'enveloppe virale, les protéines virales, l'acide nucléique viral et d'autres cibles. Ils peuvent également inhiber la formation de l'ADN ou de l'ARN viraux, inhiber l'activité de reproduction virale en bloquant l'adsorption virale et en perturbant les enzymes spécifiques du virus. Ces mécanismes permettent d'empêcher la croissance virale dans les cellules infectées sans être toxiques pour les cellules normales environnantes (**Kamboj et al., 2012**).

XI. Activité protectrice d'ADN

Pour révéler l'effet des extraits de pollen d'abeille sur l'ADN, ils sont d'abord testés seuls pour voir leur impact sur l'intégralité de l'ADN ensuite ils sont testés en présence d'un agent oxydant.

XI.1. Effets des extraits sur l'ADN

Pour estimer le potentiel des extraits de pollen à causer des dommages à l'ADN, ce test est réalisé en utilisant l'électrophorèse sur gel d'agarose sur de l'ADN plasmidique surenroulé pBR322. Les deux extraits P6 et P10 sont sélectionnés pour cela en raison de leurs teneurs élevées de polyphénols totaux. Pour chacun d'entre eux, trois concentrations sont testées : 500, 1000, et 2000 µg/ml.

Dans ce test, l'ADN peut prendre trois formes : la forme I est surenroulée, la forme II est partiellement ouverte ou cassée et la forme III est linéaire. Chacune de ces formes peut être observées sur le gel d'agarose après l'électrophorèse.

Après une migration électrophorétique de 90 minutes, les résultats montrent que les fragments de forme I sont restés intacts (l'apparition de la bande blanchâtre indique que l'ADN est intacte) en l'absence et en présence d'extraits. Ces résultats indiquent qu'aucun effet nucléasique sur l'ADN n'a été observé à ces concentrations d'extraits et donc on peut conclure que P6 et P10 sont sûrs et pas néfastes sur l'ADN (Figure 34).

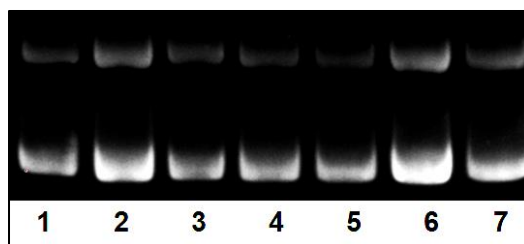


Figure 34: Effets des extraits de pollens d'abeilles sur l'ADN plasmidique pBR322 superenroulé.

Voie 1 : ADN témoin ; voie 2-4:ADN + P6 (500, 1000 et 2000 µg/ml) ; voie 5-7:ADN + P10 (500, 1000 et 2000 µg/ml).

XI.1 Effets des extraits sur l'ADN contre la réaction de Fenton

La réaction entre H_2O_2 et des ions métalliques tels que Fe^{2+} ou Cu^{2+} est connue sous le nom de la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}\cdot + \text{OH}^-$). Le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) résultant de cette réaction est hautement réactif à proximité de l'ADN.

Le radical hydroxyle peut soustraire un atome d'hydrogène du désoxyribose, laissant un adduit radicalaire d'ADN qui se réarrange, entraînant finalement le clivage du squelette phosphodiester et conduisant à la rupture de brin. Ce radical peut également endommager les bases nucléotidiques. Ces dommages à l'ADN (rupture de brin ou dommage aux bases) peuvent entraîner des mutations génétiques, un cancer ou la mort cellulaire (**Perron et Brumaghim, 2009**).

Dans ce travail, la capacité des extraits P6 et P10 à protéger l'ADN est étudiée (Figure 35).

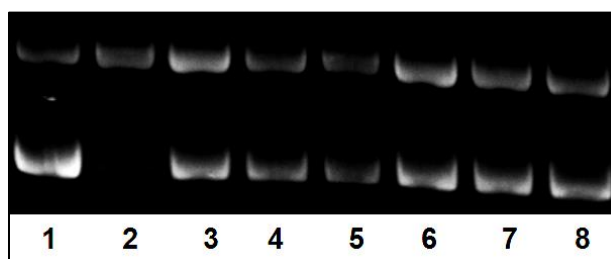


Figure 35: Effets protecteurs des extraits sur l'ADN plasmidique pBR322 superenroulé contre la réaction de Fenton

Voie 1 : ADN témoin ; voie 2 : ADN + 1 mM FeSO_4 + 2 % H_2O_2 ; voie 3-5 : ADN + 1 mM FeSO_4 + 2 % H_2O_2 + P6 (500, 1000 et 2000 µg/ml) ; voie 6-8 : ADN + 1 mM FeSO_4 + 2 % H_2O_2 + P10 (500, 1000 et 2000 µg/ml).

Les résultats montrent que le pourcentage de la forme I surenroulée est presque de 75 % pour le témoin négatif dans la figure 35, voie 1. L'ajout de FeSO_4 et de H_2O_2 à l'ADN plasmidique pBR322 superenroulé dans le cas du contrôle positif conduit à l'apparition de la

forme II (partiellement ouverte ou cassée) avec un pourcentage de 72,50% et la forme I disparaît complètement (Figure 35, Voie 2).

Les deux extraits P6 et P10 sont testés à des concentrations de 500, 1000 et 2000 µg/ml. L'ajout des extraits favorise l'augmentation des pourcentages de la forme I surenroulée.

Pour l'extrait P6, les trois concentrations 500, 1000 et 2000 µg/ml donnent des résultats d'ADN de la forme I avec des pourcentages respectifs de 53,10 ; 55,10 et 59,10% en (Figure 35, voies 3-5). En présence de P10 avec les mêmes concentrations, les pourcentages de la forme I sont de 54,90 ; 58,70 et 62,40 % (Figure 35, voies 6-8). Ces résultats confirment que les extraits protègent contre les dommages de l'ADN, probablement en piégeant le radical hydroxyle issu de la réaction de Fenton en raison de leurs capacités antioxydantes. Les résultats obtenus ici sont en accord avec l'étude de Bridi et al. (2022) portant sur le pollen d'abeille du Chili, où ils ont constaté que le pollen d'abeille protège l'ADN plasmidique des dommages.

Pour expliquer cet effet protecteur d'ADN, les chercheurs ont établi une relation entre la structure et la capacité des polyphénols à chélater le fer et par conséquent empêcher le déroulement de la réaction de Fenton (**Cheng et Breen, 2000**). Les études ont montré que les composés phénoliques ayant des motifs catécholiques sur le cycle B telles que lutéoline et quercétine sont des inhibiteurs plus puissants de la réaction de Fenton que les composés sans catéchols. Basé sur les grandes constantes de stabilité pour les complexes fer-catécholate, il semblerait que la liaison du fer au groupe catécholate soit responsable de l'activité antioxydante plus élevée observée pour des composés tels que la lutéoline et la quercétine. Cependant, la présence d'un groupe gallol sur le cycle A plutôt que sur le cycle B pourrait également lier le fer (**Perron et Brumaghim, 2009**).

Cheng et Breen (2000) ont rapporté que les substituants sur le cycle B affectent plus significativement l'activité antioxydante. Jovanovich et al. (1996) ainsi que par Arora et al. (1998) ont montré qu'un groupe catéchol sur le cycle B permet la liaison au fer et a une activité antioxydante et que les substituants phénoliques sur le cycle A contribuent peu à l'activité antioxydante des polyphénols. Pour prévenir les dommages à l'ADN médiés par le fer, Perron et al. (2008) ont déterminé que les composés phénoliques avec des groupes gallol sont des antioxydants plus puissants que ceux avec seulement des groupes catéchol.

Les échantillons testés P6 et P10 contiennent, tous les deux, la myricétine qui possède un groupe catéchol et l'acide gallique qui contient un groupes gallol. Ainsi, ces structures auraient joué un rôle dans la chélation du fer ce qui va empêcher le déroulement de la réaction du Fenton qui produit le radical $\text{OH}\cdot$. Cela confirme l'effet antioxydant de ces échantillons du pollen d'abeille.

XII. Corrélations

XII.1. Corrélations couleur composés bioactifs et activités antioxydantes

Les corrélations entre la couleur et les composés bioactifs et celles entre les activités antioxydantes et les composés bioactifs sont résumées dans le tableau X.

XII.1.1. Corrélations entre couleur et composés bioactifs

L'analyse statistique révèle l'existence d'une corrélation positive entre la couleur et les caroténoïdes ($r = 0,98$, $p < 0,001$) d'une part et la couleur et les teneurs en proanthocyanidines ($r = 0,73$; $p < 0,01$) d'autre part. La couleur est aussi en corrélation avec l'acide cinnamique ($r=0,90$; $p < 0,001$), l'acide gallique ($r=0,86$; $p < 0,001$) et l'hespéridine ($r=0,75$; $p < 0,01$).

Ces corrélations confirment ce qui a été rapporté dans la littérature sur la couleur du pollen d'abeille qui dépend de ses plantes d'origine et de sa composition, notamment en flavonoïdes et caroténoïdes (Owayss *et al.*, 2004).

XII.1.2. Corrélation entre composés bioactifs et activités antioxydantes

L'analyse des tableaux de corrélations révèle l'existence de relations linéaires entre différentes activités antioxydantes étudiées et les composés bioactifs présents dans les échantillons de pollens d'abeille.

L'activité antiradicalaire ABTS est en corrélation très hautement significative avec l'acide cinnamique ($r=0,87$), hautement significative ($p < 0,01$) avec les flavonoïdes ($r=0,75$) les proanthocyanidines ($r=0,79$), l'acide gallique ($r=0,79$) et l'acide cinnamique ($0,87$). Elle est aussi en corrélation significative ($p < 0,05$) avec les caroténoïdes ($r=0,62$) et l'acide parahydroxybenzoïque ($r=0,61$).

Les résultats du test FRAP présentent une corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec l'acide syringique ($r=0,90$) et le resvératrol ($r=0,98$) et hautement significative avec ($p < 0,01$) avec l'acide parahydroxybenzoïque ($r=0,71$).

L'activité du pouvoir réducteur est en corrélation significative ($p < 0,05$) avec les flavonoides ($r = 0,65$), l'acide parahydroxybenzoïque ($r = 0,60$) et l'acide cinnamique ($r = 0,62$).

A partir de ces corrélations entre les activités antioxydantes et les composés bioactifs notamment les composés phénoliques, on peut conclure que ces composés sont à l'origine de ces activités antioxydantes.

Dans le test ABTS, les polyphénols agissent en neutralisant les radicaux libres grâce à leur capacité à donner des électrons. Ils peuvent également former des complexes avec les ions métalliques, réduisant ainsi leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène. Dans le test FRAP, les polyphénols agissent en réduisant le complexe de Fe^{3+} à Fe^{2+} , ce qui indique leur pouvoir réducteur. Enfin, dans les tests de pouvoir réducteur, les polyphénols peuvent agir en donnant des électrons pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène, ou en piégeant les radicaux libres (**Boligonet *al.*, 2014**).

Tableau X : Corrélations entre couleurs et activités antioxydantes avec les composés bioactifs.

Variables	FRAP	PR	ABTS	Cafféic	CAPE	a.cmr	Acide gallique	Hsp	Myr	RSV	a. syr	a. cnm	a. p- OH benzoïc	CPT	Flav	Pac	Carot	Couleur
FRAP	1																	
PR	0.27	1																
ABTS	0.12	0.72	1															
a. caféique	-0.31	-0.70	-0.92	1														
CAPE	-0.73	-0.65	-0.74	0.87	1													
a.cmr	-0.01	-0.09	0.01	-0.28	-0.10	1												
acide gallique	-0.02	0.53	0.79 **	-0.90	-0.59	0.58	1											
Hsp	-0.85	0.16	0.36	-0.14	0.31	-0.17	0.32	1										
Myr	0.01	-0.14	-0.06	-0.21	-0.06	1	0.51	-0.22	1									
RSV	0.98 ***	0.18	0.02	-0.16	-0.63	-0.17	-0.20	-0.86	-0.14	1								
a. syr	0.90 **	0.06	-0.05	-0.23	-0.59	0.38	0.06	-0.93	0.40	0.85	1							
a. cnm	0.62	0.62 *	0.87 ***	-0.65	-0.41	-0.08	0.74	0.74	-0.15	-0.38	-0.47	1						
a. p- OH benzoïc	0.71 **	0.60 *	0.61 *	-0.59	-0.84	-0.45	0.17	-0.26	-0.48	0.71	0.38	0.34	1					
CPT	-0,35	-0,44	-0,63	0,51	0,61	0,42	-0,20	-0,02	0,46	-0,39	-0,10	-0,45	-0,76	1				
Flav	0,69 *	0,65 *	0,75 **	-0,90	-0,99	0,20	0,67	-0,29	0,16	0,58	0,59	0,43	0,77	-0,55	1			
Pac	-0,32	0,53	0,79 **	-0,56	-0,29	-0,36	0,49	0,77	-0,43	-0,36	-0,59	0,93	0,39	-0,47	0,27	1		
Carot	-0,58	0,44	0,62 *	-0,57	-0,09	0,32	0,79	0,80	0,26	-0,70	-0,54	0,84	-0,17	-0,06	0,16	0,68	1	
Couleur	-0,48	0,45	0,74	-0,68	-0,24	0,31	0,86 ***	0,75 **	0,24	-0,60	-0,45	0,90 ***	-0,03	-0,19	0,30	0,73 **	0,98 ***	1

a.cmr : acide p-coumarique. **Hsp** : Hespérétine. **Myr** : Myrécétine. **RSV** : Resvératrol. **a. syr** : acide syringique. **a. cnm** : acide t-cinnamique. **a. p- OH benzoïc** : acide p-OH benzoïque. **CPT** : Composés phénoliques totaux. **Flav** : Flavonoides. **Carot** : Caroténoides. **Pac** : Proanthocyanidines. * Corrélacion significative, ** Corrélacion hautement significative, *** Corrélacion très hautement significative.

XII.2. Corrélation entre composés bioactifs et activité antibactérienne

L'analyse des résultats révèle plusieurs corrélations à différents niveaux de significativité entre le diamètre des zones d'inhibition ou les concentrations minimales inhibitrices des trois souches *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis* et les composés bioactifs (Tableau XI).

Le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) d'*E. coli* corrèle d'une manière très hautement significative ($p < 0,001$) avec l'acide coumarique ($r = 0,83$) et la myricétine ($r = 0,86$) et hautement significative ($p < 0,01$) avec les composés phénoliques totaux ($r = 0,72$).

Le DZI de *Salmonella typhimurium* est en corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec le resvératrol ($r = 0,90$) et hautement significative ($p < 0,01$) avec l'acide parahydroxybenzoïque ($r = 0,74$).

Le DZI de *Yersinia pestis* trouve, d'une part, en corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec l'acide caféique ($r = 0,92$) et CAPE ($r = 0,98$) et d'autre part en corrélation significative ($p < 0,05$) avec les composés phénoliques totaux ($r = 0,65$).

Lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont calculées pour les extraits présentant des zones d'inhibition. Les CMI sont avérées, elles aussi, en corrélation avec des composés bioactifs comme suit :

Les CMI d'*E. coli* sont en corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec l'acide parahydroxybenzoïque ($r = -0,95$) et hautement significative ($p < 0,01$) avec les flavonoïdes ($r = -0,76$) et significative ($p < 0,05$) avec les proanthocyanidines ($r = -0,64$) et l'acide cinnamique ($r = -0,61$).

Les CMI de *Salmonella typhimurium* présentent une corrélation hautement significative ($p < 0,01$) avec les caroténoïdes ($r = -0,77$) et significative ($p < 0,05$) avec l'hespérétine ($r = -0,67$).

Les CMI de *Yersinia pestis* montrent une corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec les flavonoïdes ($r = -0,98$) et avec l'acide parahydroxybenzoïque ($r = -0,84$) et significative ($p < 0,05$) avec l'acide gallique ($r = -0,67$).

D'après toutes ces corrélations, il ressort que les composés bioactifs des extraits du pollen, notamment les polyphénols, sont responsables de l'activité antibactérienne.

Tableau XI : Corrélations entre composés bioactifs et activité antibactérienne.

variables	DZl _E	DZl _S	DZl _Y	CMI _E	CMI _S	CMI _Y	caféic	CAPE	a. cmr	a. gallique	Hsp	Myc	RSV	a. syr	a. cmn	a.p-OH benzoic	CPT	Flav	Carot	Pac
DZl_E	1																			
DZl_S	-0,58	1																		
DZl_Y	0,51	-0,33	1																	
CMI_E	0,87	-0,52	0,87	1																
CMI_S	-0,58	1	-0,33	-0,52	1															
CMI_Y	0,51	-0,33	1,00	0,87	-0,33	1														
a.cafféique	0,30	0,05	0,92***	0,71	0,05															
CAPE	0,43	-0,43	0,98***	0,82	-0,43	0,92	1													
a.cmr	0,83***	-0,57	-0,04	0,45	-0,57	-0,04	-0,28	-0,10	1											
a. gallique	0,07	-0,47	-0,67	-0,35	-0,47	-0,67*	-0,90	-0,59	0,58	1										
Hsp	-0,20	-0,67	0,13	-0,04	-0,67*	0,13	-0,14	0,31	-0,17	0,32	1									
Myr	0,86***	-0,54	0,01	0,50	-0,54	0,01	-0,21	-0,06	1	0,51	-0,22	1								
RSV	-0,31	0,90***	-0,50	-0,47	0,90	-0,50	-0,16	-0,63	-0,17	-0,20	-0,86	-0,14	1							
a. syr	0,19	0,55	-0,43	-0,14	0,55	-0,43	-0,23	-0,59	0,38	0,06	-0,93	0,40	0,85	1						
a. cmn	-0,48	-0,35	-0,58	-0,61*	-0,35	-0,58	-0,65	-0,41	-0,08	0,74	0,74	-0,15	-0,38	-0,47	1					
a. p- OH benzoic	-0,81	0,74**	-0,84	-0,95***	0,74	-0,84***	-0,59	-0,84	-0,45	0,17	-0,26	-0,48	0,71	0,38	0,34	1				
CPT	0,72**	-0,46	0,65*	0,79	-0,46	0,65	0,51	0,61	0,42	-0,20	-0,02	0,46	-0,39	-0,10	-0,45	-0,76	1			
Flav	-0,34	0,34	-0,98	-0,76**	0,34	-0,98***	-0,90	-0,99	0,20	0,67	-0,29	0,16	0,58	0,59	0,43	0,77	-0,55	1		
Carot	0,03	-0,77	-0,24	-0,12	-0,77**	-0,24	-0,57	-0,09	0,32	0,79	0,80	0,26	-0,70	-0,54	0,84	-0,17	-0,06	0,16	1	
Pac	-0,66	-0,20	-0,46	-0,64*	-0,20	-0,46	-0,56	-0,29	-0,36	0,49	0,77	-0,43	-0,36	-0,59	0,93	0,39	-0,47	0,27	0,68	1

a.cmr : acide p-coumarique. **Hsp** : Hespérétine. **Myr** : Myrérecétine. **RSV** : Resvératrol. **a. syr** : acide syringique. **a. cmn** : acide t-cinnamique. **a. p- OH benzoic** : Acide p-OH benzoïque. **CPT** : Composés phénoliques totaux. **Flav** : Flavonoides. **Carot** : Caroténoides. **Pac** : Proanthocyanidines. *Corrélation significative, ** Corrélation hautement significative, *** Corrélation très hautement significative.

Les résultats de cette étude révèlent que les extraits de pollen sont efficaces contre les bactéries Gram négatif. Ces dernières ont une paroi cellulaire composée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe contenant des lipopolysaccharides (LPS). En revanche, les bactéries Gram-positives n'ont pas de membrane externe et leur paroi est composée d'une couche épaisse de peptidoglycane et d'acide lipotéichoïque.

Pour exercer leur effet antibactérien, les polyphénols peuvent agir à plusieurs niveaux de la cellule bactérienne (**Kumar et Pandey, 2013**). Ils ont la capacité d'interagir avec la paroi cellulaire bactérienne et ils peuvent inhiber la liaison des pili bactériens aux récepteurs spécifiques des cellules hôtes. Ils peuvent également interagir avec les protéines ou les phospholipides de la bicouche lipidique, ce qui perturbe la perméabilité membranaire, affecte la fluidité membranaire, inhibe la respiration et modifie les processus de transport ionique. Les flavonoïdes notamment ont la capacité de perturber la rigidité membranaire, inhiber différentes enzymes telles que les hyaluronidases bactériennes et chélater le fer conduisant à inhiber la croissance bactérienne. Les tanins ont un impact sur la chaîne respiratoire bactérienne. Les polyphénols peuvent aussi exercer leur activité antibactérienne par l'inhibition de la synthèse protéique et la régulation des protéines, de l'ADN et de l'ARN chez différentes bactéries. Les études confirment également l'effet des flavonoïdes sur la formation de biofilms bactériens, ainsi que leur capacité à chélater le fer et à inhiber la croissance bactérienne (**Papuc et al., 2017**).

XII.3. Corrélation entre les composés bioactifs et l'activité enzymatique

La matrice de corrélation révèle une relation entre les IC_{50} des enzymes (AChE, l' α -glucosidase et la SOD) et les composés bioactifs contenus dans les extraits de pollen.

Les IC_{50} d'inhibition de l'AChE montrent une corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec les flavonoïdes ($r = -0,92$) et l'acide parahydroxybenzoïque ($r = -0,94$).

Les IC_{50} d'inhibition de l' α -glucosidase sont en corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec les caroténoïdes ($r = -0,86$) et hautement significative ($p < 0,01$) avec l'acide gallique ($r = -0,75$) et l'acide coumarique ($r = -0,71$). Ils sont aussi en corrélation significative ($p < 0,05$) avec la myricétine ($r = -0,67$).

Les IC_{50} de la SOD présentent une corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) avec les caroténoïdes ($r = -0,94$), hautement significative ($p < 0,01$) avec l'héspéridine ($r = -0,78$) et

significative ($p < 0,05$) avec les acides gallique ($r = -0,70$) et cinnamique ($r = -0,65$) (Tableau XII).

Parmi les mécanismes d'action des polyphénols, il y a l'activation de certaines enzymes notamment celles impliquées dans les processus antioxydants. Les flavonoïdes en particulier sont connus pour cette activité (**Olszowy, 2019**). Yeh et Yen (2006) ont noté dans leur étude que les flavonoïdes et des acides phénoliques tels que l'acide gallique ont la capacité d'augmenter l'activité de la SOD. Cela est en accord avec les résultats de cette étude où l'hespéridine et l'acide gallique présentent une corrélation avec l'activité de cette enzyme.

Les polyphénols peuvent agir en tant qu'activateurs ou inhibiteurs d'enzymes en fonction de leur structure chimique et de leur concentration.

Dans ce travail, les polyphénols présents dans les extraits de pollen d'abeille montrent une capacité d'inhiber l'ACHé et l' α -glucosidase qui pourrait avoir des effets bénéfiques sur la fonction cognitive et un potentiel dans le traitement du diabète. Ils ont également une capacité à activer la SOD, une enzyme impliquée dans la lutte contre le stress oxydatif, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques sur plusieurs maladies liées au stress oxydant. Ces résultats laissent suggérer que les polyphénols pourraient être utilisés comme agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de diverses maladies.

XII.4. Corrélation entre les composés bioactifs et l'activité antivirale

Pour cette activité, une corrélation très hautement significative ($p < 0,001$) est enregistrée entre les pourcentages de vitalité cellulaire et le resvératrol ($r = 0,90$) et une autre hautement significative ($p < 0,01$) avec l'acide parahydroxybenzoïque ($r = 0,74$) (Tableau XII).

Selon la littérature, plusieurs polyphénols peuvent avoir une activité antivirale notamment anti-HSV-1. Ces composés représentent de nouvelles pistes et des études futures pourraient permettre le développement d'agents antiviraux pharmacologiquement acceptables grâce à leur action sur différents niveaux de la structure du virus. Parmi les polyphénols qui ont été démontrés comme ayant une activité anti-HSV marquée c'est le resvératrol (**Kamboj et al., 2012**).

D'ailleurs dans cette thèse, c'est le composé qui montre la meilleure corrélation avec l'activité antivirale avec un coefficient de corrélation très important ($r=0,90$) avec une très haute significativité.

Les études antérieures qui se sont intéressées aux effets du resvératrol sur le virus HSV ont montré qu'il inhibe la réplication de ce virus de manière dose-dépendante. Il a été démontré aussi qu'il affecte la réplication du virus en réduisant l'expression des protéines essentielles à la réplication du HSV. De plus, il a la capacité d'inhiber l'activation de NF- κ B, entraînant l'inhibition de la réplication du HSV. Une nouvelle découverte a montré qu'il active l'axe AMPK/Sirt1, ce qui réduit la réplication du HSV-1(Annunziata *et al.*, 2018).

Tableau XII : Corrélations entre activité enzymatique et antivirale avec les composés bioactifs.

variables	AChe IC 50	α -glc IC 50	SOD IC 50	HSV-1	a.cafféique e	CAPE	a. cmr	a. gallique	Hsp	Myr	RSV	a.syr	a. cmn	a. p- OH benzoïc	CPT	Flav	Carot	Pac
ACHe IC 50	1																	
α -glc IC 50	-0.20	1																
SOD IC 50	-0.17	0.96	1															
HSV-1	-0,5	0,93	0,93	1														
a.cafféique	0.82	0.38	0.36	0,05	1													
CAPE	0.95	-0.08	-0.14	-0,43	0.87	1												
a.cmr	0.20	-0.71 **	-0.48	-0,57	-0.28	-0.10	1											
a. gallique	-0.49	-0.75 **	-0.70 *	-0,47	-0.90	-0.59	0.58	1										
Hsp	0.13	-0.57	-0.78 **	-0,67	-0.14	0.31	-0.17	0.32	1									
Myr	0.24	-0.67 *	-0.43	-0,54	-0.21	-0.06	1	0.51	-0.22	1								
RSV	-0.57	0.73	0.84	0,90 ***	-0.16	-0.63	-0.17	-0.20	-0.86	-0.14	1							
a. syr	-0.37	0.33	0.56	0,55	-0.23	-0.59	0.38	0.06	-0.93	0.40	0.85	1						
a. cmn	-0.54	-0.50	-0.65 *	-0,35	-0.65	-0.41	-0.08	0.74	0.74	-0.15	-0.38	-0.47	1					
a. p- OH benzoïc	-0.94 ***	0.51	0.46	0,74 **	-0.59	-0.84	-0.45	0.17	-0.26	-0.48	0.71	0.38	0,34	1				
CPT	0,74	-0,30	-0,20	-0,46	0,51	0,61	0,42	-0,20	-0,02	0,46	-0,39	-0,10	-0,45	-0,76	1			
Flav	-0,92	-0,02	0,06	0,34	-0,90	-0,99	0,20	0,67	-0,29	0,16	0,58	0,59	0,43	0,77	-0,55	1		
Carot	-0,11	-0,86	-0,94	-0,77	-0,57	-0,09	0,32	0,79	0,80	0,26	-0,70	-0,54	0,84	-0,17	-0,06	0,16	1	
Pac	-0,50	-0,27	-0,49	-0,20	-0,56	-0,29	-0,36	0,49	0,77	-0,43	-0,36	-0,59	0,93	0,39	-0,47	0,27	0,68	1

a.cmr : acide p-coumarique. **Hsp** : Hespérétine. **Myr** : Myrécétine. **RSV** : Resvératrol **a. syr** : acide syringique. **a. cmn** : acide t-cinnamique. **a. p- OH benzoïc** : Acide p-OH benzoïque. **CPT** : Composés phénoliques totaux. **Flav** : Flavonoides. **Carot** : Caroténoides. **Pac** : Proanthocyanidines. *Corrélation significative, ** Corrélation hautement significative, ***Corrélation très hautement significative.

XIII. Analyse en composantes principales (ACP)

Pour mieux comprendre les relations entre les différents paramètres étudiés dans ce travail, une analyse ACP est réalisée. Cette méthode permet de visualiser dans un espace bidimensionnel les relations existantes entre les variables étudiées ce qui facilite la détermination des points de similitude et de différence entre les échantillons analysés (Figure 36 et 37).

D'après cette analyse, les 14 échantillons de pollen d'abeille forment 4 groupes. Dans le même groupe, il existe un mélange d'échantillons monofloraux et polyfloraux, à partir de cela il ressort que la répartition des groupes s'est faite en fonction des résultats des activités biologiques et non en fonction de l'origine florale.

Le premier groupe contenant P4, P8, P9, P11, P12 et P13 est le groupe caractérisé par une activité antibactérienne notamment contre *E.coli* et une richesse en myricétine et CAPE.

Le deuxième groupe renferme les échantillons P2, P3, P5, P6, P10 et P14. Ces pollens contiennent les meilleures teneurs en composés bioactifs et ils ont des activités antioxydante et enzymatique (α -glucosidase et AChE).

Le troisième groupe est formé par P1 qui a des teneurs moyennes de composés bioactifs. Cet échantillon a une bonne activité DPPH et ABTS. Cependant, il reste faible pour les autres activités.

Le quatrième groupe est formé par l'échantillon P7 qui se distingue par son activité antibactérienne notamment contre *Salmonella typhimurium* et son activité anti-HSV étant le seul pollen à avoir cette activité.

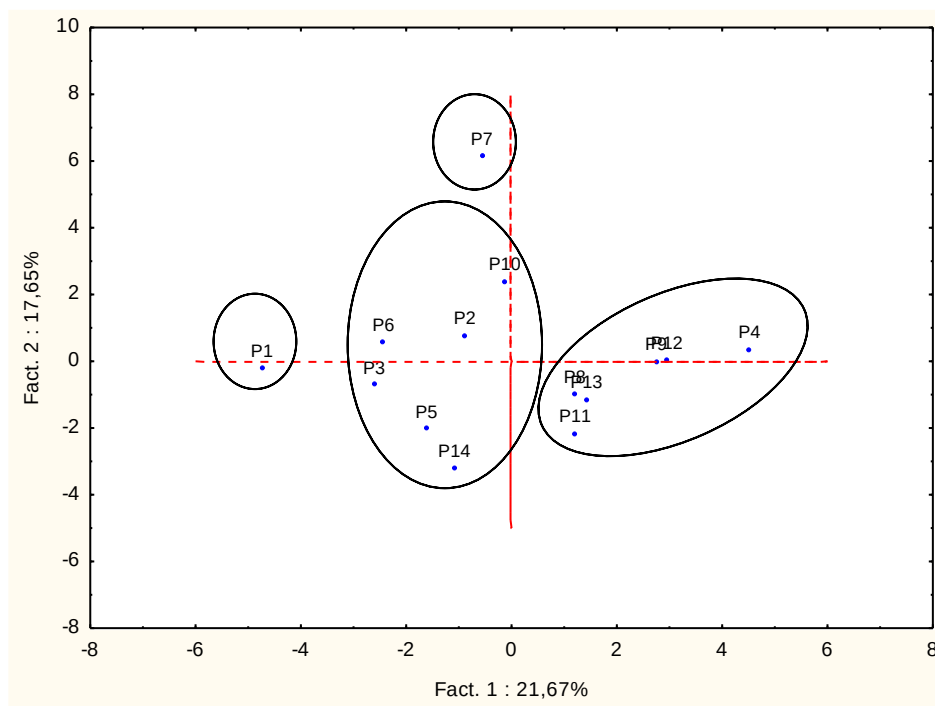


Figure 36: ACP des échantillons de pollen d'abeille.

Le cercle de corrélations confirme les différentes corrélations obtenues dans les tableaux de corrélations entre couleur, composés bioactifs et activités biologiques (Figure 37).

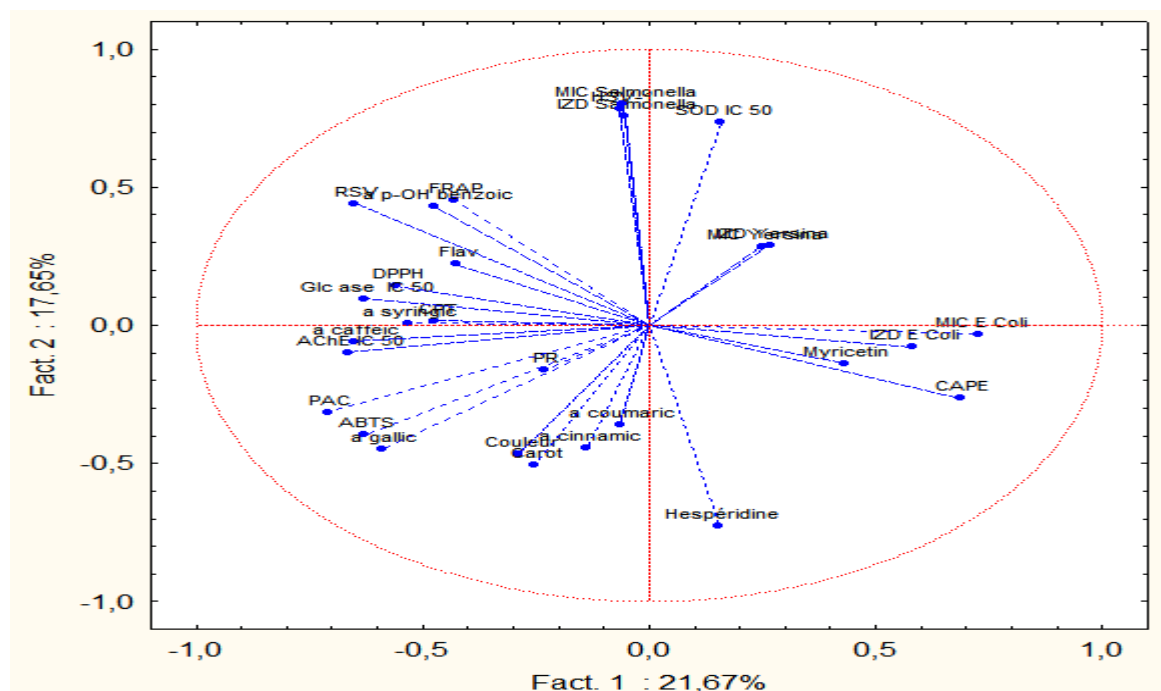


Figure 37: Cercle de corrélations entre la couleur, les composés bioactifs et les activités biologiques.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail, 14 échantillons de pollen d'abeille de différentes régions d'Algérie sont étudiés.

L'analyse pollinique a permis de classer les échantillons en pollens monofloraux (P1, P3, P4, P6, P8, P9, P10 et P12) et pollens polyfloraux (P2, P5, P7, P11, P13 et P14). Elle a révélé également l'existence de 16 familles botaniques : *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Cistaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*, *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Geraniaceae*, *Liliaceae*, *Mimosaceae*, *Oleaceae*, *Rhamnaceae* et *Lamiaceae*..

Cette variation de composition en familles botaniques d'un échantillon à un autre reflète la diversité botanique dans les régions de récolte.

Les paramètres physico-chimiques étudiés sont la couleur, les protéines et les minéraux. La couleur des échantillons varie de 0,099 à 0,154 à 450 nm. Les protéines ont des teneurs comprises entre 14,68 et 32,22 mg EBSA/1g. Quant aux minéraux, ils sont analysés par la technique ICP-OES qui a montré l'existence de Na, Mg, Al, Fe, K, Mn, Ca et Zn. Les teneurs en potassium (K) sont les plus élevées de tous les minéraux et pour tous les échantillons, allant de 800,57 à 986,96 mg/Kg.

Les antioxydants sont dosés et les résultats montrent que les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les proanthocyanidines et les caroténoïdes ont des teneurs allant de 18,62 à 38,88 mg EAG /1g, 3,09 à 5,467 mg ECA /1g, 19,82 à 33,34 mg ECA /1g et 0,53 à 1,373 mg E β CA /1g, respectivement.

L'analyse HPLC-UV a donné le profil qualitatif et quantitatif des composés phénoliques des échantillons de pollen étudiés. Elle a révélé que les échantillons contiennent différentes classes de polyphénols telles que les acides phénoliques (acides gallique, protocatéchique, caféique, syringique, p-hydroxybenzoïque, p-coumarique, férulique, t-cinnamique), les flavonoïdes (myricétine, rutine, catéchine, hespéritine, pinocembrine, daïdzéine, lutéoline, chrysine), les stilbènes (resvératrol) et les esters phénoliques (CAPE). Les échantillons se différencient les uns des autres en termes de qualité et de quantité des composés phénoliques qu'ils renferment. Cependant, les composés phénoliques les plus répandus sont l'acide gallique, l'hespéritine et le resvératrol.

L'activité antioxydante est étudiée à travers 4 tests (DPPH, ABTS, FRAP et pouvoir réducteur). La capacité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS a montré des pourcentages de réduction allant de 58,55 à 84,85 % et de 88,19 à 90 %, respectivement. La capacité réductrice évaluée par les tests FRAP et pouvoir réducteur a donné des résultats compris dans les intervalles respectifs de 29,72 à 243,86 μmol équivalent $\text{FeSO}_4/1 \text{ g}$ et de 51,27 à 96,11 mg EAG / 1g.

Les pollens étudiés possèdent une activité sélective contre les bactéries Gram négatif qui sont : *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis*.

La souche *E. coli* est sensible à 6 échantillons (P4, P6, P8, P9 et P12 et P13). Les diamètres d'inhibition varient de 15 à 18 mm. Les deux échantillons les plus efficaces sont P6 et P8 avec un diamètre de zone d'inhibition de 18 mm tous les deux. La souche *Salmonella typhimurium* est sensible uniquement à deux échantillons qui sont P7 et P10, avec des diamètres de zone d'inhibition de 12 et 15 mm, respectivement. Quant à la souche *Yersinia pestis*, elle est sensible à 5 échantillons (P2, P4, P6, P10 et P12) avec des zones d'inhibition allant de 13 à 15 mm.

Les valeurs de CMI pour les trois souches précédentes dans cette étude varient de 2,5 mg/ml à 5 mg/ml.

Les pollens étudiés ont montré une capacité d'inhibition pour l'AChe et l' α -glucosidase avec des IC_{50} allant de 552,90 à 868,5 $\mu\text{g/ml}$ et de 134 à 892,75 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Cependant, certains échantillons ont un effet d'activation sur l'enzyme SOD avec des IC_{50} allant de 15,97 à 515,85 $\mu\text{g/ml}$.

Les extraits P6 et P10 possèdent un effet protecteur pour l'ADN et cela se reflète par la conservation de la forme surenroulée.

Les résultats ont révélé que les extraits ne présentent aucune toxicité. L'échantillon P14 possède la meilleure activité cicatrisante tandis que P7 est le meilleur contre HSV-1.

Il existe des corrélations entre les différentes activités biologiques et les composés bioactifs contenus dans les échantillons de pollen. L'ACP a révélé que les regroupements des échantillons ne se font pas en fonction de leurs origines botaniques mais plutôt en fonction de leurs teneurs en composés bioactifs et activités biologiques.

A travers cette thèse, il s'est avéré que le pollen d'abeille est un aliment à grand potentiel qui offre des perspectives prometteuses pour la santé humaine. Des études ultérieures pourraient explorer davantage ses vertus. Pour cela :

- L'établissement et la standardisation des normes de qualité et de composition harmonisées pour le pollen d'abeille au niveau national et international pourraient garantir son authenticité et assurer sa qualité ouvrant ainsi la voie à une reconnaissance accrue et à une valorisation optimale de ses propriétés dans les filières alimentaires.
- Des études *in vivo* pourraient évaluer et confirmer son efficacité dans le traitement des infections bactériennes et virales. Il serait pertinent également d'approfondir les études pour comprendre l'impact des conditions de l'environnement sur la composition du pollen en comparant des échantillons de différentes régions et même de différents pays.
- Le développement et la commercialisation des produits additionnés de pollen pourrait répondre à la demande croissante du marché pour des produits de qualités et sains.
- Evaluation de l'impact du pollen à travers des essais cliniques pour mieux établir ce produit comme un complément alimentaire ou un traitement alternatif.

L'interaction des différents aspects de ces perspectives à savoir les aspects médicinal, environnemental et commercial, pourrait à la fois enrichir la connaissance scientifique et contribuer à des innovations bénéfiques pour la santé humaine et pour l'industrie.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Aabed, K., Shafi Bhat, R., Moubayed, N., Al-Mutiri, M., Al-Marshoud, M., Al-Qahtani, A., & Ansary, A. (2019).** Ameliorative effect of probiotics (*Lactobacillus Paracasei* and Protexin®) and prebiotics (Propolis and Bee Pollen) on clindamycin and propionic acid-induced oxidative stress and altered gut microbiota in a rodent model of autism. *Cellular and Molecular Biology*, 65: 1–7.
- Abd Alla, A. E., & Salem, R. A. (2020).** Impact of storage period on different types of bee pollen pigments. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 11(1): 9–13.
- Abd Elhamid, A. M., & Elbayoumi, M. M. (2017).** Influence of bee pollen on the bioactive behavior, sensory and physicochemical properties of white cheese made from camel and cow milk mixture. *Journal of food and dairy science*, 8 (11): 419 – 424.
- Abdelnour, S.A., Abd El-Hack, M.E., Alagawany, M., Farag, M.R., & Elnesr, S.S. (2019).** Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103: 477–484.
- Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Koduru, S., Masika, P.J., & Afolayan, A.J. (2009).** Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 9: 21.
- Afsharpour, F., Javadi, M., Hashemipour, S., & Koushan, Y. (2019).** Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Complementary Therapies in Medicine*, 43: 283–288.
- Alimoglu, G., Guzelmeric, E., Isil Yuksel, P., Celik, C., Deniz, I., & Yesilada, E. (2021).** Monofloral and polyfloral bee pollens: Comparative evaluation of their phenolics and bioactivity profiles. *LWT - Food Science and Technology*, 142: 110973.
- Aliyazıcıoğlu, R., Sahin, H., Erturk O., Ulusoy, E., & Kolayli, S. (2013).** Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*, 16: 277–287.
- Almeida-Muradian, L B., Pamplona, L C., Coimbra, S., & Barth, O. M. (2005).** Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 105–111.
- Altunatmaz, S. S., Tarhan, D., Aksu, F., Barutçu, U. B., & Or, M. E. (2017).** Mineral element and heavy metal (cadmium, lead and arsenic) levels of bee pollen in Turkey. *Food Science and Technology*, 37(1): 136-141.
- 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 and Chemical Toxicology*, 48(8–9): 2490–2499.

- Amorim-Carrilho K.T., Cepeda A., Fente C., & Regal P. (2014).** Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56: 49–73.
- Anderson, K.E., Carroll, M.J., Sheehan, T., Lanan, M.C., Mott, B.M., Maes, P., & Corby Harris, V. (2014).** Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, 23: 5904–5917.
- Anderson, O.M., & Jordheim, M. (2006).** The anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA; pp. 472-551.
- 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. *LWT-Food Science and Technology*, 111: 869–875.
- Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Narciso, V., Tenore, G., & Novellino, E. (2018).** Resveratrol as a novel anti-herpes simplex virus nutraceutical agent: an overview. *Viruses*, 10: 473.
- Ares, A.M.; Valverde, S.; Bernal, J.L.; Nozal, M.J.; & Bernal, J. (2018).** Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147: 110–124.
- Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998).** Structure– activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24: 1355–1363.
- Aruoma, O.I., Bajorun, T., & Jen, L.S. (2003).** Neuroprotection by bioactive components in medicinal and Food plant extracts. *Mutation Research*, 544: 203-215.
- Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortáñez-Moroyoqui, P., López Cervantes , J., & Rodríguez-Ramírez, R. (2013).** Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5: 2916-2924.
- Aslan, C. E., Liang, C. T., Galindo, B. (2016).** The role of honey bees as pollinators in natural areas. *Natural Areas Journal*, 36(4): 478-488.
- Atsalakisa, E., Chinoua, I., Makropouloua, M., Karabourniotib, S., & Graikoua, K. (2017).** Evaluation of phenolic compounds in *Cistus creticus* bee pollen from Greece. Antioxidant and antimicrobial properties. *Natural Product Communications*, 12 (11): 1813 – 1816.
- Aylanc, V., Falcao, S. I., Ertosun, S., & Vilas-Boas, M. (2021).** From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 109: 464–481.

- Aylanc, V., Larbi, S., Calhelha, R., Barros, L., Rezouga, F., Rodríguez-Flores, M., Seijo, M., Ghouizi, A., Lyoussi, B., Falcão, S., & Vilas-Boas, M. (2023). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of mono- and polyfloral Moroccan bee pollen by characterizing phenolic and volatile compounds. *Molecules*, 28: 835-855.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., 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.
- Bakchiche, B., Kızılpinar Temizer, I., Güder, A., Gençay Çelemlı, Ö., Çiftçi Yegin, S., Bardaweel, S K., & Ghareeb, M. A. (2020). Chemical composition and biological activities of honeybee products from Algeria. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(2): 93-103.
- Bakour, M., Laaroussi, H., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Ousaaıd, D., Teixeira, J. A., & Lyoussi, B. (2022). Exploring the palynological, chemical, and bioactive properties of non-studied bee pollen and honey from Morocco. *Molecules*, 27: 5777-5796.
- Barene, I., Daberte, I., & Siksna, S. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medkinos teorija ir praktika – T*, 21: 16–22.
- Basista, K., Filipek, B., & Sodzawiczny, K. (2012). Bee pollen allergy in Polish beekeepers and their families. *Advances in Dermatology & Allergology/Postepy Dermatologii i Alergologii*, 29 (5): 343–347.
- Barut, B., Barut, E. N., Engin, S., Özel, A., & Sezen, F.S. (2019). Investigation of the antioxidant, α - glucosidase inhibitory, anti-inflammatory, and DNA protective properties of *Vaccinium arctostaphylos* L. *Turkish Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 16(2): 175-183.
- Barut, E. N., Barut, B., Engin, S., Yıldırım, S., Yaşar, A., Turkis, S., Özel, A., & Sezen, F. S. (2017). Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turkish Journal Of Biochemistry*, 42: 493-502.
- Barut, B., & Demirbaş Ü. (2020). Synthesis, anti-cholinesterase, α -glucosidase inhibitory, antioxidant and DNA nuclease properties of non-peripheral triclosan substituted metal-free, copper(II), and nickel(II) phthalocyanines. *Journal of Organometallic Chemistry*, 923, 121423.
- Bathe, PK., & Singh N. (1999). A comparison between *Helianthus annus* and *Eucalyptus lanceolatus* Honey. *Food Chemistry*, 67: 389-397.
- Belhamra, Z., Harzallah, D., Naili, O., & Belhadj, H. (2016). probiotic potential of lactobacillus strains isolated from fresh bee pollen. *Der Pharmacia Lettre*, 8: 357–365.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 299: 15–27.

- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005).** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2) : 185-191.
- Berridge, M., & Tan, A. (1993).** Caractérisation de la réduction cellulaire du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) : localisation subcellulaire, dépendance au substrat et implication du transport d'électrons mitochondriaux en réduction MTT. *Archives de Biochimie et de Biophysique*, 303(2): 474-482.
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklauss, R., Müller, M., Schrenk, D., & Weber, P. (2009).** Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25: 1202–1205.
- Bleha, R., Shevtsova, T.V., Živčáková, M., Korbářová, A., Ježková, M., Saloň, I., Brindza, J., & Synytsya, A. (2021).** Spectroscopic discrimination of bee pollen by composition, color, and botanical origin. *Foods*, 10 (8): 1682.
- Bobis, O., Marghitas, L.A., Dezmirean, D., Morar, O., Bonta, V., & Chirila, F. (2010).** Quality parameters and nutritional value of different commercial bee products. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies*, 67: 91–96.
- Bogdanov, S. (2016).** Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health. *Bee Product Science*, 20–350.
- Bogdanov, S. (2017).** The pollen book. In pollen: collection, harvest, composition, quality; Chapter 1; Bogdanov, S.Ed.; Bee Product Science: Muehlethurnen, Switzerland.
- Boligon, A. A., Machado, M. M., & Athayde, M. L. (2014).** Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal Chemistry*, 4 (7): 517-522.
- Borges, F., Roleira, F., Milhanes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005).** Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: Occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 887–916.
- Borycka, K., Grabek-Lejko, D., & Kasprzyk, I. (2016).** Antioxidant and antibacterial properties of commercial bee pollen products. *Journal of Apicultural Research*, 54(5): 491-502.
- Boulfous, N., Belattar, H., Ambra, R., Pastore, G., & Ghorab, A. (2025).** Botanical origin, phytochemical profile, and antioxidant activity of bee pollen from the Mila region, Algeria. *Antioxidants*, 14(3): 291-308.
- Bridi, R., Echeverría, J., Larena, A., Nuñez Pizarro, P., Atala, E., Costa De Camargo, A., Won Young, O., Shahidi, F., Garcia, O., Ah-Hen, K. S., & Montenegro, G. (2022).** Honeybee pollen from southern chile: phenolic profile, antioxidant capacity, bioaccessibility, and inhibition of DNA damage. *Frontiers in pharmacology*, 13: 775219.
- Bruneau, E. (2012).** Pollen: Texte & photos. *fiche technique*. 15-16.
- Bruneau, E.(2021).** Récolte du pollen. *Abeilles & cie*, 205 : 12-16.

- Buchmann, S.L., Nabhan, G.P. (1996).** The forgotten Pollinators. Island Press, Washington, D.C. Shearwater Books, Coverlo, California. pp 320.
- Bunte, K., Hensel, A., & Beikler, T. (2019).** Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: A systematic review of *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* studies. *Fitoterapia*, 132: 30–39.
- Campbell, N., & Reece, J. (2004).** *Biologie*, 2edn. De Boeck université, Bruxelles.
- Campos, M., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Carpes, S. T., Mourão, G. B., De Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009).** Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee-pollen from Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12: 220–229.
- Campos, M., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio C., & Ferreira F. (2008).** Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47: 156–163.
- Campos, M.G.R., Frigerio, C., Lopes, J., Bogdanov, S. (2010).** What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2 (4): 131 – 144.
- Campos, M.G., Webby, R.F., Markham, K.R., Mitchell, K.A., & Da Cunha, A.P. (2003).** Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 742-745.
- Carpes, S. T. (2008).** Study of chemical and biological characteristics of *Apis mellifera* of da Região Sul do Brasil. Dissertation. Thesis presented in postgraduate program in Food Technology. Rio de Janeiro. Technology sector of the federal university of Parana.
- Carpes, T S., Beghini, R., De Alencar, S. M., Masson, M. L. (2007).** Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6): 1818-1825.
- Carpes, S., De Alencar, S., Cabral, I., Oldoni, T., Mourao, G. B., Haminiuk, C., Da Luz, C.F.P., & Masson, M.L. (2013).** Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CyTA - Journal of Food*, 11(2): 150–161.
- Carpes, S. T., Mourão, G. B., De Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009).** Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee-pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12: 220–229.
- Caruso, F., Incerpi, S., Pedersen, J., Belli, S., Kaur, S., & Rossi, M. (2022).** Aromatic polyphenol π - π interactions with superoxide radicals contribute to radical scavenging and can make polyphenols mimic superoxide dismutase activity. *Current Issues in Molecular Biology*, 44: 5209 - 5220.
- Chen, X., Wu, R. Z., Ren, Z. M., Tong, Y. L., Chen, S., Yang, F., & Dai, G. H. (2020).** Regulation of microRNAs by rape bee pollen on benign prostate hyperplasia in rats. *Andrologia*, 52(1): 1-6.

- Cheng, I. F., & Breen, K. (2000).** On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *BioMetals*, 13: 77–83.
- Chiamenti, L., Da Silva, P. F., Schallemburger, K., Demoliner, M., Rigotto, C., & Fleck, J. D. (2019).** Cytotoxicity and antiviral activity evaluation of *Cymbopogon* spp hydroethanolic extracts. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55:e18063.
- Chiorcea-Paquim, A. M., Enache, T. A., De Souza Gil, E., & Oliveira-Brett, A. M. (2020).** Natural phenolic antioxidants electrochemistry: towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19: 1680–1726.
- Choi, E. M. (2007).** Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. *Phytotherapy Research*, 21: 471–475.
- Ciocarlan, A., Shvetsova, M., Zinicovscaia, I., Chaligava, O., Grozdov, D., Aricu, A., & Ciocarlan, N. (2024).** Mineral Composition of Fifteen Species of Asteraceae Family Growing in the Republic of Moldova Using Neutron Activation Analysis. *Agronomy*, 14(10): 2387-2402.
- Ciurzynska, A., & Lenart, A. (2011).** Freeze-drying-application in food processing and biotechnology-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61: 165–171.
- CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline.** CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2004.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed.,** CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement; CLSI Document M100–S17; Clinical Laboratory Standard Institute: Wayne, PA, USA, 2007.**
- Collin, S., Vanhavre, T., Bodart, E., & Bouseta, A. (1995).** Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 444 - 448.
- Conte, P., Del Caro, A., Balestra, F., Piga, A., & Fadda, C. (2018).** Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. *LWT-Food Science and Technology*, 90: 1–7.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., & Maes, L. (2006).** Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* proof-of concept. *Journal of Ethnopharmacology*, 106 (3): 290-302.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., & Dyatmiko, W. (1997).** Iridoid Glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*, Helvetica. *Chimica acta*, 80: 1144-1152.

De Clercq E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of The Pan American Society For Clinical Virology*, 30(2): 115–133.

deGraft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., & Nowak, D. (2007). Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100 (5): 345–352.

De Jesus, N.Z., de Souza Falcão, H., Gomes, I.F., de Almeida Leite, T.J., de Moraes Lima, G.R., Houtt, J.R.S., & Paya, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*, 27: 713–722.

De Jesus, N.Z.T., Falcão, H.S., Gomes, I.F., Leite, T.J.A., Lima, G.R.M., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., Silva, M.S.D., Athayde-Filho, P.F., & Batista, L.M. (2012). Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 3203–3228.

De la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Gonzalez-Aguilar, G. A. (2010). Fruit and vegetable phytochemicals-chemistry, nutritional value, and stability (1st.ed.). Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell.

De Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., de Freitas, A. d. S., Barth, O. M., & De Almeida-Muradian L.B. (2018). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, 25: 91–110.

De-Melo, A., Estevinho, M., Sattler, J., De Souza, B., Freitas, A., Barth, O., & Almeida-Muradian, L. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *Lwt - Food Science and Technology*, 65: 808-815.

De-Melo, A.A.M., & de Almeida-Muradian, L.B. (2017). Chemical composition of bee pollen. in bee products-chemical and biological properties; Alvarez-Suarez, J.M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 221–259.

Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 4303–4309.

De Oliveira, R. C., do Nascimento Queiroz, S. C., da Luz, C. F. P., Porto, R. S., & Rath, S. (2016). Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere*, 163: 525–534.

Derochette, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Neven, P., & Serteyn, D. (2013). Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 201: 49–57.

Di Nunzio, M., Valli, V., Tomás-Cobos, L., Tomás-Chisbert, T., Murgui-Bosch, L., Danesi, F., & Bordonni, A. (2017). Is cytotoxicity a determinant of the different *in vitro* and *in vivo* effects of bioactives?. *BMC Complementary and Alternative*, 17 (1): 453.

- Dias, L. G., Tolentino, G., Pascoal, A., & Estevinho, L. M. (2016).** Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 55 (5): 357–365.
- Didaras, N.A., Karatasou, K., Dimitriou, T.G., Amoutzias, G.D., & Mossialos, D. (2020).** Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: state of the art and future perspectives. *Antibiotics*, 9 (11): 811.
- Dumitru, C. D., Neacsu, I. A., Grumezescu, A. M., & Andronescu, E. (2022).** Bee-derived products: chemical composition and applications in skin tissue engineering. *Pharmaceutics*, 14(4): 750-779.
- Durazzo, A., Turfani, V., Narducci, V., Azzini, E., Maiani, G., & Carcea, M. (2019).** Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9): 2221-2243.
- El Ghouizi, A., Bakour, M., Laaroussi, H., Ousaaïd, D., El Meniy, N., Hano, C., & Lyoussi, B. (2023).** Bee pollen as functional food: insights into its composition and therapeutic properties. *Antioxidants*, 12(3): 557.
- El Ghouizi, A., El Meniy, N., Bakour, M., & Lyoussi, B. (2021).** Moroccan monofloral bee pollen: botanical origin, physicochemical characterization, and antioxidant activities. *Journal of Food Quality*, 2021: 1-10.
- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg- El-Seedi, H., Eid, N., El-Wahed, A., Rateb, M., Afifi, H., Algethami, A., Zhao, C., Naggar, Y., Alsharif, S., Tahir, H., Xu, B., Wang, K., & Khalifa, S. (2022).** Honey bee products: preclinical and clinical studies of their anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Frontiers Nutrition*, 8, 761267.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Liman, B., Altinordulu, S., & Sarica, Z.S. (2009).** Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 931–937.
- Erkmen, O., & Özcan, M.M. (2008).** Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *The Journal of Medicinal Food*, 11: 587–592.
- Eshete, Y. (2021).** Bee pollen production, physicochemical and bio-functional properties, and safety utilization: a review. *Nutrition Research and Food Science Journal*, 4(1): 1–10.
- Farag, S., & El-Rayes, T. (2016).** Effect of bee-pollen supplementation on performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11: 168–177.
- Fatrcova-Sramkova, K., Nôžková, J., Kacáňiová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., & Stricík, M. (2013).** Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health*, 48: 133–138.

- Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012).** Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17: 8359-8377.
- Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008).** Salinity tolerance in halophytes. *The New phytologist*, 179(4): 945–963.
- Fluri, P., Keller, I., & Imdorf, A. (2007).** Consommation de pollen et développement de la colonie chez les abeilles mellifères. *Revue Suisse D'apiculture*, 11(12): 21-28.
- Friedman, J., & Barrett, S. C. (2009).** Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of Botany*, 103: 1515–1527.
- Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008).** Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research, Bee World*, 47: 156–163.
- Fuenmayor, C., Zuluaga, C. D., Díaz, C. M., Marta Quicazán de, C. M., Cosio, M., & Mannino, S. (2014).** Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *La Revista Cordoba*, 19 (1): 4003-4014.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000).** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8): 3597-3604.
- George Kerry, R., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018).** Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26: 927–939.
- Gercek, C. Y., Celik, S., & Bayram, S. (2022).** Screening of plant pollen sources, polyphenolic compounds, fatty acids and antioxidant/antimicrobial activity from bee. *Molecules*, 27: 117-130.
- Ghosh, S., & Jung, C. (2017).** Nutritional value of bee-collected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus sp.* (Fagaceae). *Journal of Asia- Pacific Entomology*, 20(1): 245–251.
- Gordo, B., & Mostafa, N. A. M. (2021).** *Onopordum* (Asteraceae) in Algeria with special focus on *O. ambiguum*. *Flora Mediterranea*, 31: 223-232.
- Gout, J. (2008).** 250 réponses aux questions d'un ami des abeilles (Le gerfaut, 2008).
- Gulcin, I., & Alwasel, S. H. (2023).** DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11: 2248-2268.
- Güneş Bayir, A., Aksoy, A.N., & Koçyiğit, A. (2019).** The importance of polyphenols as functional food in health. *Bezmialem Science*, 7(2): 157-163.
- Gungor, N., & Sengul, M. (2008).** Antioxidant activity, total phenolic content and selected physicochemical properties of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits. *International Journal of Food Properties*, 11: 44–52.

- Guo, H., Kuang, Z., Zhang, J., Zhao, X., Pu, P., & Yan, J. (2019).** The preventive effect of *Apocynum venetum* polyphenols on D-galactose-induced oxidative stress in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19: 557 - 568.
- Gupta, S. C., Kim, J. H., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2010).** Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29 (3): 405–434.
- Habryka, C., Kruczek, M., & Drygas, B. (2016).** Bee products used in apitherapy. *World Scientific News*, 48: 254-258.
- Halbritter, H., Ulrich, S., Grimsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., & Frosch-Radivo, A. (2009).** Pollen Terminology: An Illustrated Handbook; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Herken, E. N., Erel, O., Guzel, S., Celik, H., & Ibanoglu, S. (2009).** Total antioxidant, phenolic compounds and total oxidant status of certified and uncertified Turkey's honeys. *International Journal of Food Properties*, 12: 461–468.
- Hoover, S. E., & Ovinge, L. P. (2018).** Pollen collection, honey production, and pollination services: managing honey bees in an agricultural setting. *Journal of Economic Entomology*, 111(4): 1509–1516.
- Huang, R., Wu, W., Shen, S., Fan, J., Chang, Y., Chen, S., & Ye, X. (2018):** Evaluation of colorimetric methods for quantification of citrus flavonoids to avoid misuse. *Analytical Methods*, 10: 2575-2587.
- Hudz, N., Brindza, J., Korzeniowska, K., Wieczorek, PP., Schubertová, Z., & Ivanišová, E. (2017).** Methods of the investigation of bee pollen and bee bread. *Journal of botany*, 1 (14): 87-93.
- Human, H & Nicolson, S.W. (2006).** Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (*Asphodelaceae*). *Phytochemistry*, 67: 1486–1492.
- Ilie, C. I., Oprea, E., Geana, E. I., Spoiala, A., Buleandra, M., Gradisteanu Pircalabioru, G., Badea, I. A., Fica, D., Ecaterina Andronescu, E., Fica A., & Ditu, L. M. (2022).** Bee Pollen extracts: chemical composition, antioxidant properties, and effect on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Antioxidants*, 11(959): 1-29.
- Ishikawa, Y., Tokura, T., Nakano, N., Hara, M., Niyonsaba, F., Ushio, H., Yamamoto, Y., Tadokoro, T., Okumura, K., & Ogawa, H. (2008).** Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degradation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Medicinal Food*, 11(1): 14–20.
- Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H. (2009).** Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9: 9-45.
- Jaya, F., Rosyidi, D., Radiati, L. E., Minarti, S., Mustakim, L., Susilo, A., Muslimah, R. H., & Husolli, M. (2020).** Antioxidant activity and microbiological quality of bee bread collected from three different species honey bee. *Earth and Environmental Science*, 475, 012033.

Jayanthi, P., & Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (3): 126- 128.

Jiang, N., Doseff, A.I, & Grotewold, E. (2016). Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5(2): 27.

Jiménez, N., Esteban-Torres, M., Mancheño, J.M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2014). Tannin degradation by a novel tannase enzyme present in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 2991–2997.

Jovanovic, S. V., Steenken, S., Hara, Y., & Simic, M. G. (1996). Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions*, 2: 2497–2504.

Kacaniova, M., Vukovic, N., Chlebo, R., Haščík P., Rovná K., Cubon J., Dz'ugan, M., & Pasternakiewicz, A. (2012). The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *The Archives of Biological Sciences*, 64: 927–934.

Kamboj A., Saluja A K ., Kumar, M., & Atri1, P. (2012). Antiviral activity of plant polyphenols. *Journal of Pharmacy Research*, 5(5): 2402-2412.

Karabagias, K. I., Karabagias, V.K., Gatzias, I., & Riganakos, K. A. (2018). Bio-functional properties of bee pollen: the case of bee pollen yoghurt. *Coatings*, 8: 120- 423.

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4): 1567-1574.

Karlson, A. K., & Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 10877-10895.

Keller, A., Danner, N., Grimmer, G., Ankenbrand, M., von der Ohe, K., von der Ohe, W., Rost, S., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2015). Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology*, 17(2): 558–566.

Khalifa, S.A.M., Elashal, M.H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S.G., Nahar, L., Sarker, S.D., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., Abd El-Wahed , A. A., Xiao, J., Omar, H.A., Hegazy, M.F, & El-Seedi HR. (2021). Bee pollen: current status and therapeutic potential. *Nutrients*, 13(6): 1876.

Khalifa, S., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N., Farag, M., Saeed, A., Xiao, J., Zou, X., Khatib, A., Göransson, U., & El-Seedi, H. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97: 300–316.

Khoirunisa, V., Rusydi, F., Kasai, H., Gandaryus, A. G., & Dipojono, H. K. (2016). A first principle study on the interaction between acetylcholinesterase and acetylcholine, and also rivastigmine in alzheimer's disease case. *Journal of Physics: Conference Series*, 739 (1): 012136.

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błazejak, S., Chlebowska-Smigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 170–180.

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błazejak, S., Chlebowska-Smigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71: 170-180.

Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Wojtczuk, M., Roszko, M., Bryła, M., & Trajkovska Petkoska, A. (2023). Recent advances and opportunities related to the use of bee products in food processing. *Food Science & Nutrition*, 11: 4372–4397.

Kizilpınar-Temiz, I., Guder, A., Candan, E., Yolcu, U. (2022). Antioxidant properties, element contents and antimicrobial activities of bee pollen collected by *Apis mellifera* L. in Türkiye. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 20(4), e0506.

Kocot, J., Kielczykowska, M., Luchowska-Kocot, D., Kurzepa, J., & Musik, I. (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018:7074209.

Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8): 711-716.

Komosinska-Vashev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 297425.

Koroglu, A. (2018). Bee pollen and its pharmacological properties. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C-Biology*, 27: 93– 97.

Kostić, A.Ž., Milinčić, D.D., Barać, M.B., Ali Shariati, M., Tešić, Z.L, Pešić, M. B. (2020). The application of pollen as a functional food and feed ingredient-the present and perspectives. *Biomolecules*, 10(1): 84.

Kostić, A. Z., Pešić, M. B., Mosić, M. D., Dojčinović, B. P., Natić, M. M., & Trifković, J. D. (2015). Mineral content of bee pollen from Serbia. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 66(4): 251-258.

Kritchevsky, S. B. (1999). Beta-carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. *Journal of Nutrition*, 129 (1): 5–8.

Krystyjan, M., Gumul, D., Ziobro, R., & Korus, A. (2015). The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 640–646.

Kumar, M., Dahuja, A., Tiwari, S., Punia, S., Tak, Y., Amarowicz, R., Bhoite, A.G., Singh, S., Joshi, S., Panesar, P.S., Prakash Saini, R., Pihlanto, A., Tomar, M., Sharifi-Rad, J., & Kaur, C. (2021). Recent trends in extraction of plant bioactives using green technologies: A review. *Food Chemistry*, 353: 129431.

- Kumar, S., & Pandey, A.K. (2013).** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *World Scientific Journal*, 2013:1–16.
- Laha, R. C., De Mandal, S., Ralte, L., Ralte, L., Kumar, N. S., Gurusubramanian, G., Satishkumar, R., Mugasimangalam, R., & Kuravadi, N.A. (2017).** Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition. *AMB Express*, 7(1): 1–8.
- Lang, D., Tang, M., Hu, J., & Zhou, X. (2019).** Genome-skimming provides accurate quantification for pollen mixtures. *Molecular Ecology Resources*, 19 (6): 1433-1446.
- Lau, P., Lesne, P., Grebenok, R.J., Rangel, J., & Behmer, S.T. (2022).** Assessing pollen nutrient content: a unifying approach for the study of bee nutritional ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 20: 377(1853).
- Le Conte. (2005).** Connaître l'abeille, conduire le rucher. Techniques et documentations. 7^{ème} Ed Lavoisier. Pp : 309 ; 410 ; 482.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekonska, K. (2007).** Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100: 237-240.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007).** In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2(2) : 329–333.
- Louveaux, J. (1990).** Les relations abeilles-pollens, bulletin de la société botanique de France. *Actualités Botaniques*, 137(2) : 121-131.
- Louveaux, J. (1958).** Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L.). *Les Annales de l'Abeille*, 1(3), pp.113-188.
- Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978).** Methods of Melissopalynology. *Bee World*, 59: 139–157.
- Mahmoud, A.M.; Yang, W.; Bosland, M.C. (2014).** Soy isoflavones and prostate cancer: A review of molecular mechanisms. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 140: 116-132.
- Maksimovic, Z., Malenic, D., & Kovacevic, N. (2005).** Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology*, 96: 873-877.
- Malihah Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.K., & Zawawi, N. (2021).** Stingless bee-collected pollen (bee bread): chemical and microbiology properties and health benefits. *Molecules*, 26 (4): 957.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727–747.
- Manetas, Y., & Petropoulou, Y. (2000).** Nectar amount, pollinator visit duration and pollination success in the mediterranean shrub *Cistus creticus*. *Annals of Botany*, 86: 815-820.

- Margaoan, R., Marghitaş, L.A., Dezmirean, D.S., Dulf, F.V., Bunea, A., Socaci, S.A., & Bobiş O. (2014).** Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (27): 6306–6316.
- Margaoan, R., Stranţ, M., Varadi, A., Topal, E., Yücel, B., Cornea-Cipcigan, M., Campos, M.G., & Vodnar, D.C. (2019).** Bee collected pollen and bee bread: bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants (Basel)*, 8 (12): 568-608.
- Martins, M. C. T., Morgano, M. A., Vicente, E., Baggio, S. R., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2011).** Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian states. *Journal of Apicultural Science*, 55(2): 107–116.
- Mauriello, G., De Prisco, A., Di Prisco, G., La Stora, A., & Caprio, E. (2017).** Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PloS One*, 12, e0183208.
- McCallum, J.L., Yang, R., Young, J.C., Strommer, J.N., & Tsao, R. (2007).** Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, 1148: 38-45.
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017).** Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174: 1290–1324.
- Modro, A. F. H., Marchini, L. C., & Moreti, A. C. D. C. C. (2011).** Origem botânica de cargas de pólen de colmeias de abelhas africanizadas em Piracicaba, SP. *Ciencia Rural*, 41(11): 1944-1951.
- Modro, A. F., Silva, I. C., & Luz, C. F. (2009).** Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81 : 281–285.
- Mohammad, S.M., Mahmud-Ab-Rashid, N.K., & Zawawi, N. (2021).** Stingless bee-collected pollen (bee bread): chemical and microbiology properties and health benefits. *Molecules*, 26 (4): 957.
- Mokhtari, M., Ouar, I., Zeghina, I., Tartouga, M., Ghorab, A., & Bahri, L., & Bensouici, C. (2022).** Palynological analysis, phenolic components and anti-inflammatory activity of some bee pollens collected from the northeast region of Algeria. *Uludağ Arıcılık Dergisi Uludağ Bee Journal*, 22 (1): 45-58.
- Moniruzzaman, M., Sulaiman, S., Khalil, M., & Gan, S. (2013).** Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: A comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 138.
- Montenegro-Landívar, M. F., Tapia-Quirós, P., Vecino, X., Reig, M., Valderrama, C., Granados, M., Cortina, J. L., & Saurina, J. (2021).** Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Science of The Total Environment*, 801: 149719.
- Moosbeckhofer, R., & Ulz, J. (1996).** Der erfolgreiche Imker. Graz- Stuttgart.

- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011).** Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1096-1101.
- 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.
- Negrão, A. F., & Orsi, R. O. (2018).** Harvesting Season and Botanical Origin Interferes in Production and Nutritional Composition of Bee Pollen. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 90 (1): 325-332.
- Ng, T., Liu, F., & Wang, Z. (2000).** Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66: 709-723.
- Nicolson, S.W., & Human, H. (2012).** Chemical composition of the ‘low quality’ pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie*, 44 : 144–152.
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012).** Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9): 11173–11187.
- Olczyk, P., Koprowski, R., Kafmierczak, J., Mencner, L., Wojtyczka, R., Stojko, J., Olczyk, K & Komosinska-Vassev, K. (2016).** Bee pollen as a promising agent in the burn wounds treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016: 1-12.
- Olszowy, M. (2019).** What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 144: 135-143.
- Pandey, K.B., & Rizvi SI. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5): 270-8.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001).** Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(5): 1161-1168.
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Nicorescu, V., & Stefan, G. (2017).** Plant polyphenols as antioxidant and antibacterial agents for shelf-life extension of meat and meat products: classification, structures, sources, and action mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6): 1243-1268.
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X. & Estevinho, L.M. (2014).** Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63: 233–239.
- Percie du Sert, P. (2009).** Les pollens apicoles. *Phytothérapie*, 7 :75–82.
- Pereira, R.B., Sousa, C., Costa, A., Andrade, P.B., & Valentão, P. (2013).** Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: synergisms and antagonisms. *Molecules*, 18(8): 8858-8872.

- Pérez-Pérez, E. M., Vit, P., Rivas, E., Sciortino, R., Sosa, A., Tejada, D., & Rodríguez-Malaver, A. J. (2012).** Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos De Nutrición, Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 62 (4): 375-380.
- Perron, N. R., & Brumaghim, J.L. (2009).** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2): 75-100.
- Perron, N. R., Hodges, J. N., Jenkins, M., & Brumaghim, J. L. (2008).** Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry*, 47: 6153–6161.
- Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R. R., & Prasad, L. K. (2015).** A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 4, 75.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S.M., Ramos, M. J., Silva, A. M. S., Fernandes, P. A., & Fernandes, E. (2017).** α - Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32: 1216–1228.
- Prost, J. P. (2005).** La vie sociale des abeilles. *Traité Rustica de l'apiculture*. pp 54 ; 83.
- Qiao, J., Xiao, X., Wang, K., Haubruge, E., Dong, J., & Zhang, H. (2023).** Rapeseed bee pollen alleviates chronic non-bacterial prostatitis via regulating gut microbiota. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 103(15): 7896–7904.
- Qin, F., & Sun, H.X. (2005).** Immunosuppressive activity of pollen typhae ethanol extract on the immune responses in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 102: 424–429.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011).** Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 586–621.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017).** Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20 (2): 1700–1741.
- 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 Radical Biology et Medicine*, 26: 1231-1237.
- Rebiai, A., & Lanez, T. (2012).** Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from Northwest Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 4.:26-37.
- Rebiai, A., Lanez, T., & Belfar, M. L. (2014).** Determination of caffeic acid and gallic acid in Algerian bee pollen by an HPLC method. *Phytochem & Biosub Journal*, 8(03): 190-197.
- Reille, M. (1990).** Leçon de palynologie et d'analyse pollinique. CNRS Paris, p 163.

- Reinisalo, M., Karlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R.O. (2015).** Polyphenol stilbenes: molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 340520.
- Renault-Miskovsky, J., & Marguerie, D. (1992).** Evolution de la végétation sous l'impact humain en armorique, du néolithique aux périodes historiques. *Quaternaire*, 3 (3): 154-155.
- Rimpler, M. (2003).** Von bienen gesammelte blütenpollen: eigenschaften und verwendung. *Ärztzeitschrift Für Naturheilverfahren*, 44 (3): 158–165.
- Rocchetti, G., Castiglioni, S., Maldarizzi, G., Carloni, P., & Lucini, L. (2018).** UHPLC-ESI-QTOF-MS phenolic profiling and antioxidant capacity of bee pollen from different botanical origin. *International Journal of Food Science & Technology*, 54: 335–346.
- Rodríguez-Pólit, C., Gonzalez-Pastor, R., Heredia-Moya, J., Carrera-Pacheco, S.E., Castillo-Solis, F., Vallejo-Imbaquingo, R., Barba-Ostria, C., & Guamán, L.P. (2023).** Chemical properties and biological activity of bee pollen. *Molecules*, 28 (23): 7768.
- Rojo, S., Escuredo, O., Rodríguez-Flores, M.S., & Seijo, M.C. (2023).** Botanical origin of galician bee pollen (northwest Spain) for the characterization of phenolic content and antioxidant activity. *Foods*, 12(2): 294-306.
- Ropars, L., Affre, L., Aubert, M., Fernandez, C., Flacher, F., Genoud, D., Guiter, F., Jaworski, C., Lair, X., Mutillod, C., Nève, G., Schurr, L., & Geslin, B. (2020).** Pollinator specific richness and their interactions with local plant species: 10 years of sampling in mediterranean habitats. *Environmental Entomology*, 49 (4): 947–955.
- Roseiro, L. B., Rauter, A. P., & Serralheiro, M. L. M. (2012).** Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: structural specificity and impact on human disease. *Nutrition and Aging*, 1(2): 99-111.
- Ross, A. C. (2010).** Vitamin A. In *bioactive compounds and cancer*. Springer. pp. 335–356.
- Rzepecka-Stojko, A., Pilawa, B., Ramos, P., & Stojko, J. (2012).** Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by EPR spectroscopy. *Journal of Apicultural Science*, 56 (1): 23-31.
- Rza dkowska, M., Szaco, N. E., Kaczor, A. A., Rajtar, B., Swiatek, L., Polz-Dacewicz, M., & Matosiuk, D. (2016).** Synthesis and antiviral activity of 1-(1,3- disubstitutedimidazolidyn-2-ylidene)-3-ethoxycarbonylmethylurea derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 31: 361- 368.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabala-Dzik, A., Kubina, R., Moździerz, A., & Buszman, E. (2015).** Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, 20: 21732–21749.
- Şahin, F., Koçak, P., Güneş, M. Y., Özkan, İ., Yıldırım, E., & Kala, E. Y. (2019).** In vitro wound healing activity of wheat-derived nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188: 381-394.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 76(2): 270-276.

- Santos, F. A., Bastos, E. M. A. F., Maia, A. B. R., & Silva, A. R. (2015).** Chemical composition and biological activities of the essential oil from the leaves of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Essential Oil Research*, 27(5): 366-371.
- Saral, Ö., Kiliçarslan, M., Şahin, H., Yildiz, O., & Dinçer, B. (2019).** Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43: 441–447.
- Sass-kiss, A., Kiss, J., Mitotay, P., Kerek, M M., & Toth-Markus M. (2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, 38: 1023-1029.
- Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015).** Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil. *Food Research International*, 77: 82–91.
- Sawicki, T., Starowicz, M., Kłębukowska, L., & Hanus, P. (2022).** The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4): 1301-1317.
- Schuh, C., Aguayo, S., Zavala, G., & Khoury, M. (2019).** Exosome-like vesicles in *Apis mellifera* bee pollen, honey and royal jelly contribute to their antibacterial and pro-regenerative activity. *Journal of Experimental Biology*, 222: 1-7.
- Sémah, A. M., & Renault-Miskovsky, J. (2004) :** L'évolution de la végétation depuis deux millions d'années. Artcom & Errance Dumas -Tltoulet imprimeurs, 42000 Saint-Étienne. France.
- Silva Araújo, J., Dechechi Chambó, E., Pereira de Carvalho Costa, M. A., Peixoto Cavalcante da Silva, S. M., Lopes de Carvalho, C. A., & Leticia M. E. (2017).** Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 921-936.
- Silva, M. D., Rosa, C. I. L. F., & Vilas Boas, E. V. B. (2009).** Conceitos e metodos de controle do escurecimentoenzimatico no processamentomínimo de frutas e hortaliças. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba*, 27: 83–96.
- Šimunovic, K., Abramovi, H., Lilek, N., Angelova, M., Podržaj, L., & Smole Možina, S. (2019).** Microbiological quality, antioxidative and antimicrobial properties of Slovenian bee pollen. *AGROFOR*, 4: 82–92.
- Singla, R.K., Dubey, A.K., Garg, A., Sharma, R.K., Fiorino, M., Ameen, S.M., Haddad, M.A., & Al-Hiary, M. (2019).** Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 102(5): 1397-1400.
- Singla, R. K., Chandel, S., & Kumar, M. (2019).** Potential health benefits of flavonols: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9): 3971–3981.

- Sipos, L., Végh, R., Bodor, Z., Zaukuu, J. Z., Hitka, G., Bázár, G., & Kovacs, Z. (2020).** Classification of Bee Pollen and Prediction of Sensory and Colorimetric Attributes-A Sensometric Fusion Approach by e-Nose, e-Tongue and NIR. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(23): 6768-6789.
- Smith, J. K., & Williams, L. M. (2020).** Influence of botanical origin on phenolic content of bee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*, 64(2): 45-52.
- Soares de Arruda, V. A., Viera dos Santos, A., Sampaio, D. F., Araujo, E. S., De Castro Peixoto, A. L., Estevinho, L. M., & De Almeida-Muradian, L. B. (2021).** Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Journal of Apicultural Research*, 60(5): 775–783.
- Şöhretoğlu, D., & Sari, S. (2020).** Flavonoids as alpha-glucosidase inhibitors: Mechanistic approaches merged with enzyme kinetics and molecular modelling. *Phytochemistry Reviews*, 19(5): 1081-1092.
- Sabuncuoğlu, S., & Şöhretoğlu, D. (2012).** Evaluation of antihemolytic and antioxidant activities of *Geranium tuberosum* subsp. *tuberosum* with in vitro models. *Pharmaceutical Biology*, 50 (11): 1374-1379.
- Şöhretoğlu, D., Sari, S., Özel, A., & Barut, B. (2017).** α -Glucosidase inhibitory effect of *Potentilla astracanica* and someisoflavones: inhibition kinetics and mechanistic insights throughin vitro and in silico studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105: 1062-1070.
- Solgajova, M., Nozkova, J., & Kadakova, M. (2014).** Quality of durable cookies enriched with rape bee pollen. *Journal of Central European Agriculture*, 15(1): 24–38.
- Somerville, D. (2012).** Pollen trapping and storage. Primefact 1126. 2nd edition. P4.
- Sun, L., Song, Y., Chen, Y., , Y., Fu, M., & Liu, X. (2020).** The galloyl moiety enhances the inhibitory activity of catechins and theaflavins against α -glucosidase by increasing the polyphenol-enzyme binding interactions. *Food & Function*, 12: 215-229.
- Szczesna, T., & Rybak-Chmielewska, H. (1998).** Some properties of honey bee collected pollen. In polnisch-deutsches symposium salus *Apis Mellifera*, new demands for honey bee breeding in the 21st century. *Pszczelnictwo Zeszyty Naukowe*, 42(2): 79-80.
- Szwajgier, D. (2014).** Anticholinesterase activities of selected polyphenols—a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1): 59-64.
- Tabart, J., Franck, T., Kevers, C., Pincemail, J., Serteyn, D., Defraigne, J.O. (2012).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chemistry*, 131: 1116–1122.
- Taha, E.A., & Al-Kahtani, S. (2020).** Macro- and trace elements content in honeybee pollen loads in relation to the harvest season. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27: 1797–1800.

- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., & Manap, M.Y.A. (2013).** Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44: 717–722.
- Takenouchi, T., & Munekata, E. (1998).** Amyloid beta-peptide-induced inhibition of MTT reduction in PC12h and C1300 neuroblastoma cells: effect of nitroprusside. *Peptides*, 19: 365- 372.
- Tang, L. I., Ling, A. P., Koh, R.Y., Chye, S. M., & Voon, K. G. (2012).** Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(3): 1-10.
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020).** Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98: 82–106.
- Thakur, M., & Nanda, V. (2018).** Exploring the physical, functional, thermal, and textural properties of bee pollen from different botanical origins of India. *Journal of Food Process Engineering*, e12935.
- Thibault, M. (2017).** Le pollen apicole : ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques. Thèse Doctorat en Sciences pharmaceutiques. *Universite de Lorraine France*, p 9.
- Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E., & Tanner, R. J. N. (1972).** Plant proanthocyanidins. part 1. introduction ; the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1(1): 1387.
- Jayanthi, P., & Lalitha, P. (2011).** reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3): 126- 128.
- Truzzi, F., Tibaldi, C., Zhang, Y., Dinelli, G., & D'Amen, E. (2021).** An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (BCS). *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5514.
- Tsao, R.(2010).** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2 : 1231–1246.
- Tutun, H., Kaya, M. M., Usluer, M. S., & Kahraman, H. A. (2021).** Bee pollen: Its antioxidant activity. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 21(1): 119-131.
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S.L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B.G., Emwas, A.H., Jaremko, M. (2020).** Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. *Molecules*, 25(22): 5243-5282.
- Ulusoy, E., & Kolayli, S. (2014).** Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, 38: 73–82.
- Vargas de la Fuente, C., Serrano, S., Talavera, M., & Pérez-Bote, J. L. (2017).** Phenolic composition and antioxidant capacity of the Spanish melissopalynological and botanical origin. *Journal of Apicultural Research*, 56(3): 229-240.
- Velnar, T., Bailey, T., & V. Smrkolj, V. (2009).** “Thewoundhealingprocess: an overview of the cellular andmolecularmechnisms,” *Journal of International Medical Research*, 37 (5): 1528–1542.

- Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010).** Proline metabolism and its implications for plant environment interaction. *American Society of Plant Biologists*, 8, e0140.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M. & García-Parrilla, M.C. (2007).** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1): 230-235.
- Vinnikov, A.I., Oriabinskaia, L.B & Golodok, L.P. (1994):** The effect of antibiotics on staphylococcal respiratory chain enzymes. *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal*, 66: 51-58.
- Wang, R., Dobritsa, A. A. (2018).** Exine and aperture patterns on the pollen surface: their formation and roles in plant reproduction. In J. A. Roberts (Ed.). *Annual Plant Reviews*. John Wiley & Sons.
- Waś, E., Szczesna, T., Rybak-Chmielewska, H., Teper, D., & Jaśkiewicz, K. (2017).** Application of HPLC-DAD technique for determination of phenolic compounds in bee pollen loads. *Journal of Apicultural Science*, 61(01): 153-162.
- Willmer, P. (2011).** Pollination and floral ecology. Princeton University Press, p771.
- Winston, M. L. (1987).** The biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006).** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99(4): 775-783.
- Worek, F., Eyerb, P., & Thiermanna, H. (2012):** Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Testing and Analysis*, 4: 282–291.
- Wu, Y.D., & Lou, Y.J. A. (2007).** Steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy Research*, 21: 1087–1091.
- Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013).** Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8): 818-836.
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013).** Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3): 708–718.
- Yeh, C.T., & Yen, G.C. (2006).** Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in 7 rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *Journal of Nutrition*, 136: 11-15.
- Yerlikaya, O. (2014).** Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo*, 64(4): 268–279.
- Yim, S., Kim, H., Park, S., Kim, J., Williams, D., Jung, D., & Lee, I. (2012).** Cytotoxic caffeic acid derivatives from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia*. *Archives of Pharmacal Research*, 35 (9): 1559–1565.

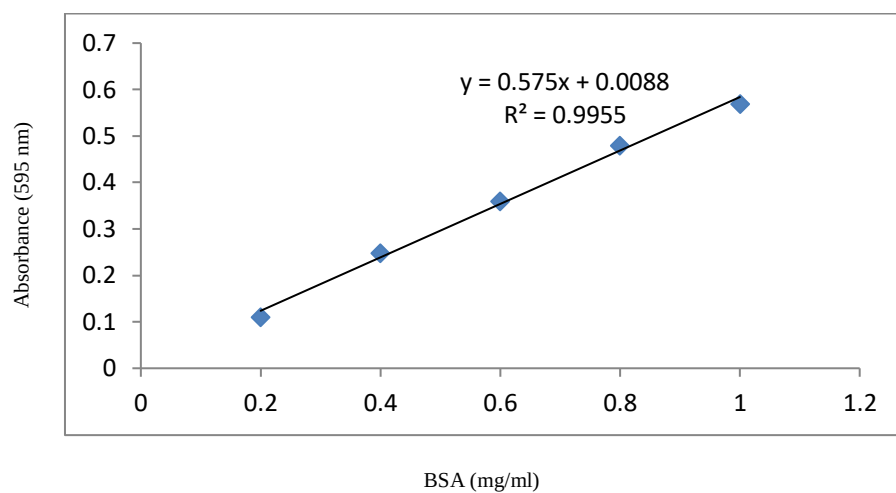
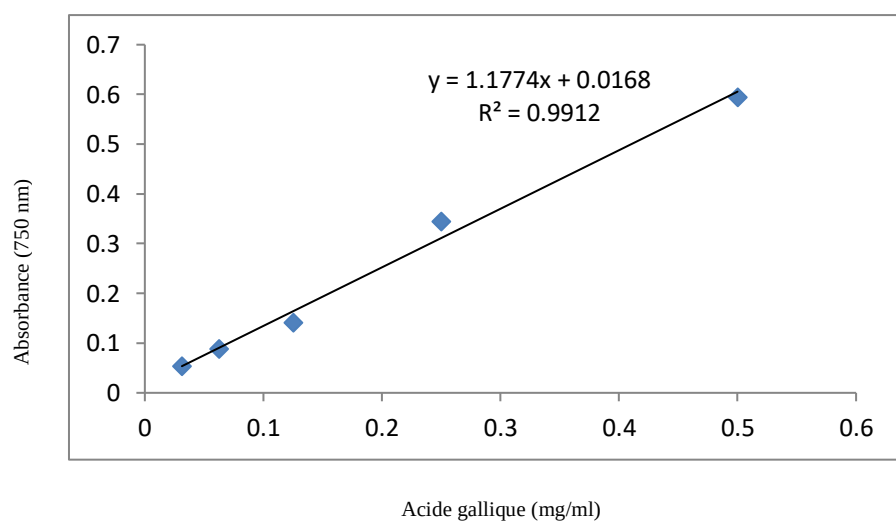
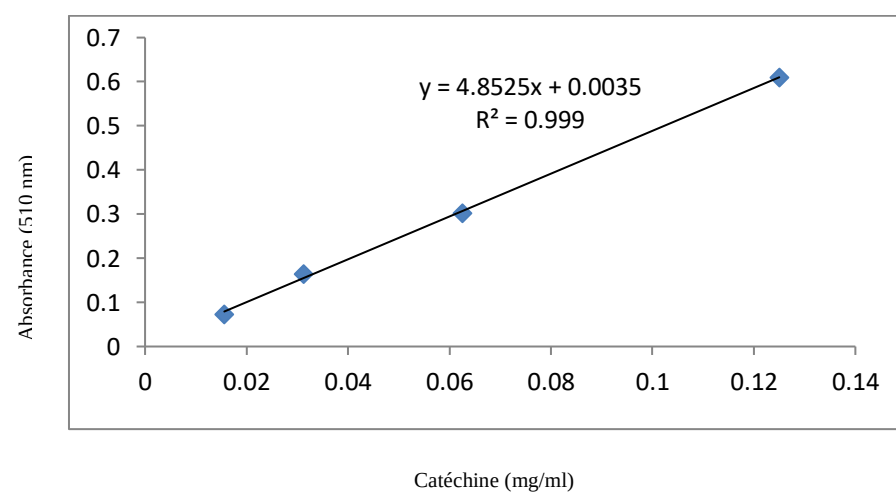
Zhang, X., Li, G., Wu, D., Yu, Y., Hu, N., Wang, H., & Wu, Y. (2020). Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase. *Food & Function*, 11(1): 66-82.

Zhang, Y., Yang, F., Jamali, M., & Peng, Z. (2016). Antioxidant enzyme activities and lipid oxidation in rape (*Brassica campestris* L.) bee pollen added to salami during processing. *Molecules*, 21: 1439-1442.

Zulkefli, N., Zahari, C., Sayuti, N., Kamarudin, A., Saad, N., Hamezah, H., Bunawan, H., Baharum, S., Mediani, A., Ahmed, Q., Ismail, A., & Sarian, M. (2023). Flavonoids as potential wound-healing molecules: emphasis on pathways perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 24: 4607- 4636.

Zuluaga, C., Serrato, J., & Quicazan, M. (2015). Chemical, nutritional and bioactive characterization of colombian beebread. *Journal of Chemical Engineering Transactions* 43: 175-180.

Annexes

Annexe 1 : Courbes d'étalonnages des dosages des protéines et des antioxydants.**Figure 1:** Courbe d'étalonnage des protéines.**Figure 2:** Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux.**Figure 3:** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

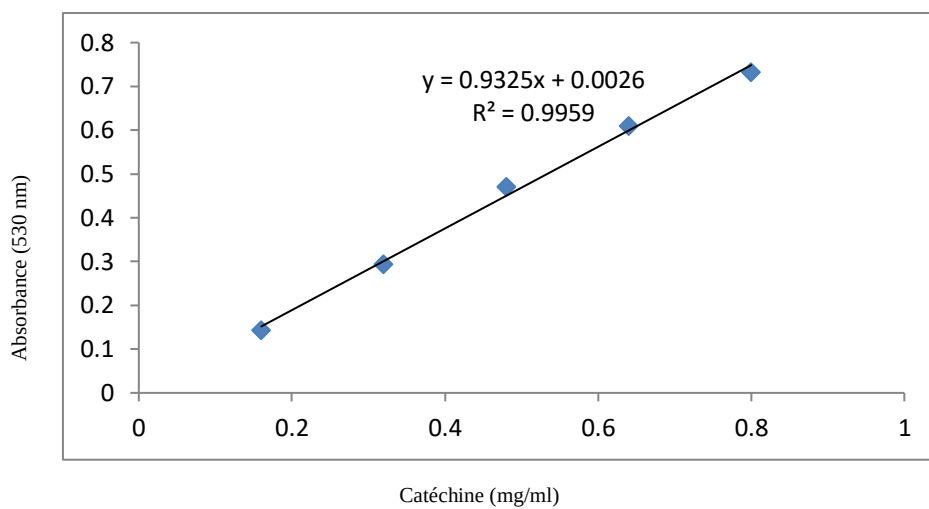


Figure 4: Courbe d'étalonnage des proanthocyanidines.

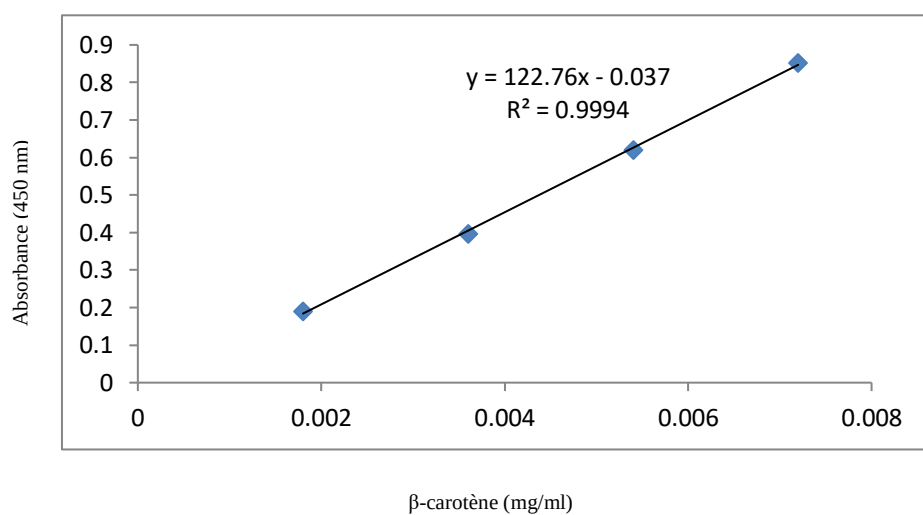
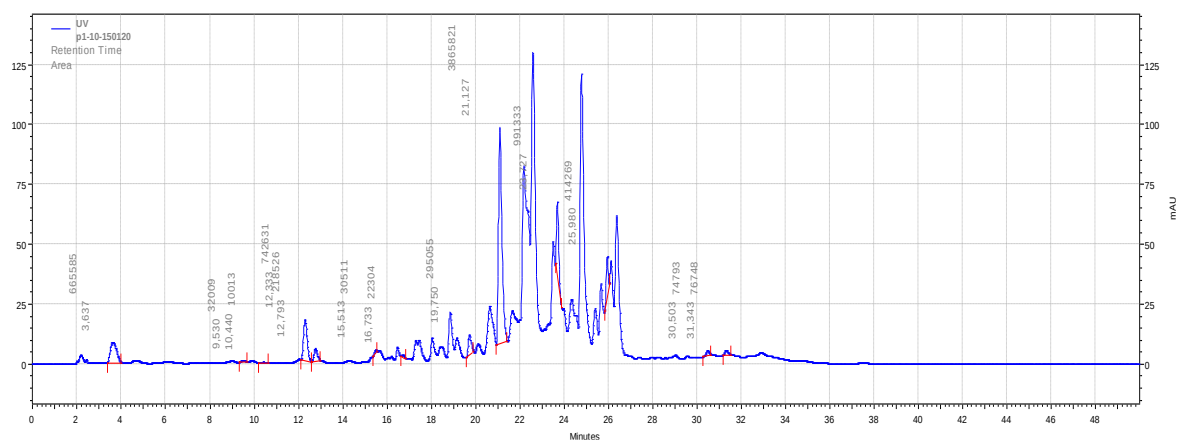
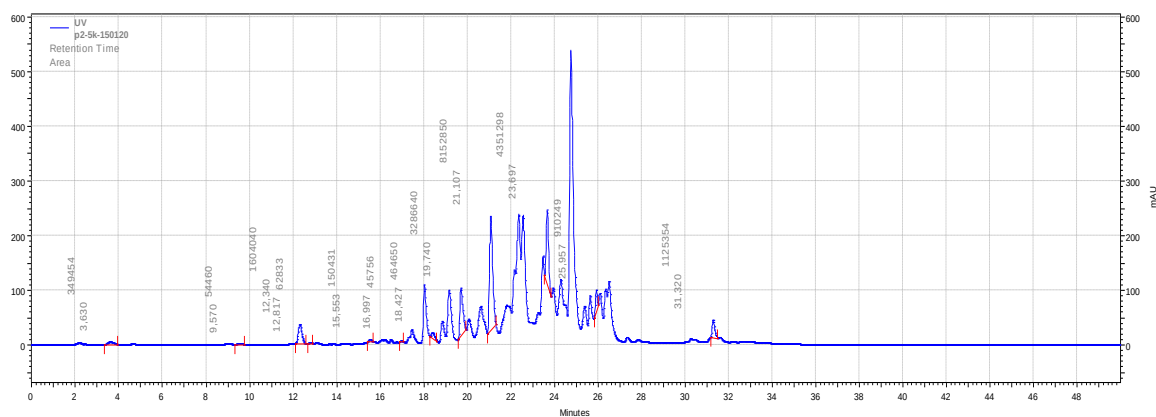


Figure 5: Courbe d'étalonnage des caroténoïdes.

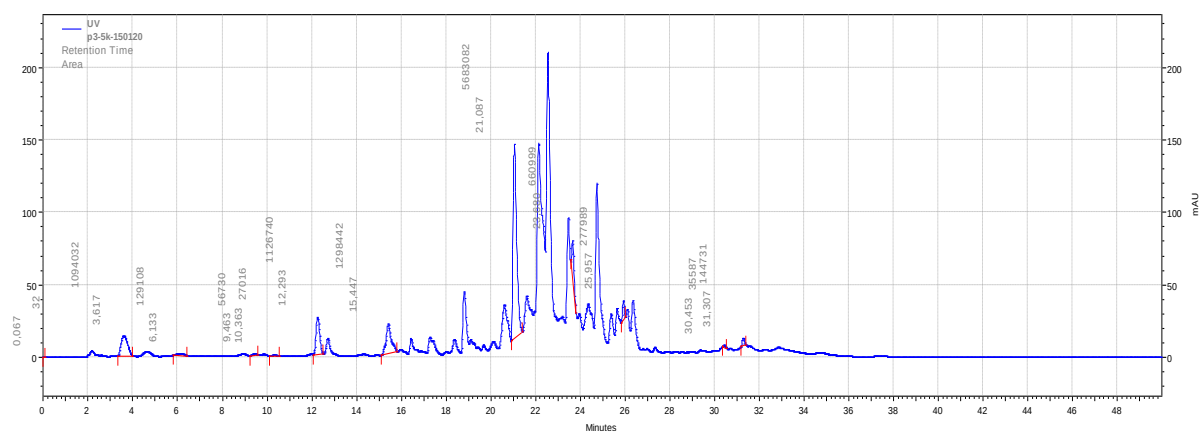
Annexe 2: Chromatogrammes d'analyse par HPLC-UV du contenu phénolique des échantillons de pollen d'abeille.



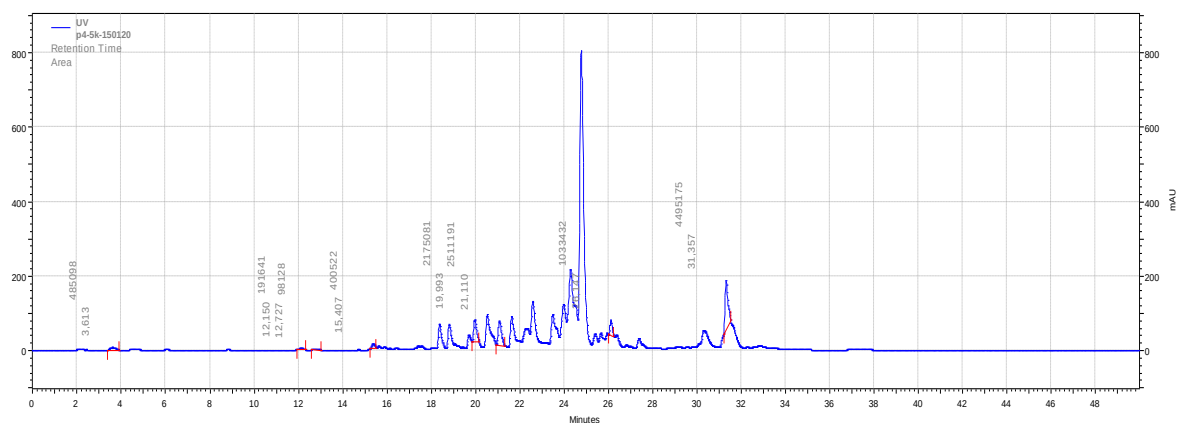
P1



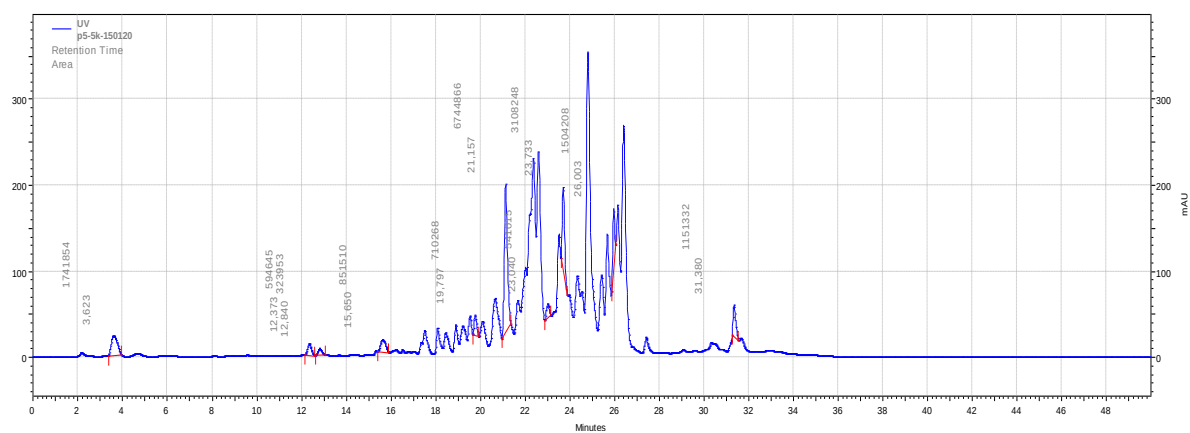
P2



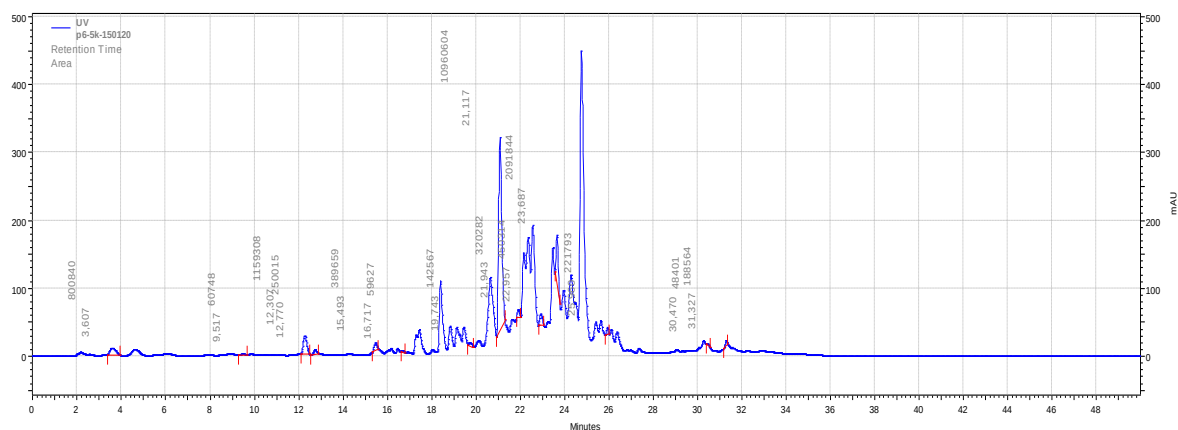
P3



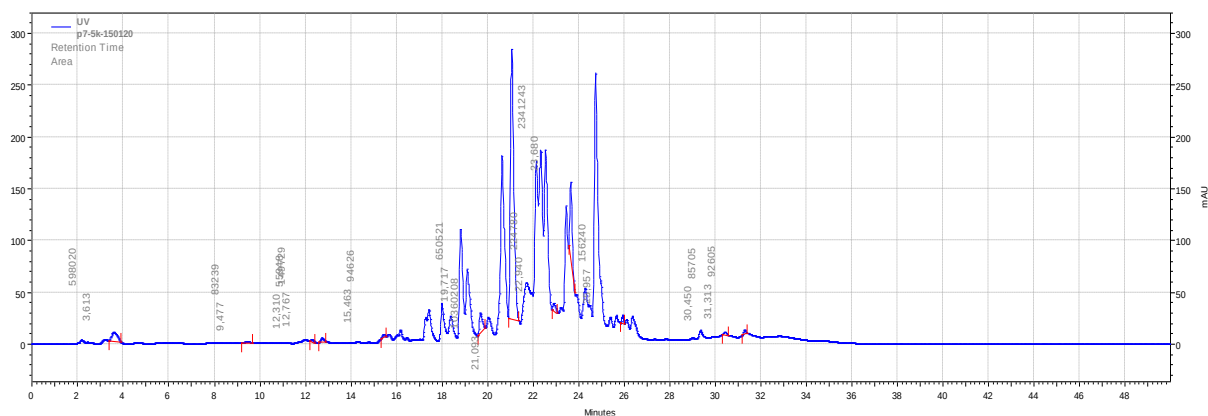
P4



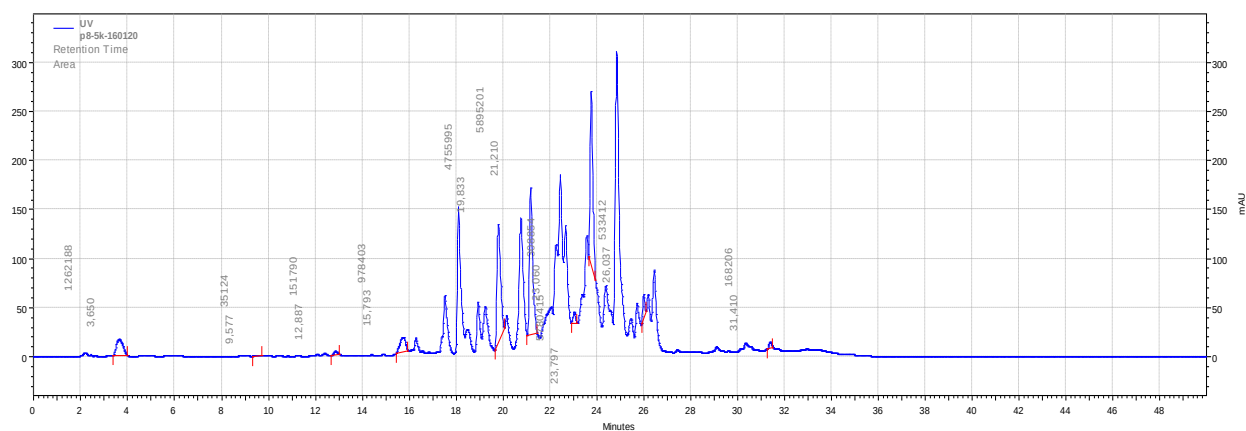
P5



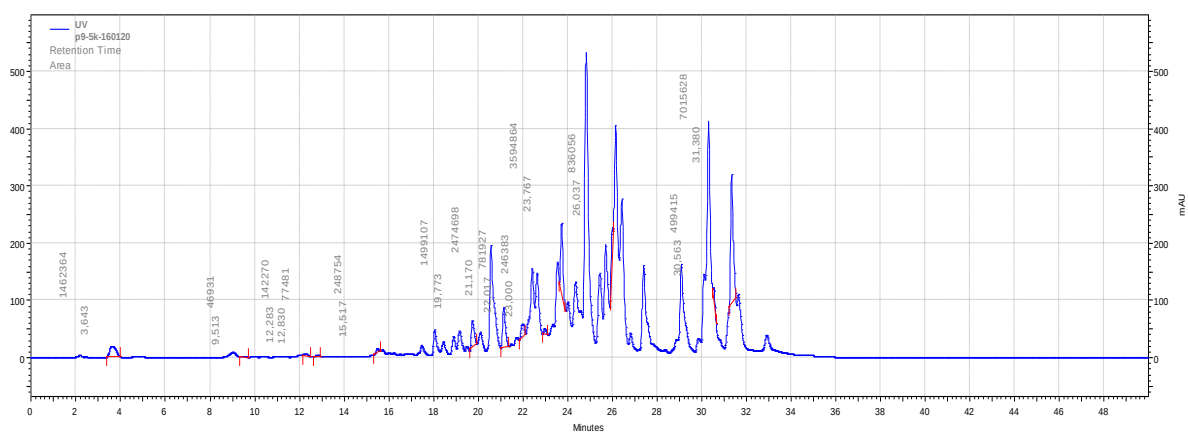
P6



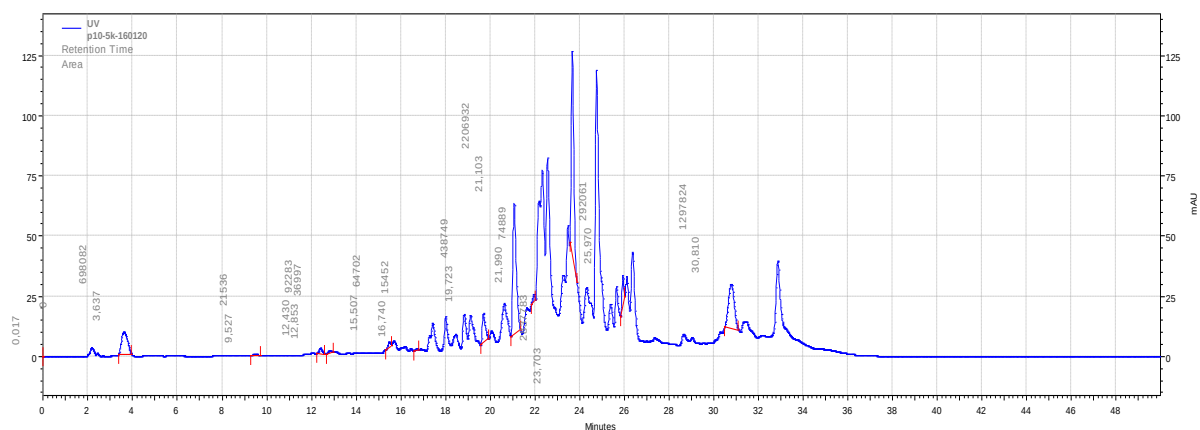
P7



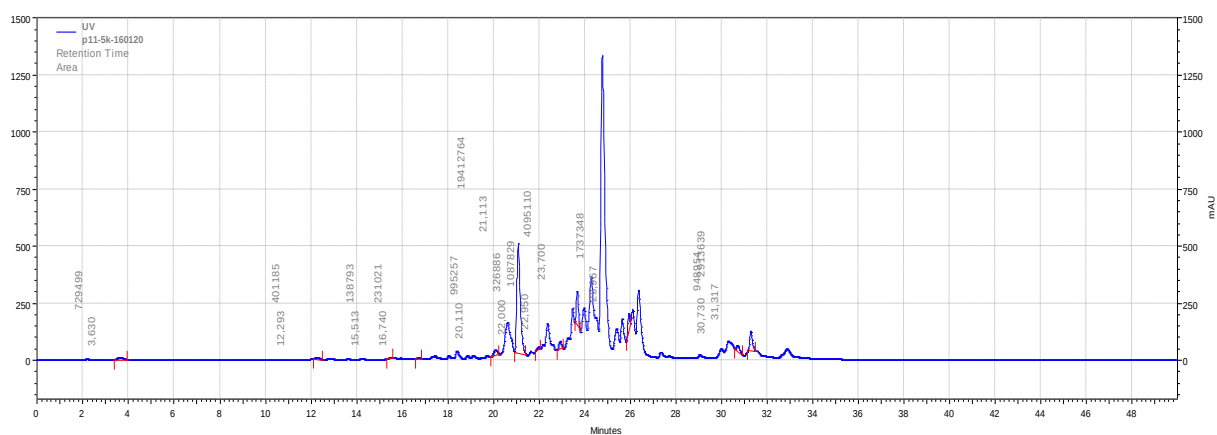
P8



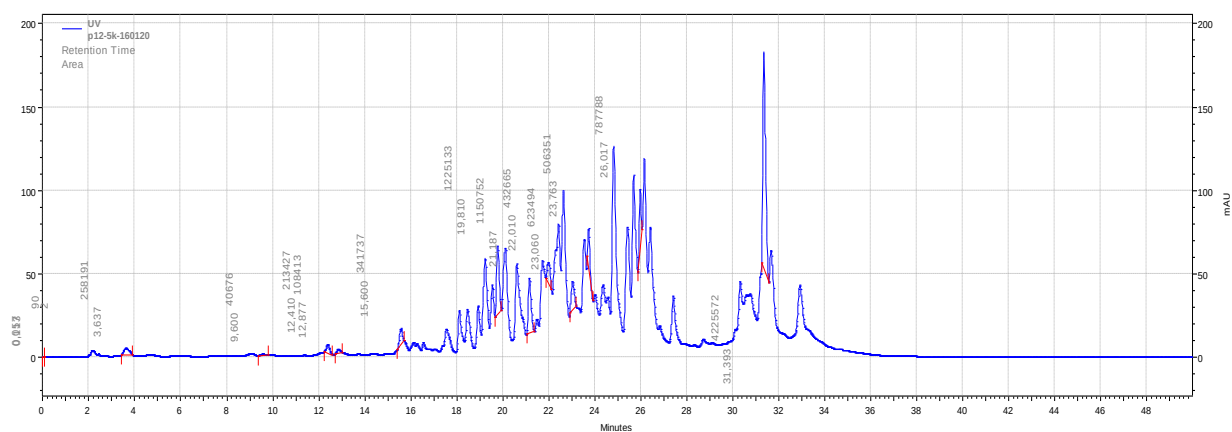
P9



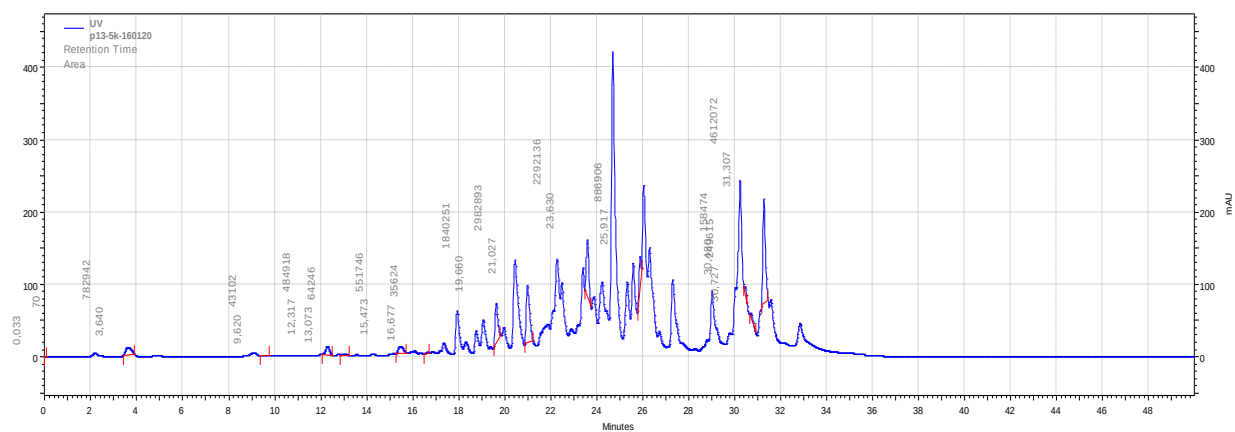
P10



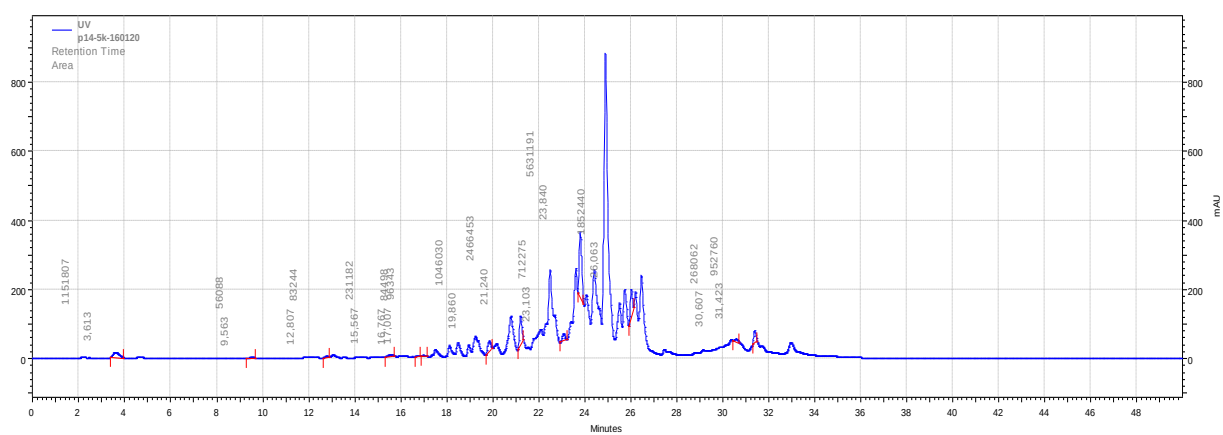
P11



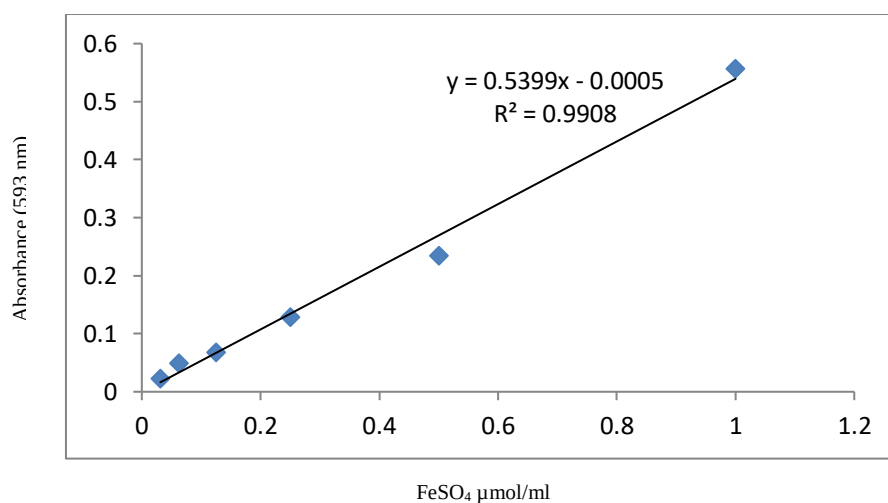
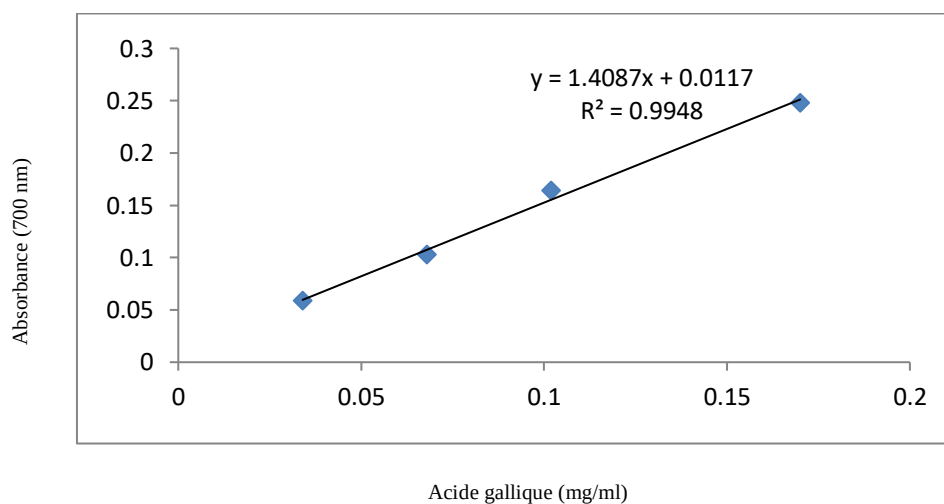
P12



P13



P14

Annexe 3 : Courbes d'étalonnages des activités antioxydantes FRAP et pouvoir réducteur.**Figure 1:** Courbe d'étalonnage de l'activité FRAP.**Figure 2:** Courbe d'étalonnage de l'activité pouvoir réducteur.

*Productions
scientifiques*

Productions scientifiques

❖ Publications scientifiques

Bedjih , F., Ouchemoukh, S., Amessis-Ouchemoukh, N., Otmani, A., Zaidi, H ., Kara,Y., Inan, C., Özkan, İ., & Kolaylı S. (2025). Biochemical properties of different Algerian bee pollen samples. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 18 (1): 48-68.

❖ Communications internationales

- Amessis-Ouchemoukh Nadia, Ouchemoukh Salim, Ayad Rabha, Otmani Amar, **Bedjih Farida**, Zaidi Hicham & Khodir Madani (2019): Caractéristiques physicochimiques et propriétés antioxydantes de quelques miels d'Algérie « 5ème Congrès International de la Biodiversité Végétale et de la Biotechnologie » Marrakech - Maroc : 26-28 Avril 2019.
- **Bedjih Farida** , Amessis-Ouchemoukh Nadia, Raad karima , Dalil karima , Galoul Assia, Touahria Massilya, Otmani Amar, Hamoum Mhend & Ouchemoukh Salim (2019): Antioxydant activity of some algerian bee pollen samples, séminaire international «International conference SINAAN'19, Progress in Natural Antioxidants: sources mechanisms of actions and valorization in health» Université de Béjaia: 16-17 octobre 2019.
- **Bedjih Farida**, Ouchemoukh Salim, Amessis-Ouchemoukh Nadia, Kolayli Sevgi, Kara Yakup, Inan Cihan & Özkan İkra (2024): Composition And Some Biological Properties Of Fourteen Algerian Bee Pollen Samples. International Apitherapy And Nature Congress (IANCO24). Trabzon, Turquie. 8-10 mai 2024.

❖ Communications nationales

- Ouchemoukh Salim, **Bedjih Farida**, Amessis-Ouchemoukh Nadia, Otmani Amar & Zaidi Hicham (2018): Abeilles mellifiques et composition du miel « 4 èmes journées d'étude nationale sur la zoologie appliqué et l'écophysiologie animale », Béjaia du 23 au 24 octobre 2018.
- Ouchemoukh Salim, Amessis-Ouchemoukh Nadia, Zaidi Hicham, Otmani Amar & **Bedjih Farida** (2018): Pollen and chemical analysis of some Algerian honeys, séminaire international « Les produits du terroir : Un outil du développement de l'Agriculture de Montagne » commune de Chemini, le 15 et le 16 Décembre 2018.

- **Bedjih Farida**, Amessis-Ouchemoukh Nadia, Raad karima , Dalil karima , Galoul Assia, Touahria Massilya, Otmani Amar, Hamoum Mhend & Ouchemoukh Salim (2019): Dosage des antioxydants et activité antioxydante de quelques échantillons de pollens Algériens, séminaire national « Alimentation, Santé et environnement : Avancées et Perspectives » Université de Bejaia : 25-26 septembre 2019.
- **Bedjih Farida**, Ouchemoukh Salim, Amessis-Ouchemoukh Nadia, Kolayli Sevgi, Kara Yakup, Inan Cihan & Özkan İkra (2024) : Quelques propriétés biologiques de quatorze échantillons de pollens d'abeilles algériens. Les 7^{èmes} journées Sciences de la Nature et de la Vie (JSNV). Université de Bejaia : 10-11 décembre 2024.

Biochemical properties of different Algerian bee pollen samples

Mediterranean Journal of

Nutrition and Metabolism

2025, Vol. 18(1) 48–68

© The Author(s) 2025

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/1973798X251318583

journals.sagepub.com/home/mnm



Farida Bedjih¹ , Salim Ouchemoukh¹ ,
Nadia Amessis-Ouchemoukh² , Amar Otmani¹ ,
Hicham Zaidi¹ , Yakup Kara³ , Cihan Inan⁴ ,
Ikra Özkan⁴  and Sevgi Kolaylı³

Abstract

Background: Bee pollen is a hive derived product formed from the agglomeration of flower pollen, nectar and bee saliva. It's hailed for its potential health benefits such as antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory effect.

Objective: The present work aims to assess the Algerian bee pollen quality by highlighting their phenolic composition, their antioxidant, antimicrobial, enzymatic and antiviral activities, in addition to wound healing and Deoxyribonucleic acid (DNA) protection effect.

Methods: In this study, fourteen Algerian bee pollen 70% ethanol extracts samples were analyzed to determine their phenolic profiles and biological activities. Thus, Reversed-phase high-performance liquid chromatography with Ultraviolet Detection RP-HPLC-UV is done, antioxidant, antibacterial, enzymatic, wound healing, DNA protection and anti-Herpes Simplex Virus I (anti- HSV-I) tests are carried out.

Results: The samples showed good antioxidant activity, variation in phenolic composition, selective antibacterial activity against Gram negative bacteria strains (*Escherichia coli* "E.coli", *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis*), inhibition to acetylcholinesterase and α -glucosidase and activation of Superoxide Dismutase (SOD). The samples P4, P7, P8 and P14 show high wound healing potential while P6 and P10 have DNA protection effect. Only P7 have anti-HSV-I activity.

Conclusion: The different biological activities varied according to the phytochemical composition of each sample and not according to the harvest region. That is confirmed by Principal Component Analysis (PCA) and different correlations relationships between activities and bioactive compounds where it can be seen that the samples were grouped according to their composition and not by the region of the harvest.

Keywords

Algerian bee pollen, phenolic compounds, HPLC analysis, biological activities, antioxidant activity, antibacterial activity, enzymatic activity, DNA protection, anti-HSV-I

Received: 24 April 2024; accepted: 20 January 2025

¹Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biochimie appliquée, 06000 Bejaia, Algeria

²Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biomathématique, Biochimie, Biophysique et Scientométrie, 06000 Bejaia, Algeria

³Karadeniz Technical University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Trabzon 61080, Turkey

⁴Karadeniz Technical University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Trabzon 61080, Turkey

Corresponding author:

Farida Bedjih, Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biochimie appliquée, 06000 Bejaia, Algeria.
Email: farida.bedjih@univ-bejaia.dz

Introduction

Humain being has known hive products from antiquity and used them for various purposes. Among hive products, there is bee pollen which is obligatory for colony productivity and long-term survival, especially that pollen is the principal source of crucial nutrients for bees such as proteins, lipids, total carbohydrates, minerals and vitamins.^{1–3}

During foraging, the flowers pollen stick to the honey bees *Apis mellifera* thorax hairs and the latter transform it to bee pollen by adding saliva and nectar and secretions from the hypopharyngeal glands of honeybees such as β -glycosidase enzymes and finally it is rolled into pollen balls.⁴

Bee pollen is rich in carbohydrates, proteins, amino acids, enzymes, phytochemicals, considerable amounts of vitamins, minerals, fats, oligopeptides, anthocyanes and antioxidants agents such as phenolic substances and carotenoids.^{4,5} Due to this rich composition, it has numerous virtues such as being antioxidant, antibacterial, antifungal, hepatoprotective and anti-inflammatory as well as other properties which makes it a huge health boosting product.^{2,5,6} Bee pollen composition varies based on several factors such as the plant source, geographic origin, climatic conditions and soil type.⁷

Above all, bee pollen is a good source of very important and bioactive natural phenolic compounds known to be plants' secondary metabolites produced to defend them against pathogens. Polyphenols are food antioxidants. Their presence in food is responsible for some characteristics like color and flavor and has a great impact on health.

Polyphenols cover a wide variety of molecules characterized from the chemical structure side by containing at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups in addition to other substituents which can give rise to various biological activities. For that, numerous research studies have been interested in studying them for their biological activities either by studying phenolic compounds individually or by studying the whole fruit, vegetable or plant.^{8,9}

During the last decades, problems like the resistance to antibiotics, enzymes inhibitors side effects and the viruses spread present major concern for public health^{10,11} that's why it's essential to find new alternatives. In this context exactly, bee pollen can be a very promising product due to its biological activities underlined above. There were few studies investigating Algerian bee pollen like those made by¹² and¹³ but still it's insufficient because it is a product which is not consumed widely in Algeria and as a result there is lack of knowledge about its properties. For that, the present work has the aim to quantify and determine different antioxidant phenolic compounds existing within 14 bee pollen samples from different regions of Algeria using High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) with UV detector, as well as studying different

Table 1. Bee pollen samples harvesting regions and their assigned abbreviations.

Bee pollen harvesting region	Bee pollen sample assigned abbreviation
Adekar	P1
Akbou	P2
Beni Ourtilane	P3
Blida	P4
Bordj	P5
Boukhelifa	P6
Boumerdès	P7
Feraoune	P8
Kherrata	P9
Melbou	P10
Sidi Aich	P11
Tazmalt	P12
Tizi Ouzou	P13
Toudja	P14

biological activities of the samples precisely antioxidant, antimicrobial, enzymatic, wound healing and antiviral (anti-HSV-1) activities.

Material and methods

The present study includes 14 bee pollen samples collected from different regions of Algeria in 2018 and stored at -20°C . After that, all the samples are ground to obtain a powder. The bee pollen samples used herein are not subjected to any treatment. Table 1 shows the harvesting region of each bee pollen sample as well as the abbreviation assigned to it. Figure 1 illustrates the distribution of harvest regions on the geographical map of northern Algeria.

Bee pollen samples extraction

The extraction is made according to the method of Carpes et al.¹⁴ For that, a quantity of 0.5 g of each bee pollen sample is added to 70 ml of 70% ethanol and after stirring for 2 h; the extracts obtained are filtered and kept at 4°C (Figure 2).

Antioxidant activities

Ferric reducing antioxidant power test (FRAP). FRAP test is carried out following the protocol described by Benzie and Strain.¹⁵ Briefly, to prepare the FRAP reagent, 3 solutions are mixed: acetate buffer (300 mM, pH 3.6), 2, 4, 6-tripyridyls-triazine (TPTZ; 10 mM TPTZ in 40 mM HCl) and FeCl_3 (20 mM) with respective ratios of (10:1:1). A volume of 100 μl of bee pollen extract is mixed with 1 ml of the FRAP solution. After 5 min, the absorbance is measured at 593 nm. The concentrations are

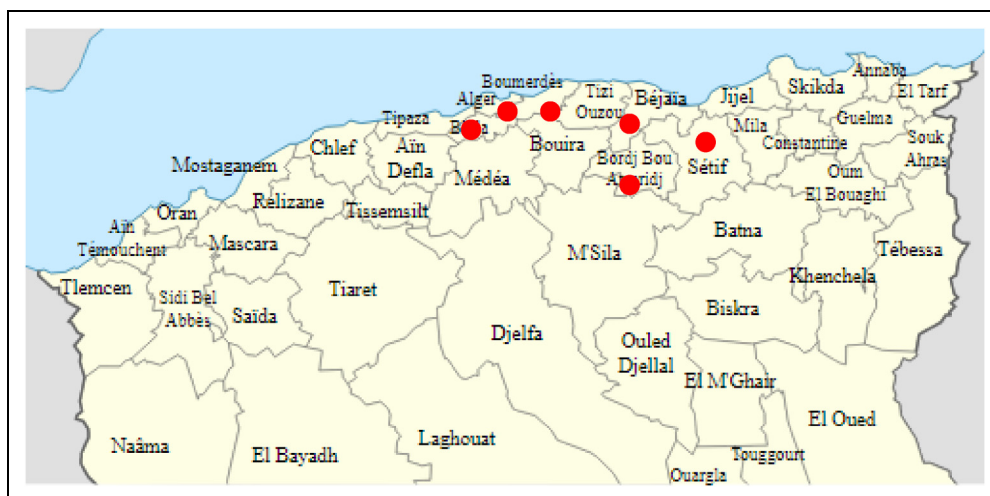


Figure 1. Geographical map of bee pollen samples harvesting regions.

This map shows the main big cities including the harvesting regions as following: Béjaia includes: Adekar, Akbou, Boukhelifa, Feraoune, Kherrata, Melbou, Sidi Aich, Tazmalt and Toudja. Sétif includes Beni Ourtilane. The other cities are Blida, Bordj, Boumerdès and Tizi Ouzou. Each harvesting regions is indicated by a red spot.

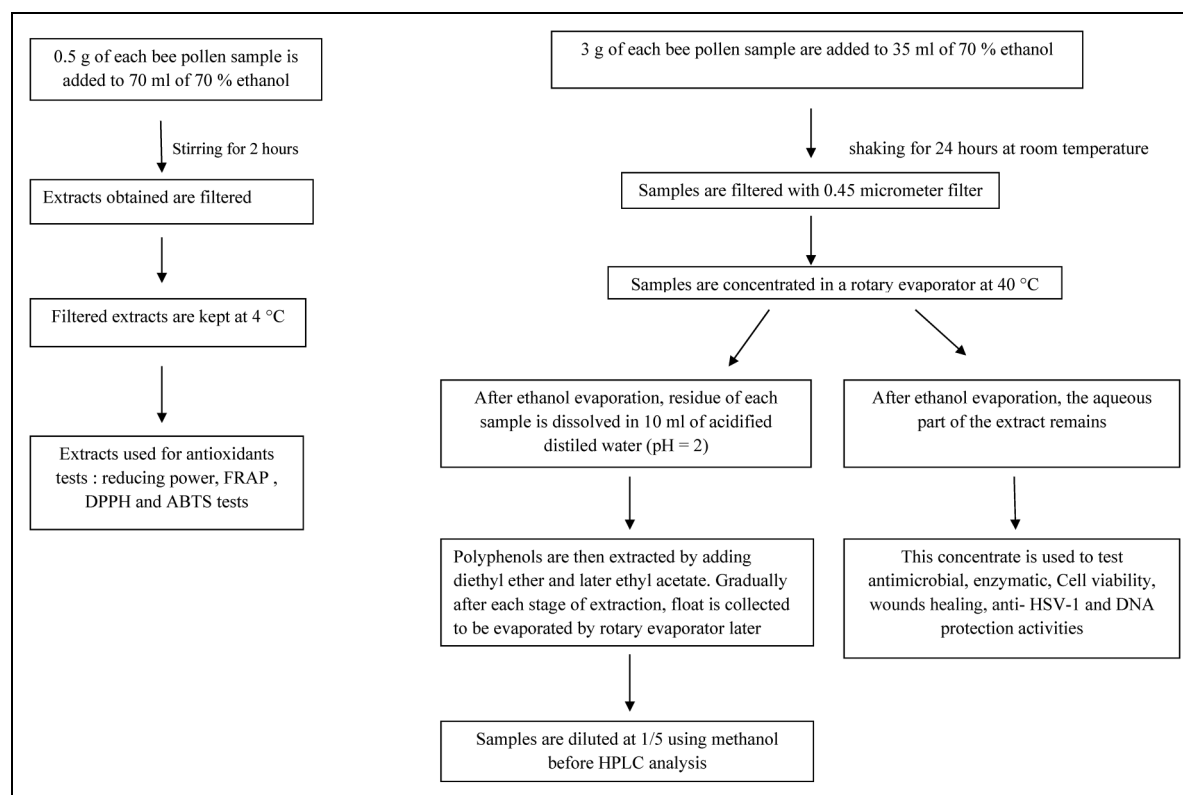


Figure 2. Bee pollen samples extraction diagram.

expressed in μmol equivalent of iron (II) sulfate per 1 g of bee pollen sample ($\mu\text{mol E FeSO}_4 / 1 \text{ g}$).

Reducing power. The evaluation of reducing power is made according to the protocol described by Beretta et al.¹⁶

A volume of 500 μl of bee pollen extract is homogenized with 1500 μl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6,6) and 1500 μl of potassium ferricyanide $[(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)]$ (1%). After incubation for 20 min at 50°C, 1500 μl of trichloroacetate (TCA, 10%) are added and 1250 μl is taken from

the mixture to be diluted in 1250 µl of distilled water and 250 µl of ferric chloride (FeCl₃) (0.1%) are added. After 10 min, the absorbance is read at 700 nm. The concentrations are expressed as mg equivalent of gallic acid per 1 g of bee pollen sample (mg GAE / 1 g).

Anti-radical activity with DPPH. The evaluation of the synthetic 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity is determined using the method of Cuendet et al.¹⁷ A volume of 100 µl of bee pollen extract (7.14 mg/ml) is mixed with 2 ml of DPPH ethanolic solution. After incubation of 15 min; the absorbance is measured at 517 nm and scavenging percentage is calculated according to the following formula:

DPPH percentage scavenging (%)

$$= [(A_C - A_s) / A_C] \times 100$$

A_C: Absorbance of control

A_s: Absorbance of sample

Antiradical activity with ABTS. The ABTS (2, 2-azobis ethylbenzothiazoline-6-sulphonic) radical method is based on the transformation and reduction of a cationic radical ABTS⁺ blue-green coloring in ABTS colorless by an antioxidant. A quantity of 100 µl of bee pollen extract (7.14 mg/ml) is mixed with 1 ml of 7 mM ABTS solution. The mixture is left for 7 min and the absorbance is read at 734 nm.¹⁸ Then, radical percentage reduction is calculated as following:

ABTS percentage reduction (%)

$$= [(A_C - A_s) / A_C] \times 100$$

A_C: Absorbance of control

A_s: Absorbance of sample

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

Polyphenols extraction. The extraction is made according to the method described by Ribani et al.¹⁹ Thus, for 3 g of bee pollen sample, 35 ml of 70% ethanol are added. Then, the mixture is shaken for 24 h at room temperature. Samples are filtered with 0.45 micrometer filter and concentrated in a rotary evaporator at 40°C. After ethanol evaporation, residue of each sample is dissolved in 10 ml of acidified distilled water (pH=2). Polyphenols are then extracted by adding diethyl ether and later ethyl acetate. Gradually after each stage of extraction, float is collected to be evaporated by rotary evaporator later. Samples are diluted at 1/5 using methanol before HPLC analysis.

Table 2. RP-HPLC-UV detector gradient program.

Time (min)	Solvent A (% 2 acetic acid, ultra pure water)	Solvent B% (70% acetonitril, 30% ultra pure water)
0.01	95.00	5.00
3.00	95.00	5.00
8.00	85.00	15.00
10.00	80.00	20.00
12.00	75.00	25.00
20.00	60.00	40.00
30.00	20.00	80.00
35.00	95.00	5.00
50.00	95.00	5.00

Analysis. HPLC (Elite LaChrom Hitachi, Japan) with a UV detector is used for qualitative and quantitative analysis of both standards and samples (280 nm wave length). The separation is done on column reversed- phase C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm; Fortis), in gradient solvent systems A (2% acetic acid in water) and solvent B (70:30, acetonitrile/water) which is sonicated before stirring and continuously degassed by the built-in HPLC system. The gradient elution used for HPLC analysis is the one developed by.²⁰ A 20 µl sample is injected, with the column kept at 30°C and a flow rate of 0.75 ml/min. The solvent program began with linear gradient at 95% of solvent A, maintained for 3 min, then reducing to 80% A by 10 min, 60% A by 20 min, 20% A by 30 min, and finally back up to 95% A by 50 min (Table 2).

In this study, nineteen phenolic compounds standards are used: Gallic acid, Protocatechuic acid, Caffeic acid, Syringic acid, *P*-OH Benzoic acid, *P*- Coumaric acid, Ferulic acid, *T*-Cinnamic acid, Myrecetin, Rutin, Epicatechin, Catechin, Hesperetin, Pinocembrin, Resveratrol, Daidzein, Luteolin, Chrysin, Caffeic acid phenethyl ester (CAPE).

Calibration curves used for the quantitative determination of the individual phenolic components showed very high linearity, with correlation coefficients spanning the range of 0.998 to 1.000.

Antimicrobial activity

Bee pollen samples antimicrobial activity is tested against 8 bacteria and 2 yeast stains obtained from the Farabi medical microbiology laboratory in Trabzon, Turkey. The stains are namely: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472; *Yersinia pestis* ATCC 25924; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22019; *Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Sensitivity test. The antimicrobial activity is assessed according to the CLSI standard methodology.^{21,22} First, agar disk

diffusion method is followed to measure inhibition zones diameters and later minimal inhibition concentrations (MICs) are calculated.

Bacteria cells suspensions of 1×10^8 CFU/ml (0.5 McFarland density standard) and yeast suspensions of 3×10^8 CFU/mL (1 McFarland density standard) are prepared from different overnight cultures in order to make the inoculums. Later, the different disks are put in each plate. Bee pollen samples are tested at a concentration of 142 µg /ml obtained from the dilution of the original extracts using distilled water. Gentamicine and ampicilline are used as positive control antibiotics for gram positive and gram negative bacteria, respectively at a concentration of 100 µg/ml for both. The diameters of the inhibition zones (IZD) are measured in millimeters (mm) and the samples are then classified according to the estimated scale of antimicrobial activity as following: less than 8 mm it's non sensitive, from 8 to 14 mm it's sensitive, from 15 to 19 mm it's very sensitive and more than 20 mm it's extremely sensitive.²³

Minimum inhibitory concentration (MIC) determination.

Minimum inhibitory concentrations (MICs) are determined as the lowest concentrations preventing visible growth. This test is only realized with the sensitive bacterial strains having shown inhibition zone in previous sensitivity test according to the CLSI standard methodology.²⁴

A suspension of 0.5 Mc is prepared from an overnight culture for each strain. Then, every suspension is diluted to 1/100 and 100 µl is put in every well of the 96 well plates. For all assays, stock solutions of bee pollen samples extracts are prepared at 10 mg/ml, after that 100 µl of appropriate extract is added to the first well and serial microdilutions are prepared. MHB alone and MHB with bacteria are used as positive and negative controls respectively. The MIC results are done visually by observing bacterial growing aspect and by spectrophotometric absorbance measurement at 620 nm.

Enzymatic activities

In this work, the enzymatic activity of bee pollen extracts is studied, particularly anti- acetylcholinesterase (anti-AChE), anti- α-glucosidase and SOD activity. The IC₅₀ values are calculated using GraphPad Prism 5 software.

Anti- acetylcholinesterase (anti-AChE) activity. In this test, Ingkaninan's method using a 96-well microplate reader is followed to study AChE inhibition effects.²⁵ For that, Tris-HCl buffer at pH 8 (50 µl, 50 mM), 5,5-dithio-bis (2 nitrobenzoic) 190 acid (DTNB) (125 µl, 3 mM), AChE (25 µl, 0.2 U/ml) and the bee pollen extracts (from 50 to 1000 µg/ml) are added in the microplate and incubated for 15 min at room temperature. Galantamine here is used as a positive control. Later, the enzymatic reaction is started

by adding 25 µl of 15 mM of the substrate (ACh). The absorbance is read at 412 nm using microplate reader.

AChE inhibition percentage is calculated using the formula (1) then IC₅₀ is calculated. Formula (1):

$$\% \text{ Inhibition} = ((A - B) / A) \times 100$$

A: The enzyme activity without compound

B: The enzyme activity with compound.

Anti- α-glucosidase activity. α-Glucosidase inhibition assay is made following the method of Şöhretoğlu et al.²⁶ Acarbose is used as a positive control. The extracts at different concentrations (from 50 µl to 1000 µg/ml) in phosphate buffer at pH 6.9 are added to α-glucosidase (100 µl, 0.5 U/ml) and the mixture is left to incubate for 15 min in a microplate.

After incubation, *p*-nitrophenyl-α-glucopyranoside (4-*p*NPG) (50 µl, 5 mM) is added and the mixture is incubated again for 15 min at room temperature. The absorbance is then measured at 405 nm with a 96-well microplate reader and α-glucosidase inhibition percentages are calculated using formula 1 and later IC₅₀ values are determined.

SOD activity. This test is conducted according to the method of Sabuncuoğlu & Şöhretoğlu²⁷ and the inhibition of Nitroblue Tetrazolium Test (NBT) reduction by SOD is estimated.

For this experiment, a reaction mixture containing 250 mM of phosphate buffer (pH 7.8), EDTA (0.1 mM), NBT (75 µM), methionine (13 mM) and riboflavin (2 µM) is combined with different concentrations of bee pollen ethanolic extracts and incubated at room temperature for 15 min. Absorbance is then measured at 560 nm.

Generated superoxide anion inhibition percentage is calculated according to the following formula:

$$\% \text{ inhibition of NBT reduction by SOD}$$

$$= (\text{control OD} - \text{treatment OD} / \text{control}) \times 100$$

Cell viability test by micro culture tetrazolium technique (MTT)

The cytotoxicity of bee pollen samples is tested by MTT method described by Takenouchi and Munekata.^{28,29}

After 24 h of incubation (37°C; 5% CO₂), HaCaT, vero and HeLa cells are cultured in 96 well plate using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% of penicillin/streptomycin in such a way as to get 10⁴ cells per well and incubated again for other 24 h. Next day, the density of cells is checked under microscope and cytotoxicity

test started. For every bee pollen sample, a filtration using 0.22 µm syringe filter is made and different concentrations are prepared: 0; 12.5; 25; 50; 75; 100 and 150 µg/ml. At this moment, the 96 well plates containing different cells (HaCaT, vero and HeLa) are taken from incubation oven and old medium are replaced by bee pollen extracts at different concentrations prepared in DMEM and incubated for 24 h. After 24 h, the medium containing bee pollen extract is removed from all the wells and 100 µl of fresh DMEM medium supplemented with 10 µl of MTT is put in every well before letting in incubation for 3 h. Later, every well is emptied and 50 µl of DMSO is put inside. After incubation for 30 min, absorbances are measured at 570 nm. The appearance of purple color in the wells indicates the viable cells and the colorless ones indicate the dead cells. Cell viability is calculated according to the following formula: Cells viability % = (sample absorbance/control absorbance) × 100.

Wound healing test (Scratch assay)

The samples P4, P7, P8 and P14 previously selected according to MTT test results at a concentration of 100 µg/ml are tested for their wounds healing ability according to the method described by Şahin et al.³⁰ For that, HaCaT cells are seeded in 6 well plates with a density of 10⁶ cells/well in DMEM medium supplemented with 10% FBS. Every well is scratched using 1000 µl sterile pipette tip and cells are washed by PBS buffer (pH 7.4) before putting in every well the appropriate extract. The visual aspect of the scratches is checked under microscope before incubating plates (37°C; 5% CO₂). Pictures are taken in the same place of the scratch for every sample at different timings of incubation 0, 24, 48 and 72 h using an invert microscope with a digital camera. Inverted microscope with Zen 3.0 software linked to AxioCam ICc1 is used to take photos of cell cultures.

Antiviral activity

The antiviral activity is evaluated according to the method outlined by Chiamanti et al.³¹ with few adaptations.

To perform antiviral activity assay, Vero cells are seeded for 24 h (37°C; 5% CO₂) in DMEM medium with 10% FBS in order to have monolayer of 240 000 cells in each well. After that, the cells are infected by Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) suspension. After incubation for 1 h, the HSV-1 suspension is removed and replaced by bee pollen extracts (P4, P7, P8 and P14) at 100 µg/ml. For P7 sample, different concentrations are later studied (50, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 µg/ml). The different cultures are made in 24 well plates and they are observed at 0, 24 and 48 h of the experiment to assess the formation of plaques which is the infection

index. The different wells are examined using an inverted microscope and photos are taken.

In this test, negative control contains only medium while positive control contains acyclovir at 100 µg/ml. At the end, MTT test is made for the samples showing the best results in order to confirm the vitality of the cells. Inverted microscope with Zen 3.0 software linked to AxioCam ICc1 is used to take photos of cell cultures.

DNA protection activity

Supercoiled plasmid pBR322 DNA nuclease effects of extracts.

The nuclease impacts of the extracts demonstrating the strongest antioxidant properties on the supercoiled plasmid pBR322 DNA are evaluated using agarose gel electrophoresis on the supercoiled pBR322 plasmid DNA, following the methodology outlined in reference.³² The supercoiled pBR322 plasmid DNA is incubated with increasing concentrations of bee pollen extracts (500, 1000 and 2000 µg/ml) in a buffer containing 50 mM Tris-HCl at pH 7.0. All samples are then incubated at 37°C for 1 h. Subsequently, a loading buffer (containing bromophenol blue, xylene cyanol, glycerol, EDTA and SDS) is added, and the mixtures are loaded onto an agarose gel (0.8%) containing ethidium bromide stain, in a Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer. Electrophoresis is carried out at 100 V for 90 min, and the results are visualized using a BioRad Gel Doc XR system and analyzed using Image Lab Version 5.0.1 software.

Supercoiled pBR322 plasmid DNA protection experiments.

The protective effects of extracts P6 and P10 on the supercoiled pBR322 plasmid DNA against Fenton reagents are investigated using agarose gel electrophoresis, following the protocol described in reference.³³ In this work, the mixture containing 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0), plasmid DNA, FeSO₄ (1 mM), H₂O₂ (2%) and extracts at concentrations of 500, 1000 and 2000 µg/ml are incubated at 37°C for 1 h. The electrophoresis experiments are carried out according to the detailed method outlined above. Image Lab Version 5.0.1 Software program is used to visualize DNA aspect.

Statistical analysis

Statistical analysis is performed by the STATISTICA 7.1 software by applying an analysis of one variance (A.N.O.V.A) for all parameters. Correlation matrixes and PCA (principal component analysis) are used in order to study the correlation between the different parameters. The results are expressed as the average of three trials. The results are ranked in descending order a > b > c > d > e > f > g > h > i > j. Values with the same letter have no significant difference.

Table 3. Antioxidant activity results.

Samples	Antioxidant activity			FRAP ($\mu\text{mol E FeSO}_4 / \text{l g}$)
	DPPH (%)	ABTS (%)	Reducing power (mg GAE / l g)	
P1	84.85 $\pm$ 2.09 ^a	89.71 $\pm$ 0.001 ^{ab}	76.56 $\pm$ 6.69 ^{abc}	84.92 $\pm$ 0.00 ^e
P2	82.15 $\pm$ 3.34 ^{ab}	89.65 $\pm$ 0.19 ^{ab}	53.69 $\pm$ 3.00 ^{bc}	62.10 $\pm$ 2.07 ^f
P3	77.98 $\pm$ 0.64 ^{cd}	89.94 $\pm$ 0.98 ^a	80.27 $\pm$ 8.61 ^{ab}	97.91 $\pm$ 0.92 ^d
P4	70.38 $\pm$ 3.31 ^e	88.45 $\pm$ 0.19 ^{cd}	51.27 $\pm$ 7.01 ^c	34.17 $\pm$ 5.92 ⁱ
P5	72.71 $\pm$ 0.38 ^e	89.71 $\pm$ 0 ^{ab}	75.46 $\pm$ 7.66 ^{abc}	53.45 $\pm$ 0.23 ^g
P6	81.11 $\pm$ 0.56 ^{bc}	89.54 $\pm$ 0 ^{abc}	78.15 $\pm$ 12.95 ^{ab}	238.02 $\pm$ 8.26 ^a
P7	71.42 $\pm$ 0.42 ^e	89.23 $\pm$ 0.06 ^{abcd}	82.79 $\pm$ 16.27 ^a	121.93 $\pm$ 4.29 ^c
P8	58.55 $\pm$ 4.05 ^g	89.48 $\pm$ 0.19 ^{abc}	81.30 $\pm$ 19.45 ^a	88.92 $\pm$ 4.13 ^e
P9	64.80 $\pm$ 6.09 ^f	88.19 $\pm$ 1.98 ^d	83.12 $\pm$ 14.40 ^a	37.54 $\pm$ 1.45 ^{ij}
P10	76.64 $\pm$ 1.10 ^d	88.62 $\pm$ 1.10 ^{bcd}	83.45 $\pm$ 15.63 ^a	142.71 $\pm$ 3.06 ^b
P11	71.73 $\pm$ 0.82 ^e	89.54 $\pm$ 0.45 ^{abc}	80.40 $\pm$ 21.15 ^{ab}	47.59 $\pm$ 0.95 ^h
P12	77.25 $\pm$ 0.64 ^d	89.52 $\pm$ 0.03 ^{abc}	77.58 $\pm$ 27.56 ^{abc}	85.25 $\pm$ 4.74 ^e
P13	76.45 $\pm$ 0.97 ^d	89.48 $\pm$ 0.39 ^{abc}	84.45 $\pm$ 20.76 ^a	35.74 $\pm$ 0.81 ^j
P14	69.46 $\pm$ 3.54 ^e	90 $\pm$ 0.19 ^a	96.11 $\pm$ 21.45 ^a	41.54 $\pm$ 0.82 ⁱ

Values are mean $\pm$ standard deviation. Means followed by the same letter in each column are not different according to ANOVA (Analysis of Variance).

Results

Antioxidant activities

The results of assessment of antioxidant activities are shown in Table 3.

FRAP test. The FRAP test shows that the reducing capacity varies between 34.17 $\mu\text{mol equivalent FeSO}_4 / \text{l g}$ (P4) and 238.02 $\mu\text{mol equivalent FeSO}_4 / \text{l g}$ (P6). The statistical analysis revealed significant difference ($p < 0.05$) between all samples except between three groups: P1, P8 and P12; P9 and P14 and P4; P9 and P13.

Reducing power. From the results, it can be seen that all bee pollen samples have reducing power activity.

The best one is displayed by P14 (96.11 mg EAG/l g) in opposition to P4 with lowest capacity (51.27 mg EAG / l g). According to statistical analysis at $p < 0.05$, the samples are divided into 3 groups; the first is formed by P1, P3, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P4, P12, P13 and P14; the second contains: P1, P2, P3, P5, P6, P11 and P12 and for the third is: P1, P2, P4, P5 and P12. The difference between all groups is significant.

Anti-radical activity with DPPH. The highest DPPH scavenging activity is recorded by sample P1 (84.85%) in contrary P8 is the lowest in term of antiradical activity (58.55%). Samples are divided into 7 groups according to statistical analysis ($p < 0.05$) with significant difference between all groups.

Antiradical activity with ABTS. In this test, ABTS radical reducing results range from 88.19 for P9 to 90% for P14.

HPLC analysis

The results of HPLC analysis are shown in Table 4. Bee pollen is a highly biologically active product well known for its phenolic constituents; it may also possess biological active properties.

There are numerous distinct phenolic compounds present in any natural sample, and it can be challenging to measure each one individually.^{34,35} Consequently, only 19 of the phenolic substances have been detected by HPLC and total phenolic content has been determined by a spectrophotometric method in this study. The chromatograms of standard phenolic compounds are presented in Figure 3.

The amounts of the phenolic compounds are given in Table 4 as $\mu\text{g/g}$ of sample.

Most of the phenolic compounds exhibit absorption maxima in the ultraviolet (UV) absorption spectra at a wavelength of 280 nm. They were identified by comparing their retention times (through peak normalization) with those of authentic standard compounds.³⁶

For phenolic profile of bee pollen, the most used HPLC detection systems are: UV-VIS detector,³⁷ PDA (photodiode array) detector and MS (mass spectrometry) detector.³⁸

In the analytical conditions selection, it is important to consider the diversity of the phenolic compounds group, given their different chemical structures, as well as the varying sensitivity of the compounds to pre-treatment processes.³⁹

Among the 19 studied phenolic compounds previously detailed, 4 are found in all samples (gallic acid, p-coumaric acid, resveratrol and hesperetin). Epicatechin is not found in any sample. For the other compounds, their amounts differ from sample to another.

Table 4. Phenolic components of the 14 bee pollen samples detected by HPLC ($\mu\text{g/g}$). (ND: not detected).

Phenolic compounds	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
Phenolic acids:														
Gallic acid	33.34	8.48	27.34	11.92	43.74	19.91	14.78	31.60	11.34	17.31	18.11	6.17	19.46	28.80
Proto-catequic acid	ND	ND	8.14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Caffeic acid	49.27	53.14	37.60	7.16	20.28	38.66	2.74	ND	5.55	3.93	13.98	7.87	16.71	ND
Syringic acid	15.31	2.24	ND	3.48	11.36	8.78	5.28	5.35	2.75	1.34	ND	3.83	2.29	2.96
p-OH benzoic acid	4.22	3.62	3.76	ND	ND	4.02	5.45	2.39	3.14	1.53	ND	2.74	2.90	3.72
p-coumaric acid	1.93	3.95	29.91	9.61	19.80	9.36	2.69	22.67	6.17	2.01	3.69	8.28	13.02	5.78
Ferulic acid	2.32	ND	ND	ND	ND	2.78	ND	ND	ND	1.43	8.00	ND	2.05	3.54
t-cinnamic acid	26.53	58.17	8.89	ND	41.57	28.00	31.33	77.26	48.07	27.27	54.75	6.82	30.67	208.82
Flavonols														
Myrecetin	97.18	530.15	ND	351.67	116.47	25.32	106.88	766.07	243.13	72.87	162.23	199.14	297.91	170.38
Rutin	ND	17.23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	44.27
Flavan-3-ol														
Epicatechin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Catechin	3.85	ND	5.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flavanones														
Hesperetin	30.26	33.22	10.32	37.69	54.74	8.29	5.91	19.57	30.54	10.83	63.18	28.79	32.38	67.35
Pinocembrin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	53.285	ND	ND	10.45	ND
Stilbenes														
Resveratrol	278.70	293.83	205.12	91.18	243.26	394.69	373.12	212.77	89.87	80.26	69.82	42.32	108.13	89.58
Isoflavones														
Daidzein	ND	ND	ND	ND	ND	12.595	ND	ND	30.52	3.06	12.85	16.96	ND	ND
Flavones														
Luteolin	ND	ND	ND	ND	36.26	30.37	15.73	21.19	17.13	ND	71.78	41.62	ND	47.39
Chrysin	13.69	ND	6.33	ND	ND	7.16	9.57	ND	36.30	ND	65.34	ND	14.27	21.35
Other														
CAPE	9.42	68.04	8.89	271.27	69.60	11.54	5.75	10.31	42.32	ND	175.89	255.01	278.32	57.63

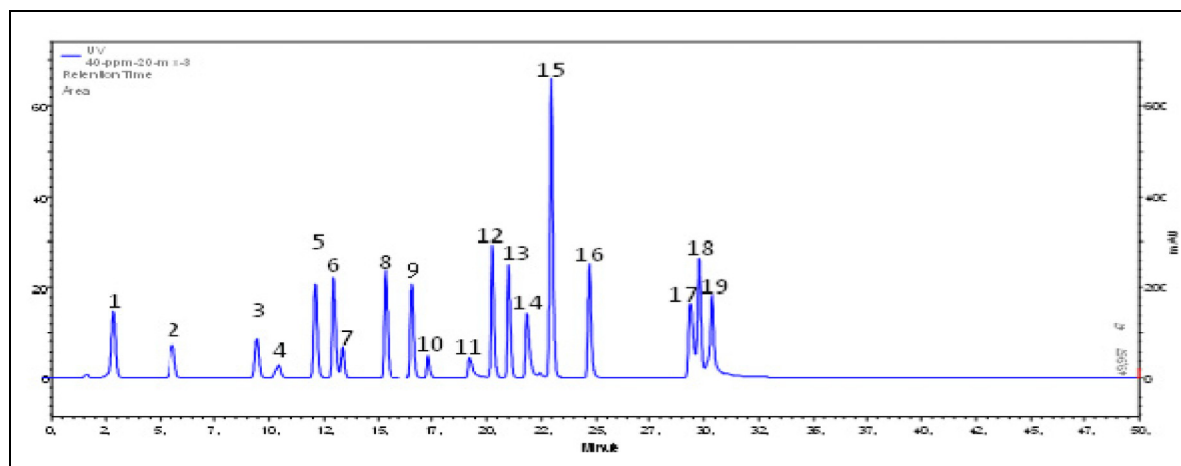


Figure 3. Standards chromatogram: 1. Gallic acid, 2. Protocatechuic acid, 3. P-OH Benzoic acid, 4. Catechin, 5. Caffeic acid, 6. Syringic acid, 7. Epicatechin, 8. P- Coumaric acid, 9. Ferulic acid, 10. Rutin, 11. Myrecetin, 12. Resveratrol, 13. Daidzein, 14. Luteolin, 15. T-Cinnamic acid, 16. Hesperetin, 17. Chrysin, 18. Pinocembrin, 19. CAPE.

Table 5. Antimicrobial activity results (-: no activity detected).

Samples	Antibacterial activity					
	<i>E. Coli</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>Yersinia pestis</i>	
	IZD (mm)	MIC (mg/ml)	IZD (mm)	MIC (mg/ml)	IZD (mm)	MIC (mg/ml)
P1	—	—	—	—	—	—
P2	—	—	—	—	14	5
P3	—	—	—	—	—	—
P4	16	5	—	—	14	5
P5	—	—	—	—	—	—
P6	18	2.5	—	—	13	5
P7	—	—	12	5	—	—
P8	18	2.5	—	—	—	—
P9	16	2.5	—	—	—	—
P10	—	—	15	5	15	5
P11	—	—	—	—	—	—
P12	15	5	—	—	15	5
P13	17	2.5	—	—	—	—
P14	—	—	—	—	—	—

Antimicrobial activity

According to antimicrobial study, it seems that bee pollen samples are more effective against Gram negative stains especially *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis* (Table 5).

E. coli strain is sensitive to 5 monofloral samples (P4, P6, P8, P9 and P12) and one polyfloral sample (P13). The inhibition diameters range from 15 to 18 mm for samples and reach 20 mm for gentamicine.

The highest inhibition is got with P6 and P8 against *E. coli* with 18 mm of inhibition zone diameter both.

For *Salmonella typhimurium* strain, it's only sensitive to two bee pollen samples namely P7 and P10 with inhibition zone diameter of 12 and 15 mm, respectively.

Table 6. Enzymatic activity results (-: no activity detected).

Samples	Enzymatic activity		
	AChE IC50 (µg/ml)	α glucosidase IC 50 (µg/ml)	SOD IC50 (µg/ml)
P1	3203.50	892.75	—
P2	2501.50	550.20	—
P3	2735.50	317.95	—
P4	1506	280.30	205.13
P5	1351	300.70	—
P6	1735.50	257.40	—
P7	868.50	382.45	515.85
P8	1040.70	217.35	103.31
P9	798.25	173.35	—
P10	1022.85	214.40	—
P11	1341	309.40	—
P12	552.90	134	—
P13	1343.50	337.05	—
P14	928.30	239.65	15.97
Positive control	Galantamin: 8.42	Acarbose : 190.45	—

Yersinia pestis strain is sensitive to 5 samples (P2, P4, P6, P10 and P12). MIC values for the three stains *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and *Yersinia pestis* in our study range from 2.5 mg/ml to 5 mg/ml.

Enzymatic activities

Enzymatic activities results are given as IC₅₀ values for different tested enzymes AChE, α- glucosidase and SOD (µg/ml) in Table 6.

Anti-AChE activity. The sample P12 shows the highest AChE inhibitory effect with lowest IC₅₀ of 552.90 µg/ml followed by P9 and P7 with 798.25 and 868.5 µg/ml, respectively.

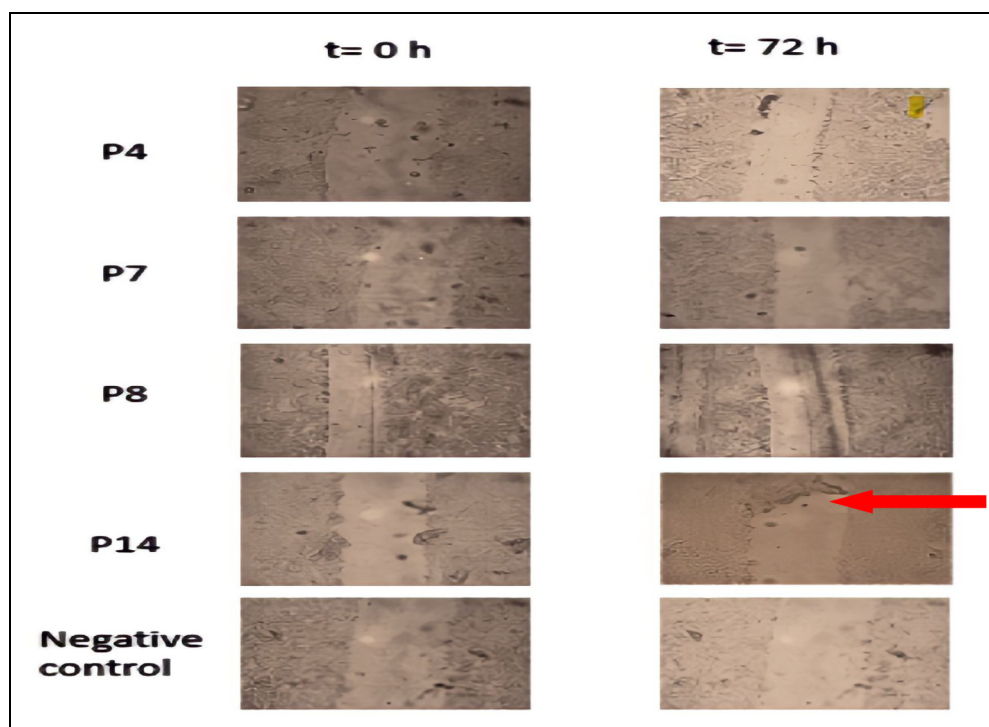


Figure 4. Wound healing test results. The newly formed cell layer is indicated by the red arrow in the case of P14 bee pollen sample. This layer of cells leads to the closure of the scratch previously created which is an indication of the healing power of bee pollen. The red arrow points to the healing site for P14 sample.

The different samples show a very highly statistical difference ($p < 0.001$) between each other except P11 and P13 which form the same group.

The AChE IC_{50} values are in a very highly significant correlation ($p < 0.001$) with p-OH benzoic acid ($r = -0.94$).

Anti- α -glucosidase activity. α -Glucosidase inhibition IC_{50} values range from 134 $\mu\text{g/ml}$ (P12) to 892.75 $\mu\text{g/ml}$ (P1), so P12 has the best activity against α -glucosidase. The statistical analysis display that there is a very highly significant difference ($p < 0.001$) between all the samples.

SOD activity. In this study, the best activity for SOD goes for P14 with $IC_{50} = 15.97 \mu\text{g/ml}$. All the samples present a very highly significant difference between each other ($p < 0.001$).

Cell viability test by micro culture tetrazolium technique (MTT)

The bee pollen cytotoxicity is evaluated by MTT assay and cells viability is calculated for different cells HaCaT, Vero and HeLa. From the results it can be seen that, for all samples, the cells viability percentage is very high and higher to 80% where the lowest one was for P8 with 82.01% at 150 $\mu\text{g/ml}$ with HaCaT cells. Vero and HeLa cells both show very high cells viability percentages with all the samples.

Wound healing test

Wound healing test serves to assess the degree of scratch closure and therefore the eventual healing power of the tested samples.⁴⁰ In the present study, 4 bee pollen samples: P4, P7, P8 and p14 are tested for their wound healing effect on a scratch created in a cell monolayer. After a repair period of 72 h, the observation under microscope shows HaCaT cells proliferation on both sides of the scratch and migration to the damaged area with the P14 sample by comparison to a negative control that contains only medium and didn't show any change (Figure 4).

Antiviral activity

The effect of bee pollen was evaluated by comparison to negative and positive control (acyclovir) (Figure 5). The Vero cells seeded without acyclovir or bee pollen showed cytopathologic changes, such as rounding of the cells, aggregation and nuclear enlargement disruption of membrane integrity.

The four bee pollen samples behave in different way towards the HSV-1 infection. The sample P4 was efficient until 48 h of incubation, after 48 h its efficiency decrease and the infection plaques became numerous. The P8 sample behavior is average and stable along the experiment where it gave a good cell vitality signs at 48 h and 72 h of the experiment such as the cells adhesion to the well even

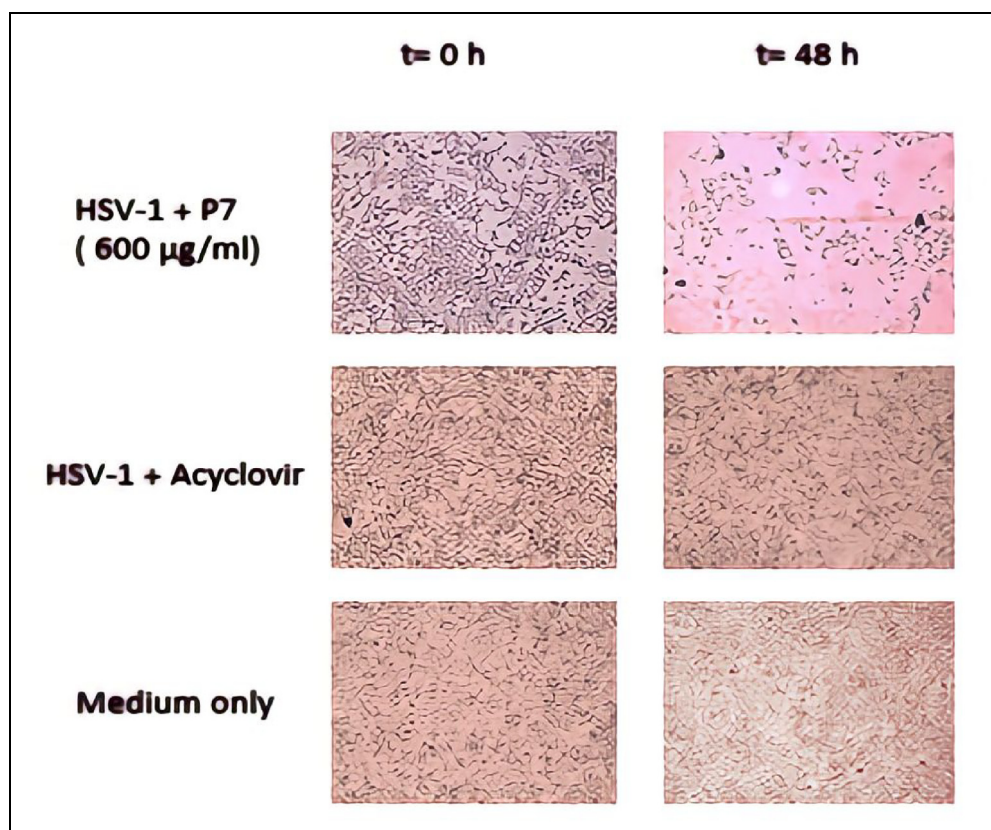


Figure 5. Antiviral activity (anti-HSV-I) results. Cell layer density is an index of anti-HSV-I activity. With medium only (negative control), the cells are not protected from viral infection which leads to the formation of plaques. Acyclovir is a positive control which protects cells from infection; therefore the number of plaques formed is very limited. With P7 bee pollen sample at 600 µg/ml, it can be noticed that the plaques formed are limited which means that P7 gives protection anti-HSV-I.

after 72 h of incubation. P14 is the least efficient against HSV-1 and shows the formation of highest number of infection plaques in addition to the cells detachment from the wells which is a clear infection sign. The sample P7 is the most effective one at 100 µg/ml, it shows a very good vitality cells aspect at 48 h and average efficiency at 72 h, that's why the decision to test it at different concentrations is made. From the seven tested, the three concentrations 200, 400 and 600 µg/ml showed the best antiviral activity with 6.97; 7.63 and 20.49% cells vitality percentages respectively and IC_{50} of 64.79 µg/ml. This IC_{50} belongs to IC_{50} values interval recommended for plant extracts against infectious diseases which must be lower than 100 µg/ml.⁴¹

The statistical analysis reveals that P7 at 600 µg/ml possess efficiency different from 200 and 400 µg/ml in a very highly significant way ($p < 0.001$).

DNA protection activity

Supercoiled plasmid pBR322 DNA nuclease effects of extracts.

The hydrolytic nuclease activity of extracts is investigated

using agarose gel electrophoresis on supercoiled pBR322 plasmid DNA in order to determine extracts' potential to cause DNA damage. It is known that Form I (supercoiled form), Form II (nicked form) and Form III (linear form) bands can be observed on agarose gel after electrophoresis. In this study, the percentages of Form I is similar in the absence and presence of extracts. These findings indicate that no DNA nuclease effect is observed at these concentrations of extracts (Figure 6(a)).

Bee pollen extracts protective effects on supercoiled pBR322 plasmid DNA.

It is well established that Fenton reactions ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^3 + HO\cdot + OH^-$) generate hydroxyl radicals known to be highly reactive which can cause serious biological damage.⁴² In this work, the percentage of Form I was almost 75% for the negative control in Figure 6(b), lane 1. Upon addition of $FeSO_4$ and H_2O_2 to supercoiled pBR322 plasmid DNA, Form II (72.50%) are generated and Form I disappeared completely (Figure 6(b), Lane 2). On addition of extracts, the percentages of Form I increase again. The percentages of Form I is 53.10%, 55.10%, and 59.10% in the presence of P6 (Figure 6(b), lanes 3-5). In the presence of P10, the percentages of Form I are calculated

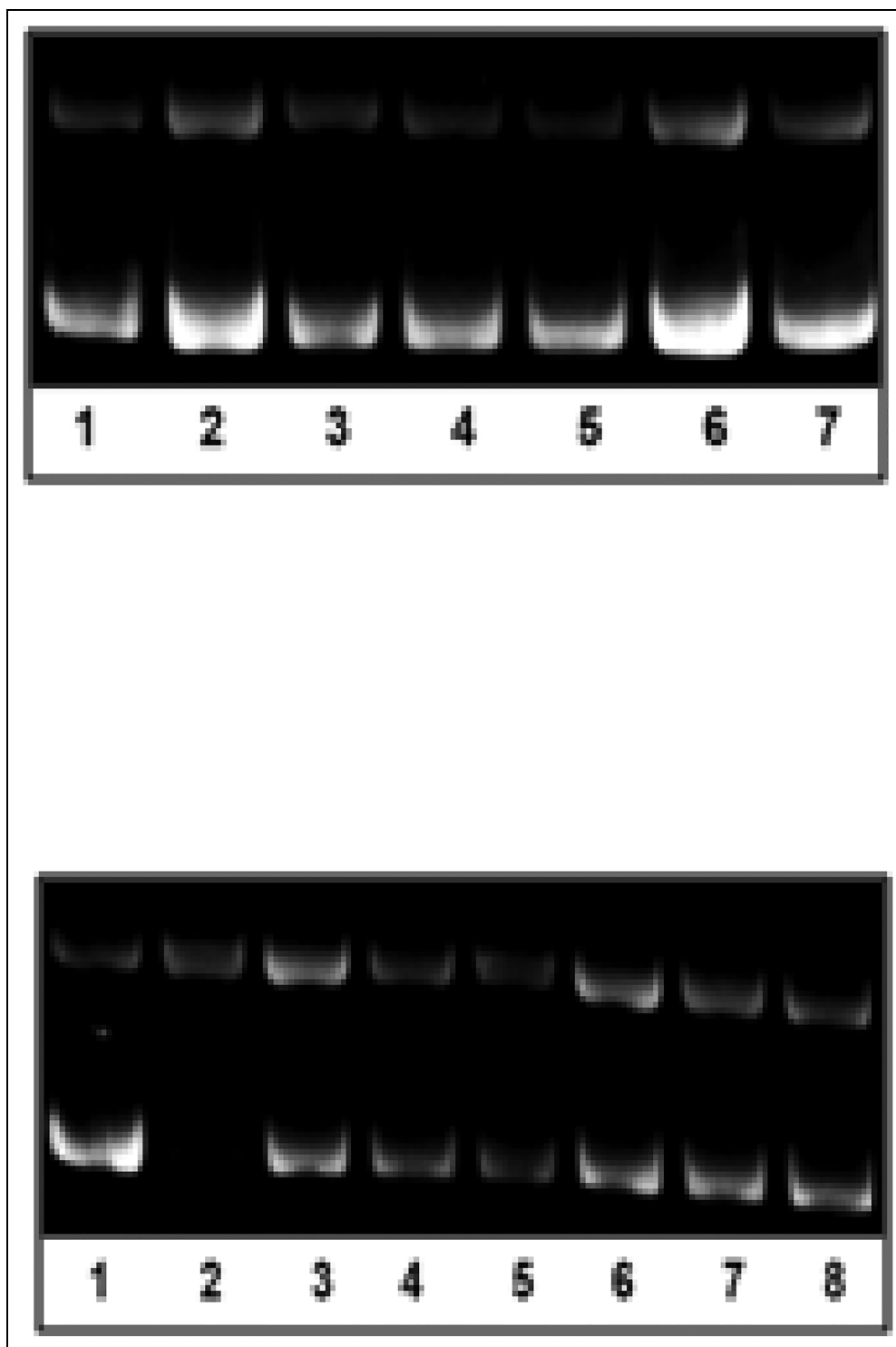


Figure 6. (a) DNA protection activity. Supercoiled pBR322 plasmid DNA damage effects of extracts. Lane 1: DNA control; lane 2-4: DNA + P6 (500, 1000, and 2000 µg/mL); lane 5-7: DNA + P10 (500, 1000, and 2000 µg/mL). (b) DNA protection activity. Supercoiled pBR322 plasmid DNA protective effects of extracts against Fenton reagent. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA + 1 mM FeSO₄ + 2% H₂O₂; Lane 3-5: DNA + 1 mM FeSO₄ + 2% H₂O₂ + P6 (500, 1000, and 2000 µg/mL); Lane 6-8: DNA + 1 mM FeSO₄ + 2% H₂O₂ + P10 (500, 1000, and 2000 µg/mL).

as 54.90%, 58.70%, and 62.40%, respectively (Figure 6(b), lanes 6-8).

Discussion

Antioxidant activities

FRAP test. The results of FRAP test are in the same range of those reported by Bakchiche et al.¹² that showed 88.57 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$ for Algerian bee pollen and slightly better than the results obtained by Saral et al.⁴³ in bee pollen samples from Turkey giving activity between 8.69 and 84.89 $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g}$.

FRAP test is based on electron transfer and it is a very good indicators of total antioxidant power, since total reducing power is defined as the sum of the reducing powers of the individual compounds existing in a particular sample.⁴⁴

The difference between the FRAP test and the reducing power test is that the FRAP test measures the ability of antioxidants to reduce ferric ions (Fe^{3+}) to ferrous ions (Fe^{2+}) in an acidic medium, leading to a color change that can be quantified spectrophotometrically. This is more specifically related to the reducing power of antioxidants concerning iron ions.⁴⁵

As expected from similar studies, FRAP test results are in correlation with phenolic acids such as p-OH benzoic acid ($r=0.71$, $p<0.01$) and syringic acid ($r=0.90$, $p<0.01$) and with a stilbene compound which is resveratrol ($r=0.98$, $p<0.001$) (Table 7).

Thus, the antioxidant power shown by bee pollen samples can be attributed to these compounds.

Reducing power. The reducing power test reflects reduction potential of substances that react with potassium ferricyanide (Fe^{3+}) to form potassium ferrocyanide (Fe^{2+}). The later reacts then with ferric chloride to form ferric ferrous complex whose absorption maximum is at 700 nm. This test is used generally to assess the overall reducing ability of a substance.⁴⁶

For this activity, significant positive correlations ($p<0.05$) are recorded with 2 compounds: p-OH benzoic acid ($r=0.60$) and cinnamic acid ($r=0.62$).

Anti-radical activity with DPPH. The results found for DPPH test are higher than those found by Dos Santos Vasconcelos⁴⁷ that studied Brazilian bee pollen samples and whose results were between 66.95% and 78.58%.

According to Sánchez-Moreno,⁴⁸ the DPPH method is regarded as a reliable and straightforward way to measure the antioxidant capacity of fruits, vegetables or extracts.

The variations in DPPH scavenging activity from sample to another may be explained by the significant differences in the polyphenol content of the samples and their corresponding scavenging capabilities. It can be reasoned that the

phenolic compounds act as free radical scavengers due to their ability to donate hydrogen atoms.⁴⁹

In this study, unlike other antioxidant tests, DPPH didn't show correlation with antioxidants like phenolic compounds. According to Dulger Altiner et al.,⁵⁰ these differences between antioxidant measurement methods might be attributed to the diversity in the chemical composition of the bee pollen samples and the sensibility of each method toward different bioactive compounds.

Antiradical activity with ABTS. The results found are higher than the findings of Atsalakisa et al.⁵¹ that studied ABTS antiradical effect of some bee pollen samples from Greece and the maximum pourcentage is 77.9% while in the present study all samples have antiradical activity from 88.19 to 90%.

Positive correlations are recorded between ABTS activity and bioactive compounds such as a significant one ($p<0.05$) with p-OH benzoic acid ($r=0.61$); a highly significant one ($p<0.01$) with gallic acid ($r=0.79$) and a very highly significant one ($p<0.001$) with cinnamic acid ($r=0.87$).

From this, it can be deduced that these bioactive compounds are responsible of this activity by reducing ABTS radicals.

The differences between bee pollen samples antiradical activity results can be explained by their differences in term of phenolic compounds. In addition, there are several other important factors that can have an impact on phenolic content in bee pollen such as, age of bees, conditions of the beehives, strength of the colony and the samples collecting method.³⁷

HPLC analysis

This variability observed in bee pollen composition is derived by the variability of phenolic compounds produced by plants from diversity of species from which the pollen was collected. Phenolic compounds synthesized in the plants depend on the stress conditions, geographic location and vegetation around the apiaries, which conditioned the flowering.^{52,53} Their content depends also on the extraction method of these compounds and bee pollen extract storage.⁵⁴

The statistical analysis reveals the existence of positive correlations between some phenolic compounds and studied biological activities as shown in the Table 7.

In this study, gallic acid ranges from 8.48 for P2 to 43.74 $\mu\text{g/g}$ for P5 with an average of 20.88 $\mu\text{g/g}$. These amounts are higher than the results found by Ulusoy and Kolayli⁵⁵ whose the average is 11.79 $\mu\text{g/g}$ of gallic acid in bee in pollen samples from Anzer in Turkey; and less than those found by Rebiai et al.⁵⁶ in Algerian bee pollen samples where they recorded 349.29 $\mu\text{g/g}$.

Table 7. Correlations matrix between different phenolic compounds and biological activities of bee pollen samples.

Variables	FRAP	RP	ABTS	IZD _{E.coli}	IZD _S	IZD _Y	MIC _{E.coli}	MIC _Y	ACHE	α -glcase	SOD	IC ₅₀	CAPE	Coum- aric	Gallic acid	Hesp- iritin	Myri- cetin	Resve- ratrol	syringic	Cinna- mic	p- OH benzoic acid
FRAP	I																				
RP	0.27	I																			
ABTS	0.12	0.72	I																		
IZD _{E.coli}	-0.24	-0.50	-0.51	I																	
IZD _S	0.81	0.13	-0.06	-0.58	I																
IZD _Y	-0.60	-0.72	-0.84	0.51	-0.33	I															
MIC _{E.coli}	-0.48	-0.70	-0.78	0.87	-0.52	0.87	I														
MIC _Y	-0.60	-0.72	-0.84	0.51	-0.33	1.00	0.87	I													
ACHE	-0.63	-0.71	-0.80	0.69	-0.50	0.97	0.96	0.97	I												
IC ₅₀	0.58	-0.08	-0.32	-0.52	0.93	0.00	-0.29	0.00	-0.20	I											
α -glc IC ₅₀	0.72	-0.14	-0.39	-0.31	0.93	-0.01	-0.19	-0.01	-0.17	0.96	I										
SOD IC ₅₀	-0.31	-0.70	-0.92	0.30	0.05	0.92	0.71	0.92	0.82	0.38	0.36	I									
Caffeic													I								
CAPE	-0.73	-0.65	-0.74	0.43	-0.43	0.98	0.82	0.98	0.95	-0.08	-0.14	0.87	I								
Coumaric	-0.01	-0.09	0.01	0.83	-0.57	-0.04	0.45	-0.04	0.20	-0.71	-0.48	-0.28	-0.10	I							
Gallic acid	-0.02	0.53	0.79	0.07	-0.47	-0.67	-0.35	-0.67	-0.49	-0.75	-0.70	-0.90	-0.59	0.58	I						
Hesperitin	-0.85	0.16	0.36	-0.20	-0.67	0.13	-0.04	0.13	0.13	-0.57	-0.78	-0.14	0.31	-0.17	0.32	I					
Myricetin	0.01	-0.14	-0.06	0.86	-0.54	0.01	0.50	0.01	0.24	-0.67	-0.43	-0.21	-0.06	I	0.51	-0.22	I				
Resveratrol	0.98	0.18	0.02	-0.31	0.90	-0.50	-0.47	-0.50	-0.57	0.73	0.84	-0.16	-0.63	-0.17	-0.20	-0.86	-0.14	I			
Syringic	0.90	0.06	-0.05	0.19	0.55	-0.43	-0.14	-0.43	-0.37	0.33	0.56	-0.23	-0.59	0.38	0.06	-0.93	0.40	0.85	I		
cinnamic	0.62	0.62	0.87	-0.48	-0.35	-0.58	-0.61	-0.58	-0.54	-0.50	-0.65	-0.65	-0.41	-0.08	0.74	0.74	-0.15	-0.38	-0.47	I	
p- OH benzoic acid	0.71	0.60	0.61	-0.81	0.74	-0.84	-0.95	-0.84	-0.94	0.51	0.46	-0.59	-0.84	-0.45	0.17	-0.26	-0.48	0.71	0.38	0.34	I

*(p<0.05) = significant correlation; ** (p <0.01) = highly significant correlation; *** (p <0.001) = very highly significant correlation.
 RP: reducing power; CAPE: Caffeic acid phenethyl ester; IZD: inhibition zone diameter; MIC: minimum inhibitory concentration.

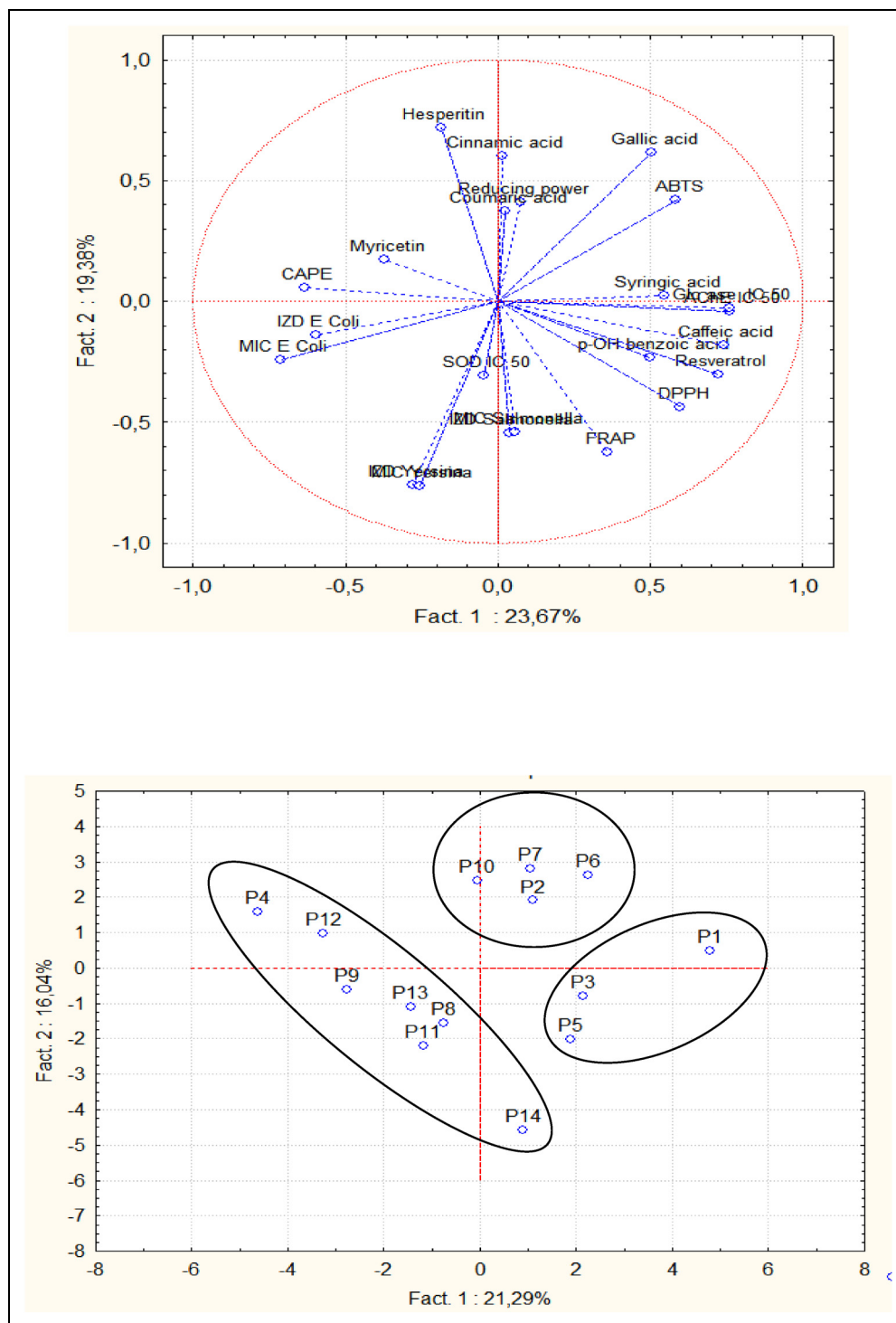


Figure 7. (a) PCA analysis. Principal component analysis (PCA) of bioactive compounds (different phenolic compounds), antioxidant (ABTS, DPPH, reducing power), antibacterial (IZD, MIC) and enzymatic activities (IC₅₀). (b) PCA analysis. Principal component analysis (PCA) showing the bee pollen samples grouping according to tested parameters (bioactive compounds including different phenolic compounds) and biological activities (antioxidant, antibacterial enzymatic wound healing and antiviral activity).

Gallic acid and its derivative compounds are abundant in different types of fruits and plants. This phenolic acid was extensively studied in other studies by

electrochemical methods, using different electrode materials and it was found that gallic acid present a strong *in vitro* antioxidant capacity. This is confirmed in our study

that gallic acid amounts present a highly significant positive correlation ($p < 0.01$) with ABTS reducing percentages with correlation factor of ($r = 0.79$).

Caffeic acid ranges from 2.74 for P7 to 53.14 $\mu\text{g/g}$ for P2 with average of 21.41 $\mu\text{g/g}$. This is less than the results found by Ulusoy and Kolayli⁵⁵ and Rebiai et al.⁵⁶ where they found an average of 35.42 $\mu\text{g/g}$ and 31.658 $\mu\text{g/g}$, respectively.

Caffeic acid is a characteristic phenolic compound that is widely found in a variety of natural sources, including fruits, vegetables, and herbs. It has been recognized to exhibit numerous biological activities, such as antioxidant one.^{57,58}

The present study didn't show correlation with antioxidant activity tests but it did with antibacterial and enzymatic activity as shown in the correlations table (Table 7); so it can be supposed that bee pollen may enhance antibacterial and enzymatic activity, not antioxidants.

Resveratrol and myrecetin are the two compounds with highest levels in the samples.

For the reducing power test, p-OH benzoic acid and t-cinnamic acid are the two phenolic compounds showing significant positive correlations ($p < 0.05$) with respective correlation factors of ($r = 0.60$) and ($r = 0.62$). From that, it can be deduced that are involved in this activity.

Given that the statistical analysis reveals that resveratrol amounts are in a very highly significant positive correlation with FRAP with a correlation factor of ($r = 0.98$), it can be supposed that resveratrol exerts its antioxidant effect by scavenging free radicals and reducing molecules especially that resveratrol is the most representative stilbene and it is well known for its antioxidant capacity.⁵⁹

As it was shown through different tests in the current work, phenolic compounds are involved and correlating with many biological activities especially antioxidant one.

The electrochemical reactions of phenolic antioxidants have been extensively studied, and a relationship has been established between their electron transfer properties and radical-scavenging activity across various polyphenol groups. These groups include flavonoids like myricetin, phenolic acids like caffeic acid and ferulic acid, as well as other phenolic subclasses. The inherent redox-active phenol moiety, common to almost all these compounds, is the key factor that confers their antioxidant properties.⁶⁰

The chemical properties and *in vitro* antioxidant capacity of polyphenols are also dependent on the phenolic hydrogens, as they act as hydrogen-donating radical scavengers. These properties can be described by the following main mechanisms: electron/proton donor and metal chelation properties. Along with flavonoids, phenolic acids are considered to be one of the most important and prevalent classes of non-flavonoid natural antioxidants. They can be found in a variety of matrices, such as plants and fruits. Phenolic acids, for example, gallic acid, caffeic acid, cinnamic acid, and other phenolic acid derivatives, are

considered very potent natural antioxidants. Analogous to flavonoids, the antioxidant potency of phenolic acids is enhanced when a greater number of hydroxyl (-OH) groups are attached to the aromatic ring structure.⁶¹

Antimicrobial activity

The highest inhibition is got with P6 and P8 against *E. coli* with 18 mm of inhibition zone diameter both. These results are better than those found by Ilie et al.⁶² that recorded inhibition diameters of bee pollen samples from Romania between 14.40 and 16 mm. The study carried in the present work is in agreement with the one made by Kacaniová et al.⁶³ on Slovakia samples where it was found that *E. coli* is the most sensitive strain to ethanolic extract of bee pollen with inhibition diameter of 3 mm.

The two samples P7 and P10 gave inhibition zone diameters of 12 and 15 mm, respectively with *S. typhimurium* strain. These results are much higher than those found in the study of Abd Elhamid and Elbayoumi⁶⁴ made on Egyptian bee pollen that gave inhibition diameters ranging from 3 to 10 mm.

MIC values for the three stains *E. coli*, *S. typhimurium* and *Y. pestis* in our study range from 2.5 mg/ml to 5 mg/ml which means that they are in the same range of those of Soares de Arruda et al.⁶⁵ on Brazilian bee pollen 70% ethanol extract.

The samples P1, P3, P5, P11 and P14 didn't show any antibacterial effect while for antifungal activity none of the samples showed efficiency. From these results it can be deduced that bee pollen samples are more effective against Gram negative bacteria. The results of this study are similar to those of a Slovenian one⁶⁶ where it was demonstrated that bee pollen ethanol extract was more effective on Gram negative than Gram positive bacteria. This can be explained by the structural differences existing between Gram positive and Gram negative bacterial membranes.

From the present work it can be confirmed that antibacterial effect of bee pollen is due to the phytochemical composition and bacterial membrane structure rather than the sample original floral because there were found effective and non effective samples from both types (mono and poly-floral). Other factors also can influence such as the extraction solvent used and its concentration.⁶⁶ It has been reported in literature that phenolic compounds like phenolic acids and flavonoids present in bee pollen exert their antibacterial effect by destroying cell's membrane leading thus to a loss of potassium and initiation to the cell's autolysis.⁶⁷ According to Vinnikov et al.,⁶⁸ flavonoids exert their antimicrobial effect firstly by causing membrane damage inducing then a chain of events manifesting as loss of biosynthetic activity and inhibition of DNA, RNA and proteins synthesis. The membrane damage affects also the respiratory chain and ATP production.

Enzymatic activities

Anti-AChE activity. Acetylcholinesterase is a key enzyme ensuring the hydrolysis of acetylcholine which is a neurotransmitter allowing the normal transmission of nerve impulses.⁶⁹ The IC₅₀ values obtained in the present study are higher than those of Silva Araújo¹⁰ for Brazilian bee pollen samples where the IC₅₀ was 827.48 and 967.53 for some samples.

AChE contains in its active site a catalytic triad of Ser 200-His 440-Glu327 that is responsible of the catalytic machinery. It contains also other aromatic amino acids at the entrance of the gorge Tyr341, Tyr72 and Tyr124 called peripheral anionic site ensuring the modulation of the entry of different molecules (substrates or inhibitors). Some polyphenols compounds like flavonoids can inhibit AChE by occupying the active site or by blocking the entrance for acetylcholine in peripheral anionic site before reaching the active site.⁷⁰

Anti- α -glucosidase activity. The α -glucosidase enzyme is located in the brush border of the small intestine's epithelium. This enzyme is responsible for breaking down disaccharides and starch into glucose. Inhibiting this enzyme leads to a delay in the absorption of carbohydrates from the digestive tract, which is a very important strategy, particularly for individuals with diabetes.^{71,72}

That's why it's important to find natural inhibitors for this enzyme having therefore hypoglycemic effect.

α -IGlucosidase inhibition IC₅₀ values are found to correlate in a highly significant way ($p < 0.01$) with gallic acid ($r = -0.75$) and coumaric acid ($r = -0.71$); and in a significant ($p < 0.005$) way with myricetin ($r = -0.67$).

In this study, the sample P12 has the best activity against α -glucosidase with IC₅₀ of 134 $\mu\text{g/ml}$. These results are better than those given by Bakour et al.⁷³ for moroccan bee pollen where the best activity is 820 $\mu\text{g/ml}$.

The literature has reported that the activity of phenolic compounds is due to their special structural features or functional groups that have an affinity for the active site of the α -glucosidase enzyme. For instance, the 3-OH group in the C-ring and the catechol group (3'-OH and 4'-OH) in the B-ring of flavonoids contribute to their α -glucosidase inhibitory activity through hydrogen bonding (H-bond) interactions with the active site of the α -glucosidase enzymes.⁷⁴

SOD activity. SOD is effective defense enzyme of oxidoreductase family that catalyzes the dismutation of superoxide $\text{O}_2^{\cdot-}$ anions into oxygen O_2 and hydrogen peroxide (H_2O_2). It is responsible for the first and most robust enzymatic response to free-radical generation and oxidative stress.⁷⁵

Different correlations are observed between SOD IC₅₀ and antioxidant compounds in particular a highly significant one ($p < 0.01$) with hesperitin ($r = -0.78$) and a significant

one ($p < 0.05$) with gallic acid ($r = -0.70$) and t-cinnamic acid ($r = -0.65$).

All these results are confirmed by the fact that P14 present the best SOD activity. Actually P14 is the richest sample in terms of t-cinnamic acid (208.82 $\mu\text{g/g}$) and hesperitin (67.35 $\mu\text{g/g}$). So P14 is the sample which has the best composition combination for optimal SOD activity.

Cell viability test by micro culture tetrazolium technique (MTT)

From the results, it can be deduced that the bee pollen samples studied here are not toxic. The extracts are not only not toxic but also they have stimulated the proliferation of cells and this is reflected by the recorded absorbances and the percentages of cells viability which exceed 100 for many samples especially P5, P6, P7, P9, P13 and P14. According to these results P4, P7, P8 and P14 are selected to be tested in wound healing test and antiviral activity.

Wound healing test

Wound healing test serves to assess the degree of scratch closure and therefore the eventual healing power of the tested samples.⁴⁰ According to the results of this study, it can be said that bee pollen samples stimulate the cell proliferation and migration to the damaged tissue and then heals it especially P14 that shows the best capacity to restore tissues. These results confirm that bee pollen is a very promising product in wound healing use.

The results found in this test are in agreement with those found by Olczyk et al.⁷⁶ who compared the therapeutic efficacy of bee pollen extract to that of silver sulfadiazine which is standard treatment with notable side effects. The results of this study showed that bee pollen enhance strongly the healing process, stop the inflammation and reduce the treatment time without side effects.

Antiviral activity

According to the results of this test, the conclusion drawn is that bee pollen samples' anti-HSV-1 activity is not dose dependant because the best result got is at 600 $\mu\text{g/ml}$ but when the dose increase to 800 and 1000 $\mu\text{g/ml}$, the protection against HSV-1 infection decrease. This result is the same found by Chiamenti et al.³¹ whose the study demonstrate that antiviral activity is not dose dependant and explained it by the fact that the extract is a crude one and so it contains high amounts of substances which can present toxicity to the cells at higher concentrations despite their antiviral effect at lower ones.

Despite the good impact of natural substances against different kinds of infections especially flavonoids, sometimes high levels of these phytochemicals can induce toxicity.⁷⁷ That's why the cytotoxicity assessment in antiviral tests is indispensable to determine the concentrations with minimal tolerated toxicity against the host cells used in the study.⁷⁸

These parameters should be examined in the early stages of the study, as 30% of drug candidates fail due to their toxic effects.⁷⁹

In the literature, it has been reported that polyphenols in general have antiviral activity but each compound can act selectively on a virus and not another. For anti-HSV-1 virus activity, studies confirmed that phenolic compounds like quercitrin, resveratrol, rutin, hesperidin, luteolin, apigenin, chrysin, caffeic acid, gallic acid, catechin and others are very effective compounds.⁸⁰ According to that, the activity of bee pollen samples against HSV-1 can be explained by their polyphenols content especially those responsible of this activity that exist in a high amounts such as resveratrol and myricetin. The difference in efficiency between P4, P7, P8 and P14 can be explained by the difference in composition especially of phenolic compounds proportions and synergism within every bee pollen sample. Apparently, P7 has the best phenolic compounds combination for anti HSV-1 activity.

According to Kamboj et al.,¹¹ gallic acid, catechin, epicatechin, epigallocatechin, kaempferol, ellagic acid, rutin, morin, paraascorbic acid, quercetin, galagenin, apigenin, naringenin, luteolin, chrysin, analgin, rosmarinic acid and various gallates of phenolic acid are the most frequent polyphenols compounds with antiviral activity. In the present study, most of these polyphenols appear in the HPLC composition analysis of different bee pollen samples.

These compounds can exert their antiviral activity by acting on different targets: viral envelope, viral nucleic acid, viral proteins and other targets.

DNA protection activity

Supercoiled plasmid pBR322 DNA nuclease effects of extracts.

After electrophoretic migration for 90 min, the results show that the form I fragments remained intact in the absence and presence of extracts. These results indicate that no nuclease effect on DNA was observed at these extract concentrations and therefore it can be concluded that P6 and P10 are safe and not harmful to DNA.

Bee pollen extracts protective effects on supercoiled pBR322 plasmid DNA. The results confirm that extracts protected against DNA damage, probably by scavenging hydroxyl radical formed by Fenton reagent due to its antioxidant effects.

The results obtained here are in agreement with the study of Bridi et al.⁸¹ whose the study characterized twelve bee pollen samples from southern region of Chile and they found that bee pollen protects plasmid DNA from damages.

Principal component analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) is used to identify similarities and differences among the studied samples as well as to easily visualize the existing relationships between the various examined variables in a two-dimensional space (Figure 7(a) and 7(b)). From this analysis, it can be concluded that the 14 bee pollen samples are divided into three groups and the distribution is according to biological activities results and not according to floral origin (mono or polyfloral) because each group contains mixture of both types. The first group containing P2, P6, P7 and P10 is the group characterized by the highest amounts of antioxidant compounds and the best antioxidant activity against free radicals, DNA damage and antiviral activity.

The second group contains the biggest number of samples namely P4, P8, P9, P11, P12, P13 and P14, as shown by this study, these samples are average in terms of bioactive compounds but they have good biological activities such as antibacterial, enzymatic and wound healing activity.

The third group formed by P1, P3 and P5 is the group having the samples with average bioactive compounds and lower biological activities.

PCA confirmed the different correlations obtained in the correlation table by gathering in the same group each biological activity with phenolic compounds correlating with. It can be also deduced that each polyphenolic compound has specific activity.

Conclusion

In the present work, fourteen Algerian bee pollen samples were analyzed. In order to reveal their phenolic composition, HPLC-UV was used and this resulted in the highlighting of various polyphenols including phenolic acids, flavonoids, and stilbenes with different qualities and quantities across samples. Antioxidant activity was studied through DPPH, ABTS, FRAP, and reducing power tests.

The samples exhibited selective antibacterial activity against gram-negative bacteria namely *E. coli*, *S. typhimurium* and *Y. pestis*. Additionally, they inhibited AChE and α -glucosidase while activating SOD. The samples P6 and P10 protected DNA and P14 demonstrated the best wound healing activity, while P7 was the most effective against HSV-1. The statistical analysis revealed correlations between biological activities and bioactive compounds and this is confirmed with PCA showing clustering based on compound content rather than botanical origin.

In conclusion, the bee pollen samples analyzed in this study exhibit significant potential due to their promising biological activities. Further research is necessary to deepen and enhance our understanding of their effects and investigate the broader implications for health and nutrition.

Acknowledgments

We extend a big thank you to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for his support for scientific research.

ORCID iDs

Farida Bedjih  <https://orcid.org/0009-0001-7640-4795>

Salim Ouchemoukh  <https://orcid.org/0000-0001-7088-8621>

Nadia Amessis-Ouchemoukh  <https://orcid.org/0000-0002-1302-5704>

Amar Otmami  <https://orcid.org/0000-0002-8327-3498>

Hicham Zaidi  <https://orcid.org/0009-0003-5779-3056>

Yakup Kara  <https://orcid.org/0000-0003-3121-5023>

Cihan Inan  <https://orcid.org/0000-0003-0288-5917>

İkra Özkan  <https://orcid.org/0000-0002-3813-9599>

Statements and declarations

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Bogdanov S. *The bee pollen book*. Bulgaria: Bee product science, 2011.
- Kieliszek M, Piwowarek K, Kot A, et al. Pollen and bee bread as new health oriented products: a review. *Trends Food Sci Technol* 2018; 71: 170–180.
- Giampieri F, Quiles JL, Cianciosi D, et al. Bee products: an emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds. *J Agric Food Chem* 2022; 70: 6833–6848.
- Coe P. Bee bread in apitherapy. *J Am Apitherapy Soc* 2007; 14: 12–16.
- Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, et al. What is the future of bee-pollen? *J ApiProduct ApiMedical Sc* 2010; 2: 131–144.
- Gibriel A, Abdeldaiem M and Ali H. Use of the ethanolic extract of bee pollen (bee bread) and gamma irradiation for keeping the quality of silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) fish patties. *Arab J Nucl Sci Appl* 2016; 49: 140–150.
- Feás X, Pires J, Estevinho ML, et al. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *In J Food Sci Technol* 2010; 45: 1255–1262.
- Asnaashari M, Farhoosh R and Sharif A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. *Food Chemistry* 2014; 159: 439–444.
- Solfrizzi V, Custodero C, Lozupone M, et al. Relationships of dietary patterns, foods, and micro- and macronutrients with Alzheimer's disease and late-life cognitive disorders: a systematic review. *J Alzheimer's Dis* 2017; 59: 815–849.
- Silva Araújo J, Dechechi Chambó E, Pereira de Carvalho Costa MA, et al. Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 921–936.
- Kamboj A, Saluja AK, Kumar M, et al. Antiviral activity of plant polyphenols. *J Pharm Res* 2012; 5: 2402–2412.
- Bakchiche B, Kızılpınar Temizer I, Güder A, et al. Chemical composition and biological activities of honeybee products from Algeria. *J Appl Biotech Report* 2020; 7: 93–103.
- Zeghoud S, Rebiai A, Hemmami H, et al. ATR–FTIR spectroscopy, HPLC chromatography, and multivariate analysis for controlling bee pollen quality in some Algerian regions. *ACS Omega* 2021; 6: 4878–4887.
- Carpes TS, Begnini R, De Alencar SM, et al. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia* 2007; 31: 1818–1825.
- Benzie IF and Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol* 1999; 299: 15–27.
- Beretta G, Granata P, Ferrero M, et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta* 2005; 533: 185–191.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, et al. Iridoid Glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997; 80: 1144–1152.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology et Medicine* 1999; 26: 1231–1237.
- Ribani M, Collins CH and Bottoli CB. Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *J Chromatogr A* 2007; 1156: 201–205.
- De Villiers A, Lynen F, Crouch A, et al. Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia* 2004; 59: 403–409.
- CLSI. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2004.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

23. Yerlikaya O. Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo* 2014; 64: 268–279.
24. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement; CLSI Document M100–S17; Clinical Laboratory Standard Institute. Wayne, PA, USA, 2007.
25. Barut EN, Barut B, Engin S, et al. Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turkish J Biochem* 2017; 42: 493–502.
26. Şöhretoğlu D, Sari S, Özel A, et al. α -Glucosidase inhibitory effect of *Potentilla astracanica* and someisoflavones: inhibition kinetics and mechanistic insights throughin vitro and in silico studies. *Int J Biol Macromol* 2017; 105: 1062–1070.
27. Sabuncuoğlu S and Şöhretoğlu D. Evaluation of antihemolytic and antioxidant activities of *Geranium tuberosum* subsp. *tuberosum* with in vitro models. *Pharm Biol* 2012; 50: 1374–1379.
28. Takenouchi T and Munekata E. Amyloid beta-peptide-induced inhibition of MTT reduction in PC12h and C1300 neuroblastoma cells: effect of nitroprusside. *Peptides* 1998; 19: 365–372.
29. Rza dkowska M, Szaco NE, Kaczor AA, et al. Synthesis and antiviral activity of 1-(1,3- disubstitutedimidazolidyn-2-ylidene)-3-ethoxycarbonylmethylurea derivatives. *J Enzym Inhib Med Chem* 2016; 31: 361–368.
30. Şahin F, Koçak P, Yıldırım Güneş M, et al. In vitro wound healing activity of wheat-derived nanovesicles. *Appl Biochem Biotechnol* 2019; 188: 381–394.
31. Chiamenti L, Da Silva PF, SchalleMBERger K, et al. Cytotoxicity and antiviral activity evaluation of *Cymbopogon* spp hydroethanolic extracts. *Braz J Pharm Sci* 2019; 55: e18063.
32. Barut B and Demirbaş Ü. Synthesis, anti-cholinesterase, α -glucosidase inhibitory, antioxidant and DNA nuclease properties of non-peripheral triclosan substituted metal-free, copper(II), and nickel(II) phthalocyanines. *J Organomet Chem* 2020; 923: 121423.
33. Barut B, Barut EN, Engin S, et al. Investigation of the antioxidant, α - glucosidase inhibitory, anti-inflammatory, and DNA protective properties of *Vaccinium arctostaphylos* L. *Turkish J Pharm Sci* 2019; 16: 175–183.
34. Herken EN, Erel O, Guzel S, et al. Total antioxidant, phenolic compounds and total oxidant status of certified and uncertified Turkey's honeys. *Int J Food Prop* 2009; 12: 461–468.
35. Gungor N and Sengul M. Antioxidant activity, total phenolic content and selected physicochemical properties of white mulberry (*Morus alba* L.) fruits. *Int J Food Prop* 2008; 11: 44–52.
36. Aliyazıcıoğlu R, Sahin H, Erturk O, et al. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *Int J Food Prop* 2013; 16: 277–287.
37. Can Z, Yildiz O, Şahin H, et al. Phenolic profile and antioxidant potential of propolis from Azerbaijan. *Mellifera* 2015; 15: 16–28.
38. Sameer SK, Atul SR, Sathiyarayanan L, et al. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. *J Integr Med* 2014; 4: 379–389.
39. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, et al. HPLC Method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agricult* 1998; 77: 543–551.
40. Wolf NB, Küchler S, Radowski MR, et al. Influences of opioids and nanoparticles on in vitro wound healing models. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 73: 34–42.
41. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro proof-of concept. *J Ethnopharmacol* 2006; 106: 290–302.
42. Perron NR and Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53: 75–100.
43. Saral Ö, Kiliçarslan M, Şahin H, et al. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish J Vet Anim Sci* 2019; 43: 441–447.
44. Tezcan F, Kolayli S, Şahin H, et al. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. *J Food Nutr* 2011; 50: 33–40.
45. Boligon AA, Machado MM and Athayde ML. Technical evaluation of antioxidant activity. *Med Chem* 2014; 4: 517–522.
46. Jayanthi P and Lalitha P. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia crassipes* (mart.) solms. *Int J Pharm Pharma Sci* 2011; 3: 126–128.
47. Dos Santos Vasconcelos MR, Fernandes Duarte AW, Pereira Gomes E, et al. Physicochemical composition and antioxidant potential of bee pollen from different botanical sources in Alagoas, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia* 2017; 41: 447–458.
48. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002; 8: 121–137.
49. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26: 211–219.
50. Dulger Altiner D, Sandikci Altunatmaz S, Sabuncu M, et al. In vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. *Food Sci Technol*. 2021; 41: 133–141.
51. Atsalakisa E, Chinoua I, Makropouloua M, et al. Evaluation of phenolic compounds in *Cistus creticus* bee pollen from Greece. Antioxidant and antimicrobial properties. *Nat Prod Commun* 2017; 12: 1813–1816.
52. Morais M, Moreira L, Feás X, et al. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1096–1101.
53. Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, et al. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem* 2007; 100: 237–240.

54. Waś E, Szczesna T, Rybak-Chmielewska H, et al. Application of HPLC-DAD technique for determination of phenolic compounds in bee pollen loads. *J Apicult Sci* 2017; 61: 153–162.
55. Ulusoy E and Kolayli S. Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen. *J Food Biochem* 2014; 38: 73–82.
56. Rebiai A, Lanez T and Belfar ML. Determination of caffeic acid and gallic acid in Algerian bee pollen by an HPLC method. *Phytochem Biosub J* 2014; 8: 190–197.
57. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metast Rev* 2010; 29: 405–434.
58. Yim SH, Kim HJ, Park SH, et al. Cytotoxic caffeic acid derivatives from the rhizomes of *Cimicifuga heracleifolia*. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 1559–1565.
59. Markus MA and Morris BJ. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Int Aging* 2008; 3: 331–339.
60. Macêdo IYL, Garcia LF, Neto JRO, et al. Electroanalytical tools for antioxidant evaluation of red fruits dry extracts. *Food Chem* 2017; 217: 326–331.
61. Chiorcea-Paquim AM, Enache TA, De Souza Gil E, et al. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: towards a new food science methodology. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 2020; 19: 1680–1726.
62. Ilie CI, Oprea E, Geana EI, et al. Bee Pollen extracts: chemical composition, antioxidant properties, and effect on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Antioxidants* 2022; 11: 1–29.
63. Kacaniova M, Vukovic N, Chlebo R, et al. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch Biol Sci* 2012; 64: 927–934.
64. Abd Elhamid AM and Elbayoumi MM. Influence of bee pollen on the bioactive behavior, sensory and physico-chemical properties of white cheese made from camel and cow milk mixture. *J Food Dairy Sci* 2017; 8: 419–424.
65. Soares de Arruda VA, Viera dos Santos A, Sampaio DF, et al. Brazilian Bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *J Apicult Res* 2021; 60: 775–783.
66. Šimunović K, Abramovi H, Lilek N, et al. Microbiological quality, antioxidative and antimicrobial properties of Slovenian bee pollen. *AGROFOR Int J* 2019; 4: 82–92.
67. Erkmen O and Ozcan MM. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food* 2008; 11: 587–592.
68. Vinnikov AI, Oriabinskaia LB and Golodok LP. The effect of antibiotics on staphylococcal respiratory chain enzymes. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* 1994; 66: 51–58.
69. Khoirunisa V, Rusydi F, Kasai H, et al. A first principle study on the interaction between acetylcholinesterase and acetylcholine, and also rivastigmine in Alzheimer's disease case. *J Phys: Confer Ser* 2016; 739: 012136.
70. Xie Y, Yang W, Chen X, et al. Inhibition of flavonoids on acetylcholinesterase: binding and structure–activity relationship. *Food Funct* 2014; 5: 2582–2589.
71. Gericke B, Schecker N, Amiri M, et al. Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity. *J Biol Chem* 2017; 292: 11070–11078.
72. Bajpai VK and Kang SC. Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory effects of an abietane type diterpenoid taxodone from *Metasequoia glyptostroboides*. *Nat Acad Sci Lett* 2015; 38: 399–402.
73. Bakour M, Laaroussi H, Ferreira-Santos P, et al. Exploring the palynological, chemical, and bioactive properties of non-studied bee pollen and honey from Morocco. *Molecules* 2022; 27: 5777–5796.
74. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, et al. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32: 1216–1228.
75. Alscher RG, Erturk N and Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 2002; 53: 1331–1341.
76. Olczyk P, Koprowski R, Kafmierzczak J, et al. Bee pollen as a promising agent in the burn wounds treatment. *Evid-Based Complem Altern Med* 2016; 2016: 1–12.
77. Tang LI, Ling AP, Koh RY, et al. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complem Altern Med* 2012; 12: 1–10.
78. Di Nunzio M, Valli V, Tomás-Cobos L, et al. Is cytotoxicity a determinant of the different in vitro and in vivo effects of bioactives? *BMC Complem Altern* 2017; 17: 453.
79. Kola I and Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Disc* 2004; 3: 711–715.
80. Montenegro-Landívar MF, Tapia-Quirós P, Vecino X, et al. Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: an overview. *Sci Total Environ* 2021; 801: 149719.
81. Bridi R, Echeverría J, Larena A, et al. Honeybee pollen from southern Chile: phenolic profile, antioxidant capacity, bioaccessibility, and inhibition of DNA damage. *Front Pharmacol* 2022; 13: 775219.

Résumé

Ce travail est mené sur 14 échantillons de pollen d'abeille Algériens dans le but de déterminer leurs origines botaniques, teneurs en protéines, minéraux, composés bioactifs et activités biologiques. L'analyse pollinique donne 8 pollens monofloraux et 6 polyfloraux. Les pollens dominants appartiennent aux familles: *Cistaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae* et *Asteraceae*. Les protéines oscillent de 15 à 32 mg EBSA /g. Le potassium représente le minéral le plus abondant (801 à 987 mg/Kg) dans les pollens analysés. Les composés bioactifs dosés sont les polyphénols (19 à 39 mg EAG/g), flavonoïdes (3 à 5 mg ECA/g), proanthocyanidines (20 à 33 mg ECA/g) et caroténoïdes (0,5 à 1 mg E β CA/g). L'analyse HPLC montre une variabilité qualitative et quantitative de composés phénoliques dans les pollens analysés avec un total de 8 acides phénoliques, 8 flavonoïdes, un stilbène (resvératrol) et CAPE. Les pollens analysés montrent des propriétés biologiques qui varient d'un échantillon à l'autre: activités antioxydante, antibactérienne sélective contre *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Yersinia pestis*, enzymatique inhibitrice pour l'ACHe et l' α -glucosidase et activatrice pour la SOD, cicatrisante, anti-HSV-1 et protectrice de l'ADN. L'analyse statistique révèle des corrélations entre les différentes activités biologiques et les composés bioactifs des échantillons de pollen d'abeille.

Mots clés : Pollen d'abeille, analyse pollinique, antioxydants, HPLC-UV, activités biologiques.

Abstract

This work is carried out on 14 Algerian bee pollen samples with the aim of determining their botanical origins, protein content, mineral content, bioactive compounds, and biological activities. Pollen analysis reveals 8 monofloral and 6 polyfloral pollens. The dominant pollens belong to the families: *Cistaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae* et *Asteraceae*. Protein content varies from 15 to 32 mg EBSA/g. Potassium is the most abundant mineral (801 to 987 mg/Kg) in the analyzed pollens. The measured bioactive compounds include polyphenols (19 to 39 mg EAG/g), flavonoids (3 to 5 mg ECA/g), proanthocyanidins (20 to 33 mg ECA/g), and carotenoids (0.5 to 1 mg E β CA/g). HPLC analysis shows qualitative and quantitative variability of phenolic compounds in the analyzed pollens with a total of 8 phenolic acids, 8 flavonoids, one stilbene (resveratrol), and CAPE. The analyzed pollens exhibit varying biological properties from one sample to another: antioxidant activity, selective antibacterial one against *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia pestis*; enzyme inhibition for AChE and α -glucosidase; activation for SOD; wound healing; anti-HSV-1; and DNA protection. Statistical analysis reveals correlations between various biological activities and bioactive compounds in the bee pollen samples.

Keywords: bee pollen, pollen analysis, antioxidants, HPLC-UV, biological activities.

ملخص

أُنجزت هذه الدراسة على 14 عينة من غبار لقاح النحل الجزائري بهدف تحديد أصولها النباتية، محتوياتها من البروتينات، المعادن، المركبات النشطة بيولوجيًا والأنشطة البيولوجية. تُظهر تحليل حبوب اللقاح 8 حبوب لقاح أحادية الزهرة و6 حبوب لقاح متعددة الزهور. تنتمي حبوب اللقاح السائدة إلى العائلات *Cistaceae* و *Brassicaceae* و *Apiaceae* و *Fabaceae* و *Asteraceae*. تتراوح محتويات البروتينات بين 15 و32 ملغ EBSA/g. البوتاسيوم هو المعدن الأكثر وفرة (801 إلى 987 ملغ/كغ) في حبوب اللقاح التي تم تحليلها. المركبات النشطة بيولوجيًا التي تم قياسها تشمل البوليفينولات (19 إلى 39 ملغ EAG/g)، الفلافونويدات (3 إلى 5 ملغ ECA/g)، البروانثوسيانيدينات (20 إلى 33 ملغ ECA/g)، والكاروتينات (0.5 إلى 1 ملغ β CA/g). تُظهر تحليل HPLC تباينًا نوعيًا وكميًا للمركبات الفينولية في حبوب اللقاح التي تم تحليلها، مع إجمالي 8 أحماض فينولية، 8 فلافونويدات، ستيلبين واحد (ريسفيراترول) و CAPE. تُظهر حبوب اللقاح التي تم تحليلها خصائص بيولوجية متغيرة من عينة إلى أخرى: نشاط مضاد للأكسدة و مضاد للبكتيريا انتقائي ضد *E. coli* و *Salmonella typhimurium* و *Yersinia pestis*، تثبيط إنزيمي لـ AChE و α -glucosidase وتنشيط لـ SOD، شفاء الجروح، مضاد لـ HSV-1 وحماية للحمض النووي. تكشف التحليلات الإحصائية عن علاقات بين الأنشطة البيولوجية المختلفة والمركبات النشطة بيولوجيًا في عينات حبوب لقاح النحل.

الكلمات المفتاحية: حبوب لقاح النحل، تحليل حبوب اللقاح، مضادات الأكسدة، HPLC-UV، الأنشطة البيولوجية.