

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITÉ MOULOU D MAMMERRI DE TIZI-OUZOU**  
**FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES**  
**AGRONOMIQUES**  
**DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



***Mémoire de fin d'études***

***En vue de l'obtention de diplôme de Master***

***Filière : Biotechnologie***

***Spécialité : Biotechnologie microbienne***

**Evaluation des propriétés biologiques du pollen d'abeille et  
recherche d'effet synergique avec la Nisine**

**Réalisé par :**

M<sup>elle</sup> ILLOUL Sakina

M<sup>elle</sup> SMAHI Manel

**Devant les membres du jury :**

**Président : Mr MEDJBEUR D.**

**Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Promoteur : Mr OUELHADJ A.**

**Professeur à l'UMMTO**

**Examinatrice : Mme DJOUBER-TOUDERT F.**

**Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Année universitaire 2023 – 2024**

## *Remerciements*

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur, M<sup>r</sup> **OUELHADJ A.**, dont la disponibilité, les conseils avisés et les commentaires rigoureux ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail. Sa patience et son expertise ont été des piliers sur lesquels nous nous sommes appuyés tout au long de cette aventure intellectuelle.

Nous remercions également avec une sincère reconnaissance les membres du jury, qui ont eu la bienveillance de porter une appréciation sur ce travail et de participer à la soutenance. Leur regard critique et constructif a enrichi notre réflexion et affiné notre analyse.

Un hommage éternel à tous les enseignants qui nous ont encadrés depuis nos premières années d'études jusqu'à aujourd'hui. Leur passion pour l'enseignement et leur dévouement inlassable ont façonné non seulement notre parcours académique mais aussi notre vision du monde et notre quête de savoir.

Merci infiniment à nos amis et collègues, dont la présence et le soutien moral ont été inestimables. Leurs encouragements, leurs conseils et leurs discussions stimulantes nous ont aidés à surmonter les nombreux défis rencontrés sur ce chemin.

Enfin, c'est avec une émotion particulière que nous adressons notre gratitude et notre amour infini à nos familles. Leur soutien inconditionnel, leur compréhension et leurs sacrifices ont été une source constante de force et de motivation. C'est aussi grâce à eux que ce mémoire a pu voir le jour. Leur foi en nous a été notre phare dans les moments de doute et notre boussole pour persévérer.

Avec toute notre reconnaissance et notre affection.

## *DÉDICACE*

Avec une profonde gratitude et des mots sincères,

Je dédie humblement ce travail de fin d'étude à mes chers parents, dont le dévouement et les conseils éclairés ont pavé mon chemin vers la réussite. Ils ont tant sacrifié pour mon éducation, et j'espère pouvoir un jour leur rendre ne serait-ce qu'une fraction de ce qu'ils ont fait pour moi. Que Dieu leur accorde bonheur et longue vie.

À mes frères et ma chère sœur, pour leur soutien indéfectible et leurs encouragements constants tout au long de ce parcours.

À ma grand-mère, dont la force et la sagesse ont marqué ma vie de manière indélébile. Ce mémoire est un hommage à votre influence précieuse et votre amour inconditionnel.

À ma famille, mes proches, et à tous ceux qui m'entourent avec amour et vivacité.

À mes amis et camarades, merci pour votre soutien et votre aide, ainsi qu'à tous mes professeurs pour leur guidance tout au long de mes études.

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

*SAKINA. I*

# *DÉDICACE*

Avec une reconnaissance profonde et des paroles sincères,

Je dédie cet humble mémoire à mes chers parents, dont le soutien infaillible et les sacrifices inestimables ont été essentiels à mon succès académique. Leur dévouement et leurs efforts ont constitué la base solide sur laquelle j'ai pu construire mon parcours.

Je dédie également ce travail à mon frère, à ma famille, à mes amis, ainsi qu'à tous mes professeurs qui m'ont guidé tout au long de ce parcours académique. Leur soutien et leur enseignement ont enrichi mon expérience et contribué à mon développement.

Dans l'espoir que ce modeste travail puisse témoigner de ma reconnaissance éternelle envers ceux qui me sont chers.

*MANEL. S*

**List des abreviation**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

Introduction ..... 1

**Synthèse bibliographique**

**Chapitre I : Généralité sur le pollen**

I.1. Définition du pollen ..... 3  
I.2. Structure et aspect du pollen ..... 3  
I.3. Pollinisation du pollen ..... 4  
I.4. Composition nutritionnelle du pollen ..... 5  
I.5. Activités biologiques du pollen ..... 7  
    I.5.1. Activité antioxydant ..... 7  
    I.5.2. Activité antibactérienne..... 8  
    I.5.3. Activité anti-inflammatoire ..... 8

**Chapitre II : Notion sur la Nisine**

II.1. Définition..... 9  
II.2. Composition de la nisine ..... 9  
II.3. Mode d'action..... 10  
II.4. Toxicité et application de la nisine ..... 11

**Chapitre III : Résistance bactérienne aux antibiotiques**

III.1. Définition des antibiotiques ..... 13  
III.2. Définition de la résistance ..... 13  
III.3. Types de résistance..... 13  
    III.3.1. Résistance naturelle ..... 13  
    III.3.2. Résistance acquise ..... 14  
        III.3.2.1. Mécanismes de résistance ..... 14  
            III.3.2.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique ..... 15  
            III.3.2.1.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique..... 15  
            III.3.2.1.3. Pompes à efflux ..... 15  
            III.3.2.1.4. Perméabilité réduite..... 16  
            III.3.2.1.5. Protection de la cible de l'antibiotique..... 16  
            III.3.2.1.6. Piégeage de l'antibiotique ..... 16

## Partie expérimentale

### Matériel et Méthodes

<b>I. Matériel</b> .....	17
1.Appareillages et réactifs .....	17
2.Matériel biologique .....	17
3. Les antibiotiques .....	18
4.La Nisine .....	18
<b>II. Méthodes</b> .....	18
1.Échantillonnage .....	18
2.Classification de pollen par teinte chromatique .....	18
3.Analyses physico-chimiques .....	19
3.1.Potentiel d'hydrogène (pH).....	19
3.2.La teneur en eau (Humidité) .....	20
4.Préparation des extraits de pollen.....	21
5.Evaluation de la teneur totale en polyphénols (TPC).....	22
6.Evaluation de la teneur totale en flavonoïdes (TFC).....	24
7.Evaluation de l'activité antioxydant de pollen .....	25
8.Evolution de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par la méthode de dénaturation des SAB (BSA) .....	27
9.Evaluation de l'activité antibactérienne .....	28
9.1.Milieu de culture .....	29
9.2.Préparation de pré-culture (réactivation des souches) .....	29
9.3.Vérification de la pureté des souches bactériennes .....	31
9.4. Préparation de la suspension bactérienne et standardisation .....	31
10.Evolution de l'activité antimicrobienne .....	32
10.1.Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de pollen.....	32
10.2.Etude de l'activité antibactérienne de la nisine .....	32
11.Etude de l'effet de combinaison des extraits de pollen avec la nisine .....	33
12.Analyse statistique.....	34

### Résultats et discussion

1.Triage de pollen selon la couleur .....	35
2.Analyses physico-chimiques de pollen .....	36
2.1. Potentiel d'hydrogène (pH).....	36
2.2. La teneur en eau (Humidité) .....	37
3.Evolution de la teneur totale en phénols (TPC) .....	38
4.Les flavonoïdes .....	40
5.Evolution de l'activité antioxydant .....	41
6.Résultat d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	42
6.1.Test d'inhibition de la dénaturation protéique.....	42
7.Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne .....	44
7.1.Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose .....	45
7.1.1.Résultats des témoins négatifs réalisés avec un solvant organique .....	45
7.1.2.Résultats des témoins positifs.....	45
7.2.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux échantillons du pollen .....	47
7.3.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la nisine .....	50
8.Résultats de la combinaison des échantillons du pollen avec la nisine.....	53
8.1. Résultats de la combinaison du pollen jaune et de la nisine .....	56
8.2. Résultats de la combinaison du pollen orange et de la nisine .....	57
9.Résultats des analyses statistiques.....	60
9.1. Potentiel d'hydrogène (pH).....	60
9.2. Teneur en eau (Humidité) .....	60
9.3. Teneur en polyphénols.....	61
9.4. Teneur en flavonoïdes.....	61
9.5. Activité antioxydant (DPPH).....	61
9.6. Activité anti-inflammatoire .....	61
9.7. Activité antimicrobienne .....	61
9.8. Synergie Pollen-Nisine.....	62
9.8.1. Pollen jaune- Nisine.....	62
9.8.1. Pollen orange-Nisine .....	63
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>64</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

**BSA** : Bovine Sérum Albumine

**DHA** : L'acide docosahexaénoïque

**DHB** : L'acide dihydrobutyrate

**DO** : Densité optique

**DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

**EAG/g pollen** : Équivalent acide gallique par gramme de pollen

**EQE/g pollen** : Équivalent quercetin par gramme de pollen

**GN** : Gélose Nutritive

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance

**MH** : Mueller Hinton

**pH** : Potentiel hydrogène

**TFC** : Evaluation de la teneur totale en flavonoïdes

**TPC** : Evaluation de la teneur totale en polyphénols

**UFC** : Unité formant colonie

**UV-Vis** : Ultraviolet-visible

**PBS** : Solution saline de tampon phosphate

<b>Figure 01</b> : Récolte de pollen par l'abeille .....	3
<b>Figure 02</b> : Structure de grain de pollen .....	4
<b>Figure 03</b> : schéma montrant les deux modes de pollinisation : vent et insectes.....	5
<b>Figure 04</b> : Composition biochimique moyenne du pollen frais .....	7
<b>Figure 05</b> : Schéma représentant la structure de la nisine A et la nisine Z.....	10
<b>Figure 06</b> : Mécanisme d'action de la nisine .....	11
<b>Figure 07</b> : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative .....	14
<b>Figure 08</b> : Schéma détaillant les étapes de mesure de pH des échantillons de pollen analysés. ....	19
<b>Figure 09</b> : Mesure de pH d'échantillon de pollen par pH-mètre (METROHM) .....	20
<b>Figure 10</b> : Illustration des différentes étapes de préparation des extraits de pollen en utilisant le solvant d'éthanol .....	22
<b>Figure 11</b> : Protocole d'évaluation des polyphénols .....	23
<b>Figure 12</b> : Protocole d'évaluation des flavonoïdes .....	24
<b>Figure 13</b> : Structure chimique du radicale libre DPPH (2,2 Diphenyle-1-picryl-Hydrazyle)... ..	25
<b>Figure 14</b> : Illustration représente la solution du DPPH préparée. ....	26
<b>Figure 15</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH. ....	27
<b>Figure 16</b> : Les cinq souches bactériennes obtenues après ensemencement sur milieu gélose nutritif (GN) .....	30
<b>Figure 17</b> : Résultats des témoins positifs réalisés avec les antibiotiques Gentamicine (G) et pénicilline (P) et le témoin négatif : l'éthanol (E) sur les cinq souches bactériennes testées .....	46
<b>Figure 18</b> : Effet des échantillons du pollen jaune et orange, ainsi que de la nisine, sur les cinq souches bactériennes testées .....	48

**Figure 19 :** Résultats de la combinaison de 50% du pollen orange avec 50% de nisine et de la combinaison de 50% du pollen jaune et 50% de nisine ..... 54

**Figure 20 :** Résultats de la combinaison de 75% du pollen (jaune et orange) et 25% de nisine, et de la combinaison de 25% du pollen (jaune et organe) avec 75% de nisine..... 55

<b>Tableau I :</b> Souches bactériennes .....	17
<b>Tableau II :</b> Antibiotiques.....	18
<b>Tableau III :</b> Proportions de chaque couleur de pollen récolté à la wilaya de Tizi-Ouzou ....	35
<b>Tableau IV :</b> Valeurs moyennes du pH et de la teneur en eau des différents pollens analysés sont présentées avec leur écart type associé. ....	36
<b>Tableau V :</b> Résultats du dosage des polyphénols des extraits éthanoliques pour les deux échantillons de pollen en mg EAG/g.....	39
<b>Tableau VI :</b> Résultats obtenus du dosage des flavonoïdes des extraits éthanoliques pour les échantillons de pollen en mg EQ/g .....	40
<b>Tableau VII :</b> Pourcentage d’inhibition du DPPH des extraits éthanoliques pour les deux échantillons du pollen étudiés .....	41
<b>Tableau VIII :</b> Effet des deux extraits de pollen sur l’activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par la méthode de dénaturation de l’albumine sérique bovine.....	43
<b>Tableau IX :</b> Résultats des diamètres des zones d’inhibition en mm (moyenne ±écart type) des deux antibiotiques sur cinq souches bactériennes .....	47
<b>Tableau X :</b> Résultats de test de sensibilité des souches bactériennes pour les échantillons du pollen jaune et orange testés. ....	49
<b>Tableau XI :</b> Résultats du test de sensibilités des souches bactériennes à la nisine dissoute dans l’HCL à 0,02N.....	51
<b>Tableau XII :</b> Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l’échantillon du pollen jaune et la nisine.....	56
<b>Tableau XIII :</b> Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l’échantillon du pollen orange et la nisine .....	58

# **Introduction**

Depuis des siècles, le pollen a captivé l'attention pour ses propriétés exceptionnelles en tant que source de nutrition et de bienfaits médicaux (Pascoal *et al.*, 2014). Initialement reconnu pour sa valeur nutritive pour les abeilles productrices de miel, le pollen est désormais salué comme un super aliment aux multiples facettes.

À travers les époques, sa composition riche en glucides, protéines et lipides en a fait un complément alimentaire naturel de premier choix, favorisant des fonctions biochimiques essentielles et renforçant les systèmes immunitaire et physiologique chez l'homme (Bogdanov, 2014). Toutefois, cette richesse nutritionnelle n'est pas sans nuances, le pollen pouvant également contenir des allergènes et autres composés potentiellement nocifs qui nécessitent une évaluation attentive (Bruneton, 2009).

À la croisée de la science et de la nutrition, le pollen continue de susciter un vif intérêt, notamment pour ses propriétés antimicrobiennes prometteuses qui pourraient transformer tant l'industrie alimentaire que les pratiques médicales (Schmidt et Buchmann, 1992 ; Pascoal *et al.*, 2014).

Parallèlement, les avancées dans le domaine des bactéries lactiques, telles que *Streptococcus lactis*, ont suscité un enthousiasme croissant parmi les chercheurs. Ces micro-organismes sont reconnus pour leur capacité à produire des bactériocines, des composés antibactériens qui affectent largement les micro-organismes responsables de l'altération des aliments et les agents pathogènes. Cette caractéristique a ouvert de nouvelles voies dans l'industrie agro-alimentaire, offrant des perspectives prometteuses pour leur utilisation en tant que conservateurs naturels. De plus, dans les domaines médical et vétérinaire, les bactériocines montrent un potentiel significatif en tant qu'agents antimicrobiens innovants. En ciblant spécifiquement la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif, les bactériocines provoquent la formation de pores qui perturbent la fonction cellulaire et compromettent la survie des micro-organismes visés. Cette dualité entre l'exploration des propriétés nutritionnelles du pollen et l'innovation dans les applications des bactériocines illustre l'ampleur et la diversité des défis et des opportunités dans le domaine des sciences alimentaires et de la santé publique.

Ce mémoire s'engage à explorer ces deux axes de recherche cruciaux, offrant une analyse approfondie et une réflexion critique sur leur impact potentiel et leurs implications pour l'avenir.

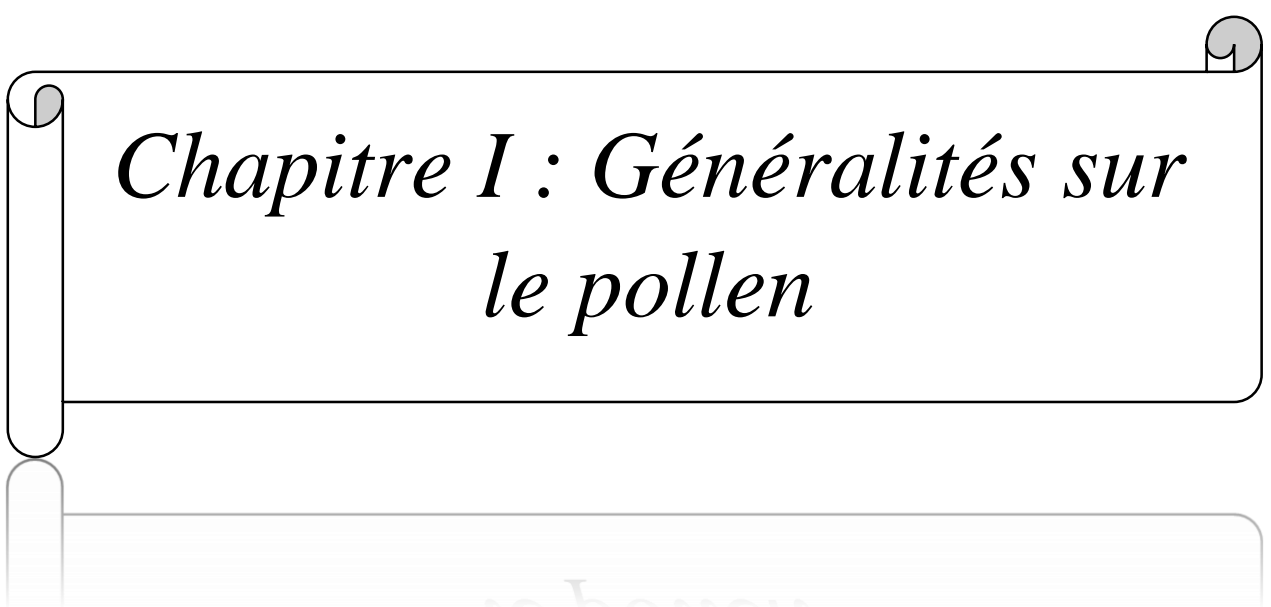
L'objectif de cette étude est d'évaluer les caractéristiques physicochimiques et quelques propriétés biologiques telles que l'activité antimicrobienne de pollen monofloral seul et en combinaison avec la nisine.

Notre étude est structurée en trois parties distinctes :

- La première partie propose une synthèse bibliographique couvrant les aspects généraux du pollen, ses activités biologiques, ainsi que l'étude de la nisine et de la résistance microbienne aux antibiotiques ;
- La deuxième partie présente le matériel utilisé et la méthodologie employée pour les analyses physico-chimiques, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydant et antibactérienne ;
- La troisième partie expose les résultats obtenus au cours de cette étude et leur discussion. En vue de formuler des conclusions robustes et d'identifier des perspectives futures.

# Synthèse

# Bibliographique

A decorative frame resembling a scroll, with a black border and rounded corners. The top-right corner has a small grey circle with a white number '1' inside. The text is centered within the frame.

# *Chapitre I : Généralités sur le pollen*

### I.1. Définition du pollen

Le pollen, dérivé du grec « pâle » signifiant à la fois farine et poussière pollinique (Donadieu, 1982), est une fine poussière produite dans les loges des anthères des plantes à fleurs (Figure 01). Composé de grains microscopiques, il est essentiel pour la pollinisation et la reproduction des plantes (Charpin, 2004). À maturité, les anthères des étamines libèrent le pollen, qui apparaît sous forme de corpuscules de petite taille (de 5 à plus de 300  $\mu\text{m}$ ), de forme sphérique ou en bâtonnet, et de durée de vie variable (de quelques minutes à quelques jours) (Marouf, 2007). Chaque grain de pollen produit les gamètes mâles, ce qui en fait le gamétophyte mâle des plantes à graines (et non le gamète mâle lui-même) (Marouf, 2007).



**Figure 01** : Récolte de pollen par l'abeille (Jean-Marie, 2022).

### I.2. Structure et aspect du pollen

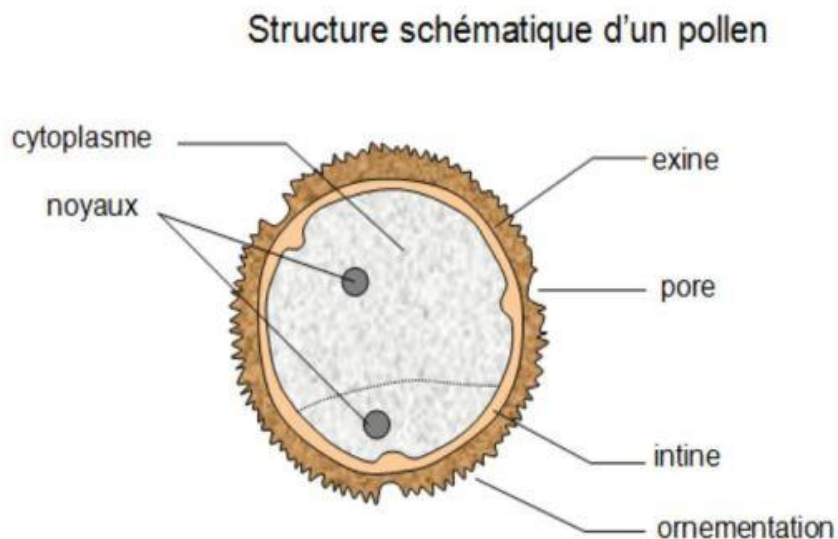
Les grains de pollen, sont des cellules vivantes de forme plus ou moins ovoïde, dont le diamètre variant entre 15 et 45 microns en fonction du genre et de l'espèce (Philippe, 1991). Chaque grain est constitué de cellules végétatives et génératives entourées par une double paroi de type matrice (Denisowa et Marta, 2016).

La paroi du grain de pollen se divise en deux couches distinctes (Figure 02) : l'exine, une couche externe spécifique à chaque espèce, qui est composée de matières grasses, flavonoïdes, vitamines, et antioxydants insolubles. La sporopollénine, est un polymère de composés phénoliques et de dérivés d'acides gras. C'est une substance extrêmement résistante

qui protège le grain de pollen contre les rayons UV, du soleil, du vent, et la dessiccation (Guerriat, 2000).

L'intine, une couche interne est constituée de cellulose et présente une structure similaire à celle d'une paroi cellulaire végétale (Blackmore *et al.*, 2007) et de composés pectiques (Chauzat *et al.*, 2005).

Des zones différenciées de l'exine des grains de pollen et des spores appelés Apertures, présentant une moindre résistance et permettant la sortie du tube pollinique ou du prothalle lors de la reproduction des plantes (Misset *et al.*, 1989).



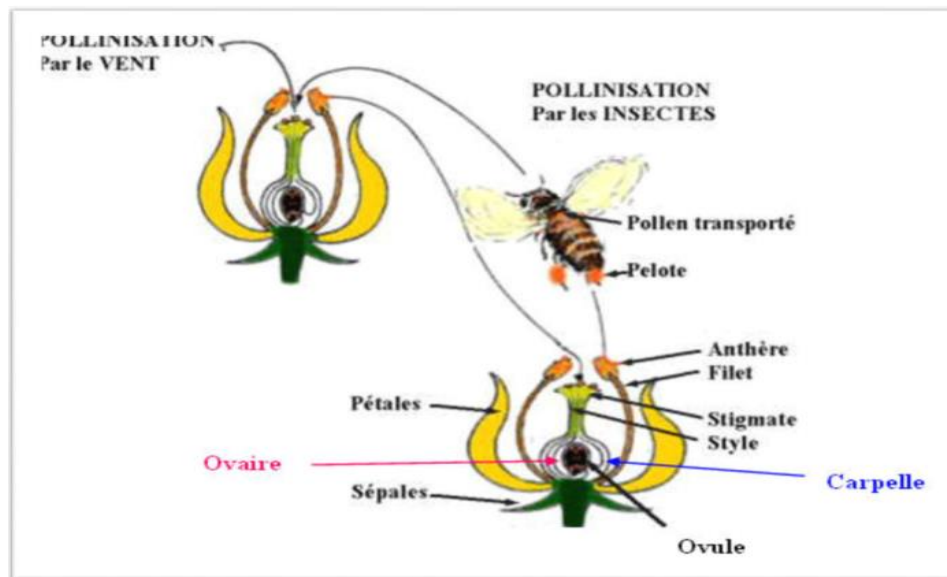
**Figure 02** : Structure de grain de pollen (Nicolson, 2011).

### I.3. Pollinisation du pollen

La pollinisation est un processus crucial pour la reproduction des plantes à fleurs, impliquant le transfert des grains de pollen des anthères d'une fleur au stigmate d'une autre. Ce transfert peut être assuré par des agents biotiques comme les insectes, les oiseaux et les chauves-souris, ou par des agents abiotiques tels que le vent et l'eau (Faegri et Van der Pijl, 1979) (Figure 03). Les grains de pollen présentent diverses adaptations en fonction de leur mode de transport. Les grains anémophiles, transportés par le vent, sont souvent petits, légers et produits en grande quantité pour maximiser les chances de pollinisation réussie (Whitehead,

1969). À l'inverse, les grains entomophiles, transportés par les insectes, sont généralement plus gros et collants, facilitant leur adhésion aux corps des pollinisateurs (Proctor *et al.*, 1996).

Lorsqu'un grain de pollen atteint un stigmate réceptif, il germe et forme un tube pollinique qui croît à travers le style jusqu'à l'ovaire. Ce tube permet le passage des noyaux génératifs jusqu'à l'ovule, où la fécondation se produit, donnant naissance à une nouvelle graine (Lord et Russell, 2002). La complexité et l'efficacité de ce processus reflètent les adaptations évolutives sophistiquées des plantes pour assurer leur reproduction sexuée.



**Figure 03** : Schéma montrant les deux modes de pollinisation : vent et insectes (Benachour, 2008).

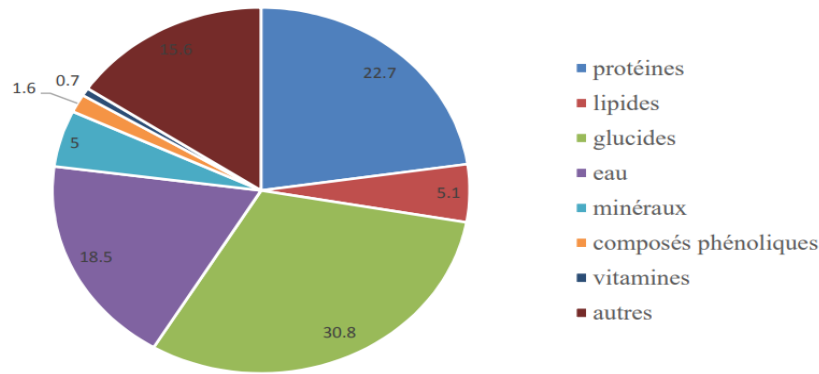
#### I.4. Composition nutritionnelle du pollen

Le pollen est considéré comme un super aliment en raison de sa richesse en composés nutritionnels et en microéléments, bien que sa composition puisse varier en fonction de l'origine botanique, de la saison de récolte et des méthodes de stockage (Figure 04).

- La teneur en eau du pollen d'abeille fraîchement récolté se situe entre 20 et 30 % (Campos *et al.*, 2008), mais doit être réduite pour éviter la croissance bactérienne

et fongique. Le pollen séché doit contenir entre 4 % et 10 % d'eau selon les législations (Philippe, 1991 ; Ravazzi, 2007).

- Protéines : sont le composant le plus important du pollen après les glucides, principalement présentes dans le cytoplasme du grain de pollen et fournissant les nutriments essentiels aux abeilles (Chausat, 2005). Ils varient considérablement dans le pollen collecté à partir de différentes sources végétales. Les proportions de protéines essentielles au fonctionnement du corps humain varient de 10 à 40 % (Thakur et Nanda, 2020) du poids sec selon l'espèce végétal, l'origine florale (Szczesna, 2006), et la zone géographique de récolte (Pernal *et al.*, 2000).
- Acides aminés : Il contient tous les acides aminés essentiels à la nutrition humaine et des abeilles, avec des teneurs totales variant de 108,1 à 287,7 mg/g de pollen sec. Cette composition en acides aminés peut indiquer la fraîcheur et la qualité du pollen (Proctor *et al.*, 1996 ; Whitehead, 1969).
- Glucides : les principaux types de sucre les plus courants du pollen d'abeille sont principalement des polysaccharides comme le glucose et le fructose et le saccharose, sont utilisés dans la fabrication des pelotes (Cousin, 2014). Leur concentration peut monter jusqu'à 60% (Human *et al.*, 2006).
- Vitamines : Les vitamines du groupe B sont les plus abondantes dans le pollen, la vitamine C, la vitamine E (tocophérols) et la provitamine A ( $\beta$ -carotène) (Donadieu, 1983).
- Fibres alimentaires : Incluant l'hémicellulose, la cellulose, et la lignine, elles varient entre 0,3 et 20 g/100 g de poids sec selon l'origine botanique et les méthodes d'hydrolyse utilisées (Lord & Russell, 2002).
- Les composés phénoliques : Les polyphénols contenus dans le pollen sont très abondants. Ce sont des polyphénols à chaîne courte comme les flavonoïdes (Arràez-Romàn *et al.*, 2007).



**Figure 04 :** Composition biochimique moyenne du pollen frais (Katarzyna *et al.*, 2015).

### I.5. Activités biologiques du pollen

Le pollen est hautement valorisé en apithérapie pour ses multiples applications médicales et nutritionnelles potentielles. Il présente diverses activités telles que des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoire, ainsi que d'autres bénéfiques (Pascoal *et al.*, 2014).

#### I.5.1. Activité antioxydant

Le pollen constitue une source abondante d'antioxydants, particulièrement de composés phénoliques comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les anthocyanes. Ces antioxydants sont essentiels pour la protection des cellules contre les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres, produits lors des processus métaboliques normaux et capables de provoquer des lésions cellulaires (Saral *et al.*, 2019).

Diverses études ont confirmé une forte activité antioxydante du pollen d'abeille ainsi que sa capacité à prévenir l'oxydation des lipides, grâce à sa teneur élevée en flavonoïdes.

Cependant, il est important de noter que l'activité antioxydante du pollen peut varier selon plusieurs facteurs comme l'espace végétale d'origine, le moment de récolte, le traitement de post-récolte. Par conséquent, les résultats des recherches peuvent être influencés par ces facteurs (Aylanc *et al.*, 2021).

### I.5.2. Activité antibactérienne

L'augmentation préoccupante de la résistance des bactéries aux antibiotiques a suscité un intérêt croissant pour les propriétés antibactériennes du pollen (Ellof *et al.*, 2005 ; Sayari *et al.*, 2016).

Des recherches menées par la Fédération Internationale des Associations d'Apiculture (Apimondia) en 2001 ont démontré une efficacité significative du pollen *in vitro* contre un large éventail de bactéries, notamment les bactéries Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, ainsi que les Gram négatives comme *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces études ont mis en lumière le pouvoir bactériostatique et bactéricide du pollen, influencé par son origine géographique.

Cette activité antibactérienne du pollen est intimement liée à sa richesse en quercétine, kaempférol et acides phénoliques. Ces composés interagissent avec les adhésines des parois cellulaires bactériennes, ainsi qu'avec les polypeptides et enzymes membranaires exposés en surface. Ces interactions conduisent à une altération de l'intégrité de la paroi cellulaire, perturbant les canaux ioniques essentiels (Aboshora *et al.*, 2014).

La composition en bioactifs du pollen peut varier en fonction de son origine et la période de récolte. De plus, la sensibilité micro-organismes aux propriétés antibactériennes du pollen peut également varier (Gercek *et al.*, 2022).

### I.5.3. Activité anti-inflammatoire

Le pollen est reconnu par son efficacité anti-inflammatoire, comparable à celle des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Pascoal *et al.*, 2014).

Il contient des flavonoïdes, des acides phénoliques, des acides gras, des  $\beta$ -carotènes, qui modulent les pro-inflammatoires et couramment utilisée contre les inflammation chroniques (Choi, 2007 ; Maruyama *et al.*, 2010 ; Bee-hexagon, 2011).

Des études cliniques ont confirmé ces propriétés anti-inflammatoire, notamment dans l'hypertrophie bénigne de la prostate, où l'utilisation de pollen a significativement réduit les symptômes inflammatoires (Rzepecka-Stojko *et al.*, 2015).



*Chapitre II : Notions sur la  
Nisine*

## II.1. Définition

La nisine est une bactériocine, de nature protéique produite par des bactéries lactiques, et qui présente des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Cette bactériocine a été commercialisée pour la première fois dans les années 50 pour inhiber la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* responsable du gonflement tardif du fromage (García *et al.*, 2010).

En 1988, elle a été reconnue GRAS (généralement reconnu comme sûr) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis et est utilisée en tant qu'agent de conservation (E234) dans l'industrie alimentaire sans être impliqué dans des problèmes de santé. C'est un polypeptide thermostable produit par la bactérie *Lactococcus lactis ssp. Lactis*. Son spectre d'action est relativement étroit et agit essentiellement sur les bactéries Gram positif (Sebti, 2002 ; Efsa, 2006).

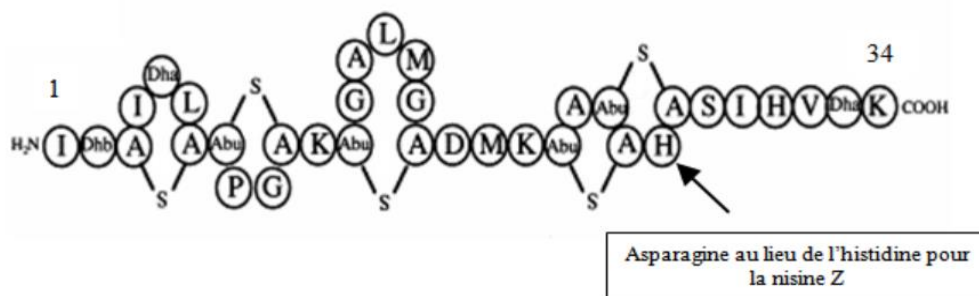
## II.2. Composition de la nisine

La nisine est un peptide qui contient 34 acides aminés avec une masse moléculaire allant 2,1 à 3,5 KDa, qui comprennent des lanthiotiques linéaire et cationique (Drider et Privoste, 2009). Elle peut former des dimères ou des oligomères de 7000 à 14000 Da par des interactions intermoléculaires entre les résidus Dha et Dhb (Klaenhammer, 1993).

La conformation en anneaux des lanthionines confère au peptide une rigidité, réduit sa sensibilité à la protéolyse et améliore sa résistance à la chaleur (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

Il existe deux formes naturelles de la nisine : la nisine A de 3353 Da et de la nisine Z de 3330 Da. Elles se distinguent par la substitution de l'histidine en position 27 dans la nisine A, tandis que la nisine Z a un résidu asparagine à cet emplacement. Cette substitution confère à la nisine Z une meilleure capacité de diffusion dans les environnements complexes (Meghrou *et al.*, 1997). Selon Rollema *et al.* (1995), le pH et la force ionique de la solution influencent la solubilité de la nisine (Figure 05).

La nisine montre une sensibilité à la température. À pH 5 et 6.8, elle perd respectivement 40% et plus de 90% de son activité après avoir été soumise à un autoclavage à 115.6°C. En revanche, à pH =2, aucune diminution d'activité n'est constatée (Hurst, 1998).



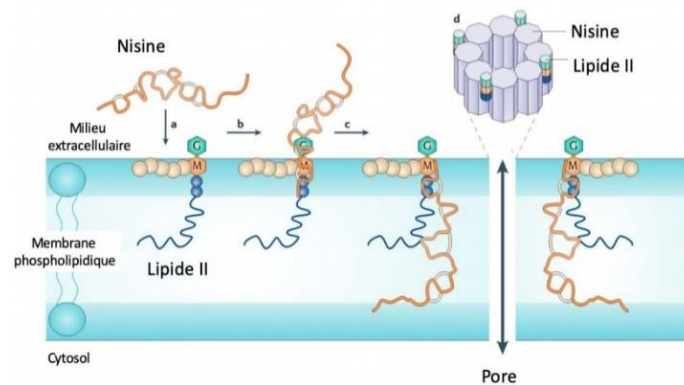
**Figure 05** : Schéma représentant la structure de la nisine A et la nisine Z (Jasiewski, 2008).

### II.3. Mode d'action

Selon Sahl et Bierbaum, (1998), la première cible de la nisine se trouve dans la membrane cytoplasmique des souches sensibles. Cette bactériocine à une action contre certaines bactéries à Gram Positif (*Listeria*, *staphylococcus* et *Mycobacterium*) selon Drider et Privost, (2009).

Kuipers *et al.* (2011) décrivent deux principales actions des antibiotiques : la formation de pores dans la membrane des bactéries cibles et l'inhibition de la production de peptidoglycane. La nisine, en particulier, est l'antibiotique dont le mécanisme d'action est le mieux documenté. Une fois atteinte la membrane bactérienne, la nisine se lie au lipide II, un précurseur essentiel de la biosynthèse du peptidoglycane. Cette liaison permet à la nisine de former des pores composés de huit molécules de nisine et de quatre molécules de lipide II adapté par Breukink et de Kruijff (2006), perturbant ainsi les gradients ioniques vitaux pour la bactérie cible (Hasper *et al.*, 2004) (Figure 06). De plus, la nisine pourrait également inhiber la biosynthèse du peptidoglycane en séquestrant le lipide II, un mécanisme similaire à celui observé avec d'autres antibiotiques tels que la mersacidine, qui inhibe la synthèse du peptidoglycane sans formation de pores (Breukink et de Kruijff, 2006).

En ce qui concerne les antibiotiques à deux peptides, il a été proposé qu'un des peptides facilite la liaison au lipide II tandis que l'autre est responsable de la formation des pores dans la membrane bactérienne. Cette hypothèse est basée sur l'observation que le peptide 1 de la lacticine 3147 doit être ajouté avant le peptide 2 pour que l'activité antimicrobienne soit effective. Ainsi, le peptide 1 serait responsable de la liaison au lipide II, permettant ensuite au peptide 2 de former les pores (Morgan *et al.*, 2005).



**Figure 06 :** Mécanisme d'action de la nisine (Breukink et Kruijff, 2006).

#### II.4. Toxicité et application de la nisine

Les bactériocines peuvent être dégradées par des enzymes protéolytiques. La nisine, seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire, produit par des souches *Lactococcus lactis* se trouve naturellement dans le lait cru et dans le fromage, a été prouvée non toxique (Tuneli et Delves-Broughton, 1998).

La nisine présente dans les aliments est facilement décomposée par les enzymes digestifs, sans produire de substances toxiques (Hurst, 1981). Par conséquent, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont recommandé une dose quotidienne moyenne de 0 à 33 mg de nisine/Kg de poids corporel. La nisine a été utilisée pour des applications spécifiques dans une variété de produits alimentaires dans 50 pays, incluant les États-Unis (Delves-Broughton, 1997 ; Tuneli et Delves Broughton, 1998). Néanmoins, son utilisation dans l'alimentation demeure restreinte à certains types de produits (Bouksaim *et al.*, 1999).

Les applications les plus récentes de la nisine incluent son utilisation comme agent de conservation dans les produits à base de farine cuite à chaud et les œufs liquides pasteurisés. Il y a également un regain d'intérêt pour son utilisation dans la production de fromage naturel (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

Des recherches importantes ont été menées sur ses propriétés antilistérielles, proposant plusieurs nouvelles applications (Mulders *et al.*, 1991). La nisine est aussi utilisée pour

contrôler la détérioration des bactéries lactiques dans la bière, le vin, la production d'alcool, et les aliments à faible pH tels que les vinaigrettes (Cotter *et al.*, 2005).

Les développements futurs de la nisine pourraient inclure son action synergique avec des chélateurs et d'autres bactériocines, ainsi que son utilisation dans de nouvelles technologies de transformation des aliments comme la stérilisation à haute pression et l'électroporation. De plus, la production de préparations de nisine hautement purifiées et leur amélioration par des chélateurs ont suscité un intérêt pour son utilisation dans le traitement des ulcères humains et la lutte contre la mammite chez les bovins (Piper *et al.*, 2009).



*Chapitre III : Résistance bactérienne  
aux antibiotiques*

### III.1. Définition des antibiotiques

Le terme antibiotique, dérivé du grec « anti » (contre) et « biotikos » (relatif à la vie), a été utilisé pour la première fois en 1889 (Muyleart et Mainil, 2012). Selon Boulahbal (2006), un antibiotique est une substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique capable d'inhiber une croissance ou de détruire des micro-organismes.

En médecine, un antibiotique est une substance chimique organique, qu'elle soit d'origine naturelle ou synthétique, capable de tuer ou d'inhiber les bactéries pathogènes à faible dose. Il possède une toxicité sélective, ciblant spécifiquement les bactéries affectant l'hôte à des doses thérapeutiques (Veysiere, 2019).

### III.2. Définition de la résistance

La résistance aux antibiotiques désigne la capacité d'une bactérie à résister et s'adapter aux traitements (Veysiere, 2019). Après une phase où les antibiotiques étaient très efficaces contre les infections bactériennes, leur efficacité a diminué contre certaines souches. Dès 1940, Abraham et Chain (1940) avaient identifié une résistance à la pénicilline chez *Escherichia Coli*. Les bactéries s'adaptent et développent des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Moroh, 2013).

### III.3. Types de résistance

On distingue deux types de résistance bactérienne. La résistance naturelle et la résistance acquise (Moroh, 2013).

#### III.3.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle se manifeste lorsque toutes les souches d'une espèce particulière sont intrinsèquement capables de résister à un antibiotique. Cette expression d'un trait inné commun à toute la communauté bactérienne rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques (Briand, 2012).

Des caractéristiques telles que la structure spécifique de la paroi cellulaire, qui limite l'accès des antibiotiques à leur cible, ou l'absence de cette cible, sont des facteurs clés déterminant la résistance naturelle, comme c'est le cas pour les bactéries du genre *Mycoplasma*. Les mycoplasmes, en raison de cette caractéristique structurelle, sont intrinsèquement résistants aux  $\beta$ -lactames, qui inhibent la synthèse du peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2010 ; Tortora *et al.*, 2011).

### III.3.2. Résistance acquise

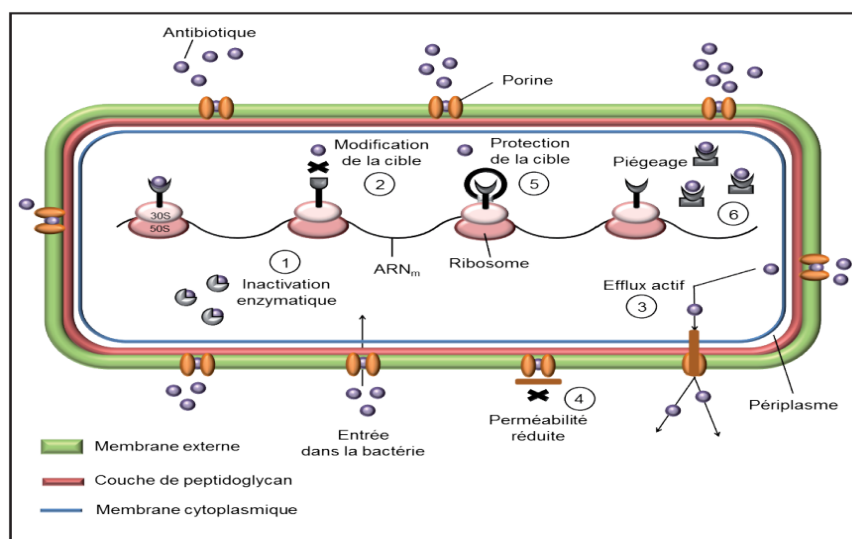
La résistance bactérienne acquise à un antibiotique est un phénomène génétique émergeant au sein des souches d'une espèce précédemment sensible à cet antibiotique. Ce processus implique l'acquisition de gènes qui conduisent à une diminution de la sensibilité à l'agent antimicrobien préalablement efficace (Moroh, 2013).

Cette résistance est caractérisée par son instabilité fréquente (Sylvie, 2009). Ces modifications peuvent résulter de mutations chromosomiques spontanées ou de l'acquisition de gènes transférés d'autres micro-organismes.

La transmission de gènes de résistance est facilitée par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides et les transposons, par le biais de mécanismes comme la transduction, la conjugaison et la transformation (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).

#### III.3.2.1. Mécanismes de résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques constitue un enjeu majeur de santé publique, amplifiée par divers mécanismes développés par les bactéries pour échapper à l'action des agents antimicrobiens. La figure 07 illustre les principaux mécanismes de résistance rencontrés chez les bactéries Gram négatives.



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique.

**Figure 07** : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative (Guardabassi et Courvalin, 2006).

### III.3.2.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

C'est un mécanisme par lequel un micro-organisme synthétise une enzyme capable de neutraliser l'effet d'un antibiotique en le dégradant ou en l'inactivant.

Cette production enzymatique peut être déclenchée par des facteurs externes, tels qu'un autre antibiotique présent dans l'environnement, ou être constante, elle se produit de manière continue sans nécessiter de stimuli externes spécifiques (Institut Pasteur, 2023).

### III.3.2.1.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut se manifester par des modifications structurales de la cible moléculaire, ce qui empêche les antibiotiques de se fixer et d'agir efficacement. Ce phénomène concerne les pénicillines, les glycopeptides, les antibiotiques du groupe MLS pour les Gram positifs, ainsi que les quinolones pour les Gram positifs et négatifs. La résistance peut émerger via l'acquisition de matériel génétique mobile ou des mutations dans la cible de l'antibiotique. Par exemple, les SARM produisent une nouvelle protéine de liaison à la pénicilline avec une faible affinité pour la méthicilline (Guarda-bassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009).

### III.3.2.1.3. Pompes à efflux

La résistance par efflux a été initialement observée pour des agents chimio-thérapeutiques dans les cellules cancéreuses mammifères, grâce à la glycoprotéine P (Juliano et Ling, 1976). La tétracycline a été le premier antibiotique identifié comme étant sujet à ce mécanisme à la fin des années 1970 (Levy et McMurtry, 1978). Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires qui exportent activement les antibiotiques hors des cellules, ce qui contribue à la résistance. Ces pompes peuvent être spécifiques à une classe d'antibiotiques, comme les pompes Tet pour les tétracyclines et les pompes Mef pour les macrolides (Markham et Neyfakh, 2001). Toutefois, beaucoup de ces transporteurs gèrent une large gamme de composés chimiques, jouant un rôle clé dans la multi-résistance (MDR) des bactéries (Poole, 2004). Les gènes codant pour les pompes spécifiques sont souvent sur des éléments génétiques mobiles comme les plasmides ou les transposons, tandis que ceux des pompes MDR se trouvent principalement sur le chromosome (Butaye *et al.*, 2003).

#### III.3.2.1.4. Perméabilité réduite

Les bactéries Gram négatives possèdent une enveloppe complexe qui limite la pénétration des antibiotiques, contrairement aux Gram positives avec leur paroi épaisse de peptidoglycanes (Van Bambeke, 2000). Les antibiotiques hydrophiles entrent via des porines, tandis que les hydrophobes traversent directement la membrane phospholipidique (Nikaido, 2001). Certaines bactéries, comme *Pseudomonas aeruginosa*, ont une membrane externe moins perméable, ce qui réduit leur sensibilité aux antimicrobiens.

Les mutations des gènes des porines, comme la réduction de la porine OmpF chez *Escherichia coli*, augmentent la résistance aux quinolones, bêta-lactames, tétracyclines et chloramphénicol (Vachette, 2011).

Cette diminution de perméabilité est un mécanisme clé de résistance chez les Gram négatifs, notamment *Pseudomonas aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae* (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009). De plus, les germes anaérobies montrent une résistance accrue aux aminoglycosides en raison de leur dépendance au métabolisme aérobie pour l'entrée de ces antibiotiques.

#### III.3.2.1.5. Protection de la cible de l'antibiotique

La résistance par protection de la cible est bien documentée pour les tétracyclines et récemment pour les quinolones et fluoroquinolones. Huit protéines ribosomales différentes peuvent conférer une résistance aux tétracyclines en empêchant leur fixation sur le ribosome. Des souches avec une résistance sub-clinique aux fluoroquinolones, souvent liées à des gènes plasmidiques responsables de la résistance aux quinolones et répartis en cinq groupes, ont été identifiées. Ce mécanisme est observé dans diverses bactéries Gram négatives et aussi dans des bactéries Gram positives (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2008).

#### III.3.2.1.6. Piégeage de l'antibiotique

Les bactéries peuvent échapper à l'action d'un antibiotique en augmentant la synthèse de sa cible ou en produisant une molécule alternative qui se lie fortement à l'antibiotique, diminuant ainsi sa disponibilité pour se fixer à la cible. Des mutations chromosomiques induisant une surproduction des cibles des sulfamidés et du triméthoprime ont été documentées dans plusieurs espèces bactériennes. Ce mécanisme est aussi observé dans la résistance modérée aux glycopeptides chez certaines souches de *Staphylococcus aureus* et à la tobramycine chez *Escherichia coli* (Guardabassi et Courvalin, 2006).

# **Partie expérimentale**

A decorative graphic of a scroll with a black outline and a grey shadow. The scroll is unrolled on the left and right sides, with a small grey circle at the top right corner. The text is centered within the scroll.

# *Matériel et Méthodes*

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire pédagogique dédié aux analyses physicochimiques et microbiologiques, à la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, sur la période allant de mars à juin 2024.

## **I. Matériel**

### **1.Appareillages et réactifs**

L'appareillage et réactifs utilisés dans notre travail expérimental sont cités en annexe I.

### **2.Matériel biologique**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de pollen a été conduite sur cinq souches bactériennes de référence fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Ces souches sont caractérisées par leur pathogénicité et leurs résistances aux agents antibiotiques (Tableau I).

**Tableau I** : Souches bactériennes.

<i>Souches</i>	<i>Types</i>	<i>Références</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie Gram négatif	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bactérie Gram négatif	700603
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie Gram négatif	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie Gram positif	Mu 50
<i>Bacillus cereus</i>	Bactérie Gram positif	ATCC 14579

---

### 3. Les antibiotiques

Les antibiotiques ont été fournis par le laboratoire de microbiologie (Tableau II).

**Tableau II** : Antibiotiques.

Antibiotique	Abréviation
Pénicilline	G P1
Gentamicine	CN 30

### 4. La Nisine

Bactériocine du type A a été fournie gracieusement par notre promoteur Mr OUELHADJ sous forme de poudre. Elle est issue de la compagnie Sigma Química S.A. (Madrid, Espagne). Elle est isolée de la bactérie *Lactococcus lactis* (E234 ; CAS number 1414-45-5, formule chimique : C<sub>143</sub>H<sub>230</sub>N<sub>42</sub>O<sub>37</sub>S<sub>7</sub>), avec une masse moléculaire de 3354,12 Da.

L'utilisation de cette bactériocine dans notre étude expérimentale a nécessité une dilution dans l'HCL à 0,02N de façon à obtenir une concentration de 1,5mg/ml (Khaddor *et al.*, 2003).

## II. Méthodes

### 1. Échantillonnage

Ce travail de recherche s'appuie sur l'analyse de deux échantillons distincts de pollen récoltés en Algérie précisément dans la wilaya de Tizi-Ouzou, sous forme de pelotes. Ces échantillons méticuleusement préserver a une température constante de 4°C, ont été soumis à une série d'analyses conformément à un protocole de recherche établi.

### 2. Classification de pollen par teinte chromatique

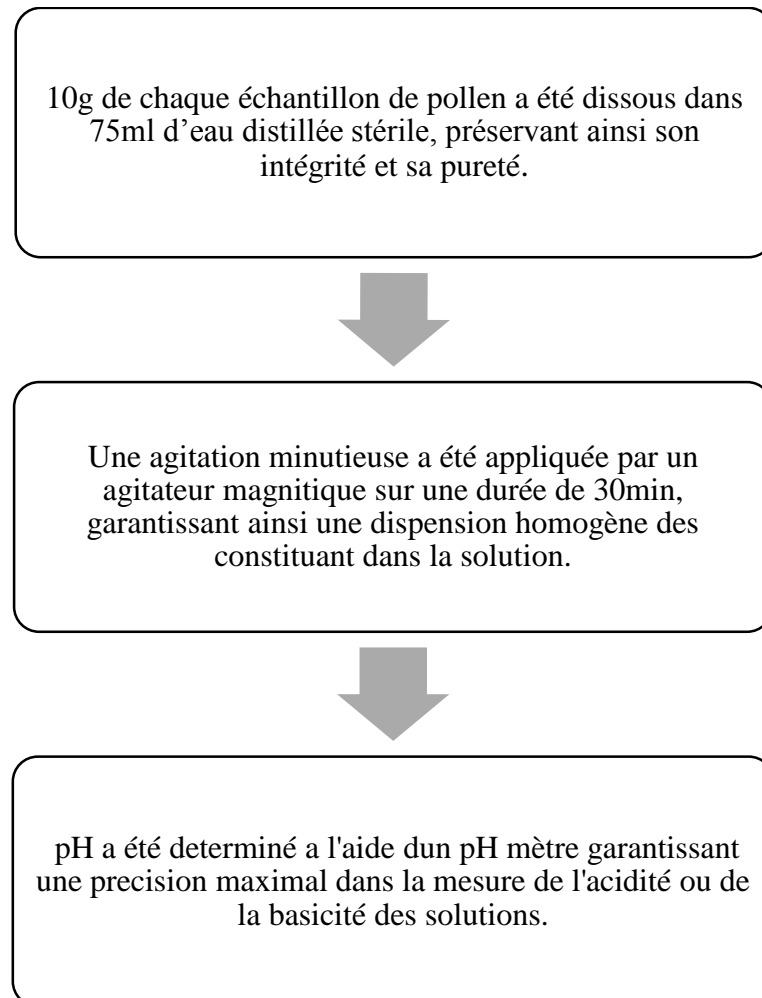
La sélection de pollen par teinte chromatique consiste à séparer les échantillons récoltés en fonction de la diversité des couleurs, propre à chaque espèce végétale. Un triage par couleur a été fait sur 70g de pollen récolté. Cette opération de tri a donné deux sous-échantillons variés de couleur jaune à l'orange.

### 3. Analyses physico-chimiques

#### 3.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

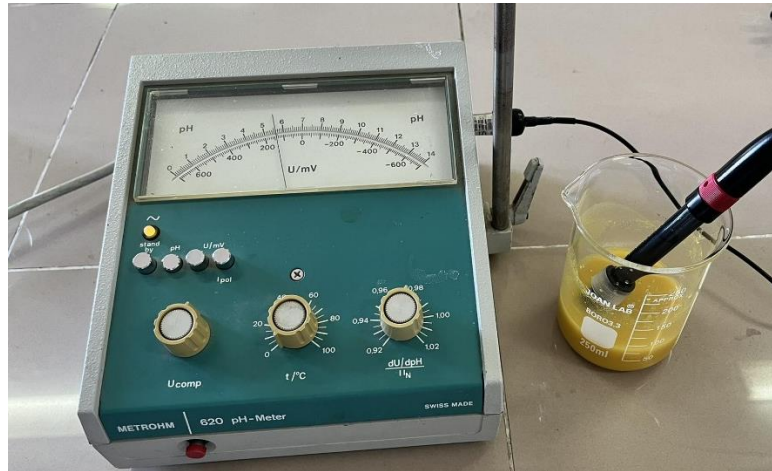
- **Principe**

Ce paramètre a été quantifié dans la phase aqueuse suivant le protocole expérimental énoncé par Barbara *et al.*, (2015) (Figure 08).



**Figure 08 :** Schéma détaillant les étapes de mesure de pH des échantillons de pollen analysés (Barbara *et al.*, 2015).

Les valeurs du pH sont directement lues sur l'écran du pH-mètre (Figure 09).



**Figure 09** : Mesure de pH d'échantillon de pollen par pH-mètre (METROHM).

### 3.2. La teneur en eau (Humidité)

- **Principe**

La détermination de la teneur en eau du pollen consiste à soumettre un échantillon de 2g de chaque variété à un processus d'étuvage à 100°C jusqu'à ce que son poids reste constant (Barbara *et al.*, 2015).

#### Mode opératoire

Le protocole utilisé pour mesurer la teneur en eau des divers types de pollen a été exécuté selon les étapes suivantes :

1. À l'aide d'une balance de précision, peser les verres de montre utilisés et noter leur poids (t) ;
2. Tarer le poids des verres de montre et peser environ 2 grammes de chaque échantillon (m) ;
3. Mettre les échantillons dans l'étuve à 100°C pendant 12 heures jusqu'à à obtenir un poids stable ;
4. Sortir les échantillons de l'étuve avec des gants de protection et placement dans le dessiccateur pendant 1 heure ;
5. Peser sur la balance et noter (m') ;
6. Remettre les verres de montre avec les échantillons dans l'étuve pendant 1 heure ;
7. Ressortir les échantillons de l'étuve et les mettre dans le dessiccateur pendant 1 heure
8. Peser sur la balance et noter (m'') ;

Si  $m' = m''$ , le processus est terminé. En cas de non coïncidence, répéter les points 7 et 8 jusqu'à ce que le poids reste constant (MF). Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage :

$$(H\%) = 100 - [(mf - t) / m] \times 100$$

**mf** : le poids constant

**t** : poids de l'échantillon et du creuset après séchage

**m** : masse de la prise d'essai (g).

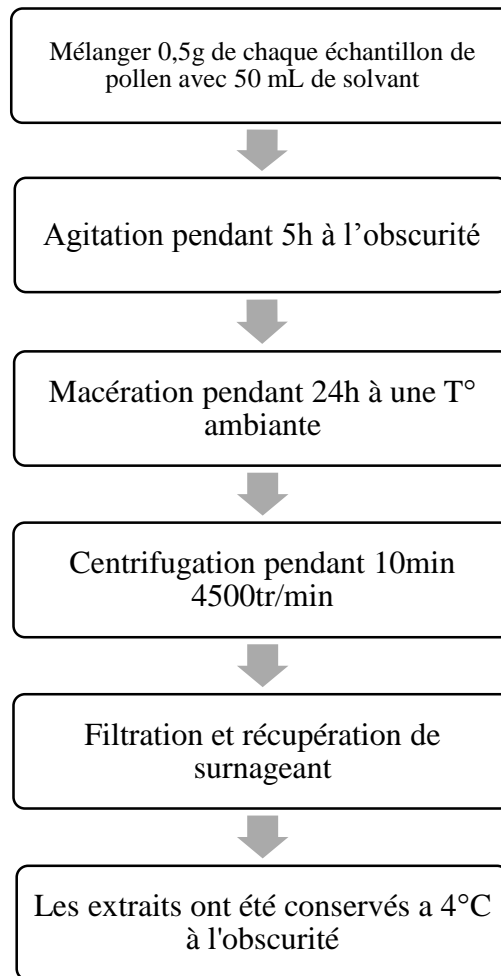
#### 4. Préparation des extraits de pollen

- **Principe**

Dans le cadre de notre recherche, nous avons employé la méthode d'extraction par macération, une approche conventionnelle, pour faciliter le contact entre le solvant et l'échantillon. Les extraits de pollen ont été préparés conformément aux modifications décrites par Rojo et ses collaboratrices en 2023 basées sur les travaux antérieurs (Gabriel *et al.*, 2015).

##### **Mode opératoire**

Comme résumé par la figure 10 le mode opératoire de cette étape consiste à mélanger chaque échantillon de pollen avec un solvant d'éthanol puis agiter l'obscurité pour favoriser l'extraction des composés. Après une macération on effectue une centrifugation à 4500 tr/min pour séparer les phases solides et liquides. Le surnageant est ensuite filtré pour récupérer les extraits, qui sont conservés à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'utilisation.



**Figure 10 :** Illustration des différentes étapes de préparation des extraits de pollen en utilisant le solvant d'éthanol (Rojo *et al.*, 2023).

## 5. Evaluation de la teneur totale en polyphénols (TPC)

- **Principe**

La détermination de la teneur phénolique totale (TPC) du pollen a été exécutée selon le protocole élaboré par Singleton et Rossi en (1965) et évaluée selon la conformité avec la méthode de Folin-Ciocalteu (Figure11).

La quantification des polyphénols totaux a été effectuée en moyen d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ), établi dans des conditions identiques à celle de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme substance de référence (Annexe II).

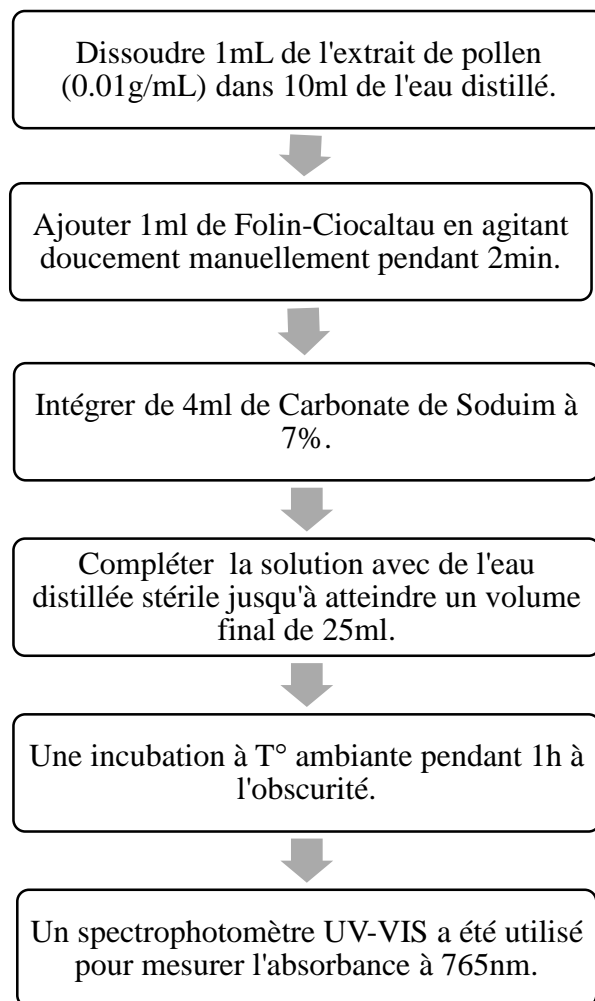
Les résultats de cette courbe permettent de convertir l'absorbance mesurée en concentration de composés phénoliques exprimée en équivalents d'acide gallique sur gramme de pollen (mg EAG/g).

### Remarque

La méthode de Folin-Ciocalteu est une technique simple et largement utilisée pour l'évaluation de la TPC. Cependant, il est important de noter qu'elle ne permet pas de distinguer les différents types de composés phénoliques présents dans l'échantillon.

D'autres méthodes, telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), peuvent être utilisées pour une analyse plus précise et détaillée du profil phénolique d'un échantillon.

### Mode opératoire



**Figure 11** : Protocole d'évaluation des polyphénols (Singleton et Rossi, 1965).

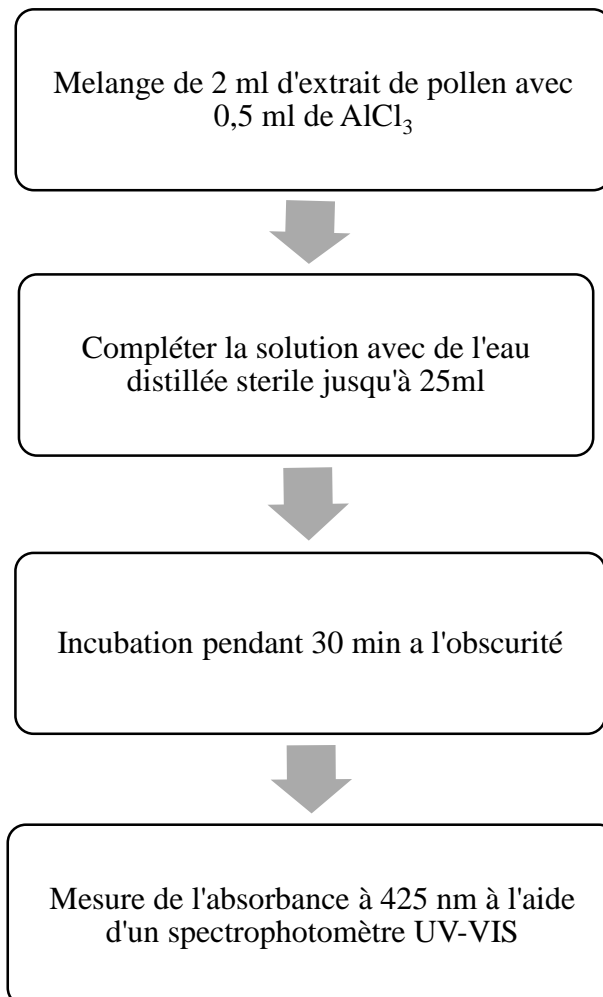
## 6. Evaluation de la teneur totale en flavonoïdes (TFC)

- **Principe**

L'analyse de la teneur totale en flavonoïdes (TFC) est basée sur la méthode d'Arvouet-Grand *et al.* (1994). Cette méthode repose sur la réaction entre les flavonoïdes présents dans l'extrait de pollen et le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) conduit à la formation de complexe flavonoïde-aluminium, qui présentent une coloration jaune intense.

### Mode opératoire

La Figure 12 résume le protocole d'évaluation des flavonoïdes. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalente quercitrine (QE) par gramme d'extrait de pollen (mg EQE/g) (Annexe III).



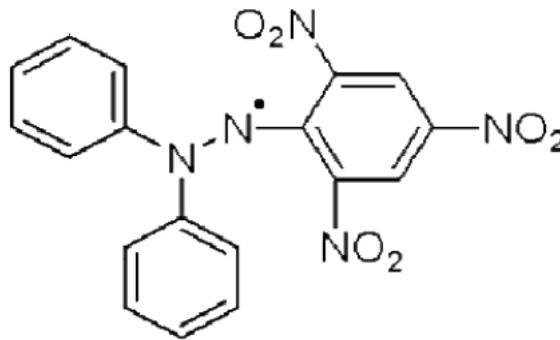
**Figure 12 :** Protocole d'évaluation des flavonoïdes (Arvouet-Grand *et al.*, 1994).

## 7.Évaluation de l'activité antioxydante du pollen

- **Principe**

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (Diphényl-1-picrylhydrazyl) (Figure 13) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Sanchez-Moreno, 2002) avec quelques modifications.

Dans ce test les antioxydants réduisent le Diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune pâle (Gulcin *et al.*, 2003) (Figure15), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Gadow *et al.*, 1997).

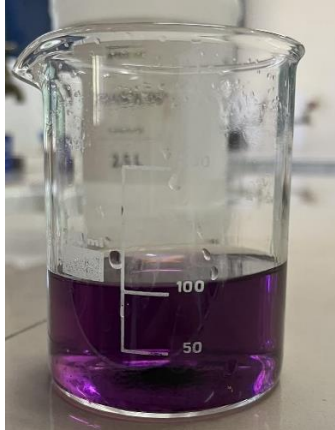


**Figure 13** : Structure chimique du radicale libre DPPH (2,2 Diphényle-1-picryl-Hydrazyle)  
(Revue de génie industriel **2009**).

### Mode opératoire

1. Préparation de la solution DPPH

Dessouder 0,002 g de DPPH dans 100ml de l'éthanol, en travaillant à l'obscurité pour obtenir une solution mère de concentration 0.0006 M



**Figure 14 :** Illustration représente la solution du DPPH préparée (Personnel, 2024).

2. Réaction entre l'extrait de pollen et la solution de DPPH

Mélanger 0,3 ml de l'extrait de pollen avec 2,7 ml de la Solution mère.

3. Mesure d'absorbance

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante

4. Témoin

Préparer un témoin en mélangeant 0,3 ml d'éthanol à 80 % avec 2,7 ml de la solution de DPPH

5. Calcul de l'activité antioxydant :

La décoloration de chaque échantillon a été quantifiée par le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux (RSA), selon la formule suivante :

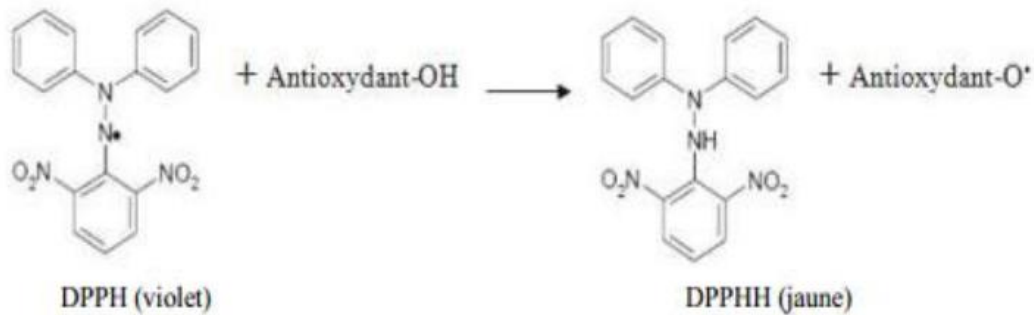
$$\text{RSA (\%)} = \frac{[(\text{AB}-\text{AA})]}{\text{AB}} \times 100$$

**RSA :** inhibition de DPPH (%)

**AB :** Absorbance de témoin.

**AA :** Absorbance de la solution du pollen (échantillon).

La figure 15 ci-dessous montre la réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH



**Figure 15 :** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Gongo, 2012).

## 8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de dénaturation des SAB (BSA)

- **Principe**

La dénaturation des protéines représente une des origines de maladies inflammatoires et arthritiques, aboutissant à la production d'auto-antigènes (Williams *et al.*, 2008).

Diverses études ont analysé l'efficacité inhibitrice de différents extraits végétaux sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, par le biais de méthode de dénaturation des protéines (Bouhlali *et al.*, 2016).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits par la méthode de dénaturation des BSA a été conduite selon le protocole décrite par Williams *et al.* (2008).

### Mode opératoire

Méthode d'inhibition des protéines consiste à préparer trois solutions :

- **Solution saline de tampon phosphate (PBS, pH = 6,8) :** peser précisément 8,0g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, puis dissoudre le tout dans un litre d'eau distillée, agiter à l'aide d'un agitateur magnétique pour assurer une dissolution complète des sels.

Mesure de pH à l'aide d'un pH-mètre, si le pH est inférieur à 6,8, celui-ci est ajusté en ajoutant lentement du NaOH dilué, goutte à goutte tout en agitant constamment, si le pH est supérieur à 6,8, on doit l'ajustez en ajoutant lentement du HCl dilué goutte à goutte tout en agitant constamment la solution.

- **Solution de la BSA :** Dissoudre 0,2g de BSA dans 20ml de solution PBS puis agiter jusqu'à a assuré une dissolution complète de la BSA.

Des volumes de 0,05 ml de concentrations (10, 25, 50, 80) de l'extrait éthanoïque, des concentrations (50, 100,150 µg /ml) du médicament standard diclofénac sont mélangées chacun avec 0,45 ml de BSA (0,5% p/v). Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite la température est portée à 57°C pendant 3 min. Après refroidissement, 2,5ml de tampon phosphate sont ajoutés aux solutions ci-dessus. Un témoin servant de contrôle a été préparé avec 0, 45 ml de BSA mélangé avec 0,5 ml d'éthanol. L'absorbance est mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible à 255 nm.

L'inhibition de la dénaturation des protéines est déterminée en % par rapport au contrôle, en utilisant la formule suivant :

$$\text{Inhibition de dénaturation (\%)} = [(\text{Abs de contrôle} - \text{Abs de l'extrait}) / \text{Abs de contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance.

## 9.Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de nos extraits a été évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, un protocole standardisé dans le domaine microbiologique. Cette méthode, élaborée selon les directives de Bssaibis *et al.* (2009), représente une technique robuste pour évaluer la capacité des substances à inhiber la croissance bactérienne.

En substance, cette méthode implique l'application des extraits éthanoliques sur une surface gélosée préalablementensemencée avec des souches bactériennes de référence. Les substances diffusent dans le milieu gélosé, entraînant la formation des zones d'inhibition autour des points d'application, indiquant ainsi le potentiel antibactérien des extraits.

Les cinq souches bactériennes utilisées dans notre étude, répertoriées dans le tableau I, représentent des organismes de référence couramment employés pour évaluer l'efficacité des agents antibactériens. Cette approche nous permet ainsi de quantifier de manière précise et comparative l'efficacité de nos extraits contre ces micro-organismes, fournissant ainsi des informations cruciales pour évaluer leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens.

L'intérêt clinique d'un antibiogramme est de dresser un relevé des caractères de sensibilité ou de résistance des germes à étudier. Il a pour but de déterminer la CMI d'une souche bactérienne.

### **9.1. Milieu de culture**

Le test antibactérien a été réalisé sur la gélose Mueller Hinton qui est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion (méthode Kirby-Bauer) ainsi que par l'EUCAST comme milieu de référence (Eucast, 2003).

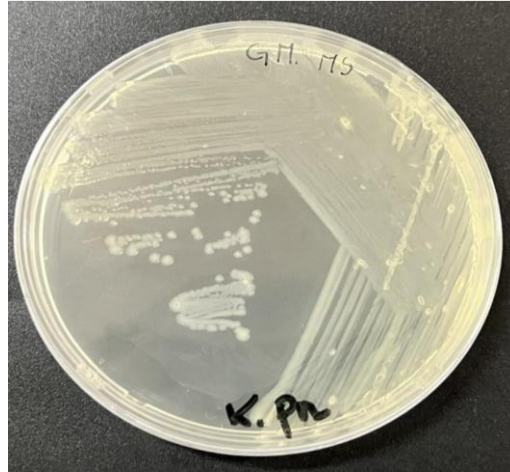
### **9.2. Préparation de pré-culture (réactivation des souches)**

Les analyses antibactériennes doivent être effectuées sur les cultures jeunes de 18h à 24 heures, pendant leur phase exponentielle.

Le processus de réactivation des souches consiste à introduire l'espèce bactérienne dans un milieu nutritif solide (GN), puis à les incuber pendant 18 à 24 heures à une température de 37°C.



a) *Escherichia coli*



b) *Klebsiella pneumoniae*



c) *Bacillus cereus*



d) *Staphylococcus aureus*



e) *Pseudomonas aeruginosa*

**Figure 16 :** Les cinq souches bactériennes obtenues après ensemencement sur milieu gélose nutritif (GN).

### 9.3. Vérification de la pureté des souches bactériennes

Une coloration de Gram a été effectuée, suivie d'un microscope optique à l'huile d'immersion avec un grossissement  $\times 1000$ , dans le but d'examiner le mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes ainsi que leur type de coloration de Gram (Gram positif et Gram négatif).

Le protocole utilisé pour la coloration de Gram a été décrit par Delarras (2007) :

- D'une colonie bactérienne isolée, un frottis a été effectué sur une lame en verre contenant une goutte d'eau distillé ;
- Le prélèvement à l'aide d'une anse a été déposé au milieu de la lame en faisant des rotations ;
- Fixation de frottis se fait par passage directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen ;
- Coloration de frottis avec le violet de Gentiane pendant 1 minute puis rincer avec de l'eau ;
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et laisser agir 1 minute puis rincer brièvement à l'eau ;
- Une décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée laisser agir 20 secondes puis rincer à l'eau ;
- Contre coloration avec la Fuschine pendant 1 minute, puis rincer doucement à l'eau ;
- Sécher à l'aide de la flamme de bec Bunsen ou à l'air ;
- Observer au microscope optique au grossissement  $\times 1000$  à l'huile d'immersion.

Les bactéries à Gram positif sont colorées en violet, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

### 9.4. Préparation de la suspension bactérienne et standardisation

A partir de cette culture pure et jeune de 18h à 24h, en phase exponentielle de croissance, prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite les suspendre dans un volume de 9 ml de l'eau physiologique stérile à 0.9%. Homogénéiser bien la suspension bactérienne afin d'obtenir une turbidité équivalente à 0.5 sur l'échelle de Mac Farland, correspondant à une concentration cellulaire estimée à  $10^8$  UFC/ml, avec une absorbance variant entre [0.008 à 0.1] à 625 nm.

## 10. Evolution de l'activité antimicrobienne

### 10.1. Test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de pollen

L'inoculation des souches testées a été réalisée par la technique d'écouvillonnage, en stries serrées sur la surface du milieu de culture Mueller Hinton. Cinq disques de papier wattman ont été délicatement déposés sur la géloseensemencée à l'aide d'une pince stérile pour garantir l'asepsie. Ces disques ont ensuite été imbibés avec 10 µl de chaque extrait de pollen. En parallèle, des disques d'antibiotiques Gentamicine (CN30), Pénicilline (G P 1) ont été déposés sur le tapis bactérien (témoin positif), et des disques imprégnés éthanol (témoin négatif) ont été utilisés pour une comparaison avec les extraits testés pour chaque soucheensemencée. Laisser ces boîtes de Pétri à 4°C pendant 2 heures puis les incuberpour 24 heures à 37°C. Chaque essai est répété en 2 fois.

Après incubation de 24 h, la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotique pour le témoin positif et des disques de papier wattman pour les extraits de pollen permet de déterminer la sensibilité bactérienne.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne donner par (Ponce *et al.*, 2003) et utilisé pour mesurer les diamètres des zones d'inhibitions en mm comme indiqué :

- $D < 8\text{mm}$  : Souches résistante (-)
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$  : Souches sensibles (+)
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$  : Souches très sensibles (++)
- $D > 20\text{mm}$  : Souches extrêmes sensibles (+++).

### 10.2. Etude de l'activité antibactérienne de la nisine

L'activité de la nisine a été évaluée par la méthode de l'antibiogramme. Une solution a été préparée par dissoudre 0.15g de nisine dans du HCL à 0,02N (100 ml) de façon à obtenir la concentration 1,5 mg/ml.

Cinq disques de papier wattman ont été délicatement déposés à l'aide d'une pince stérile sur chaque boîte de Pétri préalablementensemencée avec les suspensions standardisées par la technique d'écouvillonnage. Ces disques ont ensuite été imbibés avec 10 µl de la solution de la nisine. Laisser les boîtes de Pétri au réfrigérateur à 4°C pendant 2 heures puis une incubation pendant 24 heures à 37°C dans l'étuve. Chaque essai est répété en 2 fois.

Les concentrations sélectionnées ont été basées à celles utilisées par Bani-Jaber (2000). L'addition de HCL à 0,02 N pour la préparation de la nisine a été sélectionnée en suivant la méthode décrite par Khaddor (2003).

La détermination de l'activité antimicrobienne de la nisine se fait par la mesure des zones d'inhibitions de la même manière que celles mentionnées précédemment dans l'aromatogramme.

### **11. Etude de l'effet de combinaison des extraits de pollen avec la nisine**

Afin de chercher l'effet synergique entre les deux extraits de pollen (orange et jaune) et de la nisine, des combinaisons pollen-nisine ont été réalisées à trois concentrations différentes comme suit :

1. 25% d'extrait de pollen + 75% de nisine ;
2. 50% d'extrait de pollen + 50% de nisine ;
3. 75% d'extrait de pollen + 25% de nisine.

La combinaison a été effectuée pour les deux extraits de pollen orange et jaune.

Des disques de papier wattman imbibés de 10 µl de la solution préparée par mélange des différentes concentrations, sont déposés sur les boîtes de Pétri préalablementensemencées avec des suspensions bactériennes standardisées. Une incubation pendant 2 heures à 4°C au réfrigérateur, puis à 37°C pendant 24 heures. Chaque essai est répété en 2 fois.

Après 24h d'incubation une lecture a été faite comme cité précédemment dans l'aromatogramme.

D'après Pibiri (2005), il existe quatre effets antimicrobiens de la combinaison d'extrait pollen et nisine :

- **Indifférent** : l'activité d'extrait de pollen n'est pas affectée par la nisine :

**(A+B) = Effet A ou Effet B.**

- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de l'extrait de pollen et de la nisine étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association

**(A+B) = Effet A + Effet B).**

- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de l'extrait de pollen et la nisine étudiée isolément, à la même concentration :

**(A+B) > Effet A + Effet B.**

- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'un au l'autre de l'extrait de pollen et la nisine. Elle est inférieure à la somme des effets de ses deux dernières prises séparément :

**(A+B) < Effet A + Effet B.**

## 12. Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique. Tous les tests étudiés ont été réalisés en double (n=2) et présentés par la moyenne avec son écart type pour chaque cas. Pour toutes les analyses, les différences ont été considérées significatives à  $p \leq 0,05$  (5%).

- $P > 0,05$  différence non significative ;
- $P \leq 0,05$  et  $P > 0,01$  différence significative ;
- $P \leq 0,01$  et  $P > 0,001$  différence hautement significative ;
- $P \leq 0,001$  différence très hautement significative.

A decorative frame resembling a scroll, with a black outline and rounded corners. The top-left and top-right corners are curled up, and the bottom-left corner is also curled up. The text is centered within this frame.

## ***Résultats et Discussion***

### 1. Triage de pollen selon la couleur

Dans le cadre de notre étude, le pollen présente une spécificité à chaque groupe végétal, et chaque groupe se caractérise par une couleur comme décrite par Hodges (1984) et Kirk (1994). Selon Stanley et Linskens (1974), cette diversité chromatique est variée en fonction de l'origine botanique et géographique des plantes productrices.

L'échantillon de pollen analysé a été trié en fonction des couleurs (Tableau III).

**Tableau III** : Proportions de chaque couleur de pollen récolté à la wilaya de Tizi-Ouzou.

Echantillon de Pollen	Pollen jaune	Pollen orange	Pollen marron	Pollen violet
Poids (g)	35,50	29	4,30	1,20
%	50,71%	41,42%	6.14%	1.71%

La valeur la plus élevée est observée dans le pollen jaune avec (50,71%), qui est le plus diversifié suivie par le pollen orange avec (41,42%) par rapport aux autres couleurs. La dominance de ces deux couleurs peut être attribuée à une biodiversité florale importante pendant la période de récolte et par l'abondance d'une espèce de plantes mellifères produisant ce type de pollen dans la région.

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

Les résultats obtenus par Adrian-Alzandre *et al.* (2012) au Brésil ont confirmé que le pollen dominant récolté par les abeilles est de couleur jaune.

Cette différence de chromatique de pollen observé à la wilaya de Tizi-Ouzou, fournit des indications sur la diversité florale locale et sur la composition nutritionnelle du pollen récolté, comme représenté dans le tableau III des proportions de chaque type de pollen.

D'après Da Luz *et al.* (2010), les grains de pollen ayant la même couleur sont affiliés à la même famille botanique. Notre étude s'intéresse aux pelotes jaune et orange.

## 2. Analyses physico-chimiques de pollen

Les données recueillies ont été systématiquement analysées pour évaluer le potentiel d'hydrogène (pH) et la teneur en eau de pollen en Algérie trié par couleur. Les résultats sont présentés de manière détaillée dans le Tableau IV.

**Tableau IV** : Valeurs moyennes du pH et de la teneur en eau des différents pollens analysés sont présentées avec leurs écart-types associés.

Pollen	pH	Teneur en eau (%)
Jaune	5,5±0,0471	7,7±0,3583
Orange	5,3±0	6,38±0,1273

### 2.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le **pH**, ou **potentiel d'hydrogène**, est un paramètre essentiel pour évaluer l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu. Il mesure la concentration en ions H<sup>+</sup> (protons) dans une solution (Nair, 2014). Dans notre étude, nous avons examiné le pH de deux échantillons de pollen, en mettant l'accent sur les variations entre le pollen jaune et le pollen orange.

Nos résultats ont révélé des valeurs spécifiques pour chaque type de pollen variant entre 5,5±0,0471 pour le pollen jaune. Cette valeur indique que le milieu est légèrement acide. Les facteurs responsables de cette acidité peuvent inclure la composition chimique du pollen, les conditions environnementales et les interactions avec d'autres éléments. Un pH moyen de 5,3±0 pour le pollen orange. Cette valeur est également légèrement acide, mais légèrement inférieure à celle du pollen jaune. Les différences de pH entre les deux types de pollen pourraient être liées à leurs origines botaniques, à la présence de composés spécifiques ou à des variations géographiques.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux trouvés par Cherfa et Smail (2012), ce qui varie de 4,9 à 5,9 ainsi qu'à ceux obtenus par Krell (1996), qui se situent entre 4 et 6.

Les résultats obtenus montrent également que les échantillons de pollen jaune et orange présentent des valeurs de pH différentes, ce qui suggère que la composition chimique des

pollens peut influencer leur acidité. Cette différence peut être attribuée à la présence de différents éléments minéraux et organiques dans les pollens, qui peuvent affecter leur pH (Feás *et al.*, 2012).

Les valeurs de pH obtenues pour les échantillons de pollen se situent dans une plage compatible avec la législation brésilienne (Commission brésilienne, 2000), qui exige que le pH soit inférieur à 6 (dans l'intervalle de 4 à 6). Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures menées par Feás *et al.* (2012), qui ont rapporté des valeurs similaires de 4,3 et 5,2 pour d'autres types de pollen ainsi que les résultats de Bastos *et al.* (2003) qui ont mentionné des valeurs de pH sur le pollen dans l'intervalle (3,7 à 5,5).

### 2.2. La teneur en eau (Humidité)

La teneur en eau du pollen, ou humidité, est un indicateur de qualité, il influence les aspects essentiels du produit tels que la conservation, le goût et l'arôme (Morgano *et al.*, 2011).

Un taux élevé de ce paramètre favorise la multiplication microbienne responsables de l'altération des aliments, notamment de moisissures et levures, compromettant ainsi sa qualité (Colonel *et al.*, 2004 ; Bleha, 2019).

Les valeurs de la teneur en eau des échantillons de pollen analysées sont indiquées dans le tableau (IV). Ces teneurs varient de (6,38±0,1273%) à (7,7±0,3583%). L'échantillon de pollen jaune présente un taux d'humidité plus élevé à 7,7% suivie de près par l'échantillon de pollen orange à 6,38%, cette dernière étant significativement inférieure au premier.

La teneur en eau de deux échantillons de pollen de la région de Tizi-Ouzou respecte les limites maximales établies par le règlement technique Brésilien (Brazil, 2001), fixé à 30% pour le pollen d'abeille.

Les résultats obtenus dans cette étude sont cohérents avec ceux rapportés par Martins *et al.* (2011) pour le pollen brésilien, ou les valeurs varient de 3 à 9,39%, ainsi qu'avec ceux mentionnés par Nogueira *et al.* (2012) pour le pollen commercial Portugais-Espagnol, qui sont comprises entre (6,02±0,18%) et (8,40±0,80%). Les résultats obtenus sont légèrement plus élevés par rapport à ceux de Mélo et Almeida-Muradian (2011), pour la Pologne et la Suisse avec une valeur de 6 %.

Le pollen frais présente un taux élevé d'humidité, ce qui facilite sa dégradation microbienne, surtout par les moisissures. De plus, une humidité dépassant 8% peut favoriser la fermentation selon Almeida-muradian *et al.* (2005).

Selon Bonvéhi et Jordà (1997), un pollen à moins de 3% d'humidité est considéré comme indésirable, car cela peut provoquer une décoloration et favoriser le développement de réactions chimiques. Pour maintenir la qualité de pollen d'abeille, deux méthodes de conservation sont fréquemment employées : la congélation et le séchage (déshydratation afin d'éliminer les altérations).

### 3. Evolution de la teneur totale en phénols (TPC)

Les polyphénols, présentes abondamment dans le règne végétal, sont caractérisés par leurs structures complexes à haut poids moléculaire, et leur potentiel thérapeutique est de plus en plus connu grâce à leurs puissantes propriétés antioxydantes (Stanley *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004).

Le pollen d'abeille est un produit apicole connu pour sa forte activité biologique due à sa composition riche en polyphénols. Ces composés sont remarquables pour leurs propriétés antioxydantes puissantes, attribuées à la présence de double liaisons et de groupe hydroxyle sur leur structure aromatique (Anna *et al.*, 2015).

La teneur en polyphénols totaux des extraits éthanoliques des échantillons de pollen a été mesurée selon la méthode spectrométrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Djeridane *et al.*, 2006), et exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme de pollen (mg EAG/g). Les résultats correspondant à la qualité de polyphénols contenus de chaque extrait éthanolique sont présentés dans le tableau V.

Une courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant des différentes concentrations d'acide gallique comme standard, permettant ainsi de calculer précisément la quantité de composés phénoliques présents. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de pollen, basés sur l'équation  $y = 0.0032x + 0.018$ , avec un coefficient de détermination  $R^2 = 0.9915$  (Annexe II).

**Tableau V :** Résultats du dosage des polyphénols des extraits éthanoliques pour les deux échantillons de pollen en mg EAG/g.

Pollen	Pollen jaune	Pollen orange
Teneur en Polyphénols	19,83± 0,415	14,67±1, 305
Mg EAG/g		

La concentration en polyphénols d'extraits éthanoliques varie significativement avec une moyenne de 19,83±0,415 mg EAG/g pour le pollen jaune, supérieur à celle de 14,67±1,305 mg EAG/g pour le pollen orange. Ces variations dans les teneurs peuvent être attribuées à l'origine géobotanique des produits de la ruche ainsi qu'à la diversité des profils (Oumchemoukh, 2012).

Les résultats de cette étude sont inférieurs à celle rapportée par Livis *et al.* (2009) qui varient de 640 à 1640 mg EAG/100g.

Selon Karkar *et al.* (2018), les facteurs environnementaux ont une influence sur les variations de la composition phénolique de pollen d'abeille et végétale.

Freirie et coll. (2012) dans le sud-est du Brésil ont noté des concentrations allant de 41,4 à 21,32 mg EAG/g, dépassant largement nos résultats.

En Lituanie, Kaškoniene et al. (2015) ont rapporté des teneurs variant entre 24,4 et 38,9 mg EAG/g, tandis que Leja et al. (2007) ont mesuré 32,59 mg EAG/g dans le désert de

Sonora, et Rebiai et al. (2012) ont enregistré 30,46 ± 8,22 mg EAG/g en Algérie. Kaškoniene et al. (2020) en Turquie ont observé des concentrations autour de 24,60 ± 2,52 mg EAG/g, et Pascoal et al. (2014) en Espagne ont noté des valeurs comprend entre 18,55 et 32,15 mg EAG/g. Aux États-Unis, LeBlanc et al. (2009) ont constaté des concentrations allant de 15,91 à 34,85 mg EAG/g. Enfin, les résultats de Rojo et al. (2023) pour le pollen d'Espagne se sont limités à un maximum de 1,57 mg EAG/g, ce qui est inférieur à tous les autres

#### 4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux qui colorent les plantes et protègent leurs tissus contre les dommages extérieurs (Hadri, 2015). Ils agissent également comme des antioxydants efficaces, capables de neutraliser les radicaux libres (Narayana *et al.*, 2001).

La teneur en flavonoïdes est évaluée selon le protocole décrit par Arvouet-Grand *et al.* (1994) et la méthode de trichlorure d'aluminium (Bosku *et al.*, 2004). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent quercétine par gramme d'échantillon (Tableau VI).

**Tableau VI** : Résultats obtenus du dosage des flavonoïdes des extraits éthanoliques pour les échantillons de pollen en mg EQ/g.

Pollen	Pollen jaune	Pollen orange
Teneur en Flavonoïdes mg EQ/g	21,8 ±2,5	25,26±0,64

Selon les données du tableau VI, les résultats montrent une légère différence entre les deux échantillons.

Les flavonoïdes, tels que les flavanones, flavones, flavonols, isoflavones et anthocyanes, sont des éléments essentiels du pollen. Ils influencent sa couleur : les flavonols lui donnent des teints jaunes, tandis que les anthocyanes créent des nuances violettes (Marion, 2017).

Ces résultats montrent une teneur en flavonoïdes la plus élevée est observée dans le pollen orange, avec une valeur de 25,26±0,64 mg EQ/g, tandis que celle de l'échantillon jaune est de 21,8 ±2,5 mg EQ/g.

Ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par Marghitas *et al.* (2009) pour d'autres types de pollen comme *Salix.sp*, *Centaurea cyanus*, et *Matricaria chamomilla*, qui varient de 280 mg EQ/100g à 1360 mg EQ/100g. Ainsi que celles trouvées pour le pollen de *Pinus.sp* (pin), qui atteint 60 mg EQ/100g.

Cette variation peut être attribuée aux différences d'origine botanique et/ou géographique ainsi qu'à d'autres facteurs tels que les conditions climatiques et le type de sol (Rebiai et Lanez, 2012).

### 5. Evolution de l'activité antioxydant

#### Test de piégeage du radical DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits du pollen a été basée sur l'efficacité et la capacité des antioxydants à capturer le radical stable DPPH.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont été exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH (% RSA) pour les deux extraits éthanoliques du pollen et sont représentés dans le tableau VII.

**Tableau VII :** Pourcentage d'inhibition du DPPH des extraits éthanoliques pour les deux échantillons du pollen étudiés.

Pollen	DPPH (%)
Pollen jaune	63,53%±0,155
Pollen orange	75,6%±6,59

Les résultats d'activité antioxydant ont montré une légère différence entre les deux échantillons étudiés. Le pollen orange présente une activité légèrement élevée, avec une valeur de 75,6%±6,59 par rapport au pollen jaune, qui affiche une valeur de 63,53%±0,155. Ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par Kroyer *et al.* (2001), qui étaient de 53%.

Nos résultats dépassent largement ceux du pollen du Portugal, dont l'activité varie de 2,16 à 5,87% (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007). Cependant, ils se situent dans l'intervalle rapporté par Leja *et al.* (2007), allant de 10,5 à 76,1%.

La valeur obtenue par Nurdianah *et al.* (2016), sur le pollen Malaisien (39%) est considérablement inférieure à celle du pollen orange (75,6%). De plus, nos résultats sont très proches de ceux rapportés par Rojo *et al.* (2023) sur le pollen d'Espagne, avec des valeurs variant de 17 à 88,2%. Cependant, les résultats de Parri *et al.* (2015) sur le pollen Italien montrent une activité antioxydant élevée, avec des valeurs d'inhibition du DPPH allant de 37,95 à 94,95%, ce qui dépasse largement les valeurs obtenues dans notre étude.

D'autre part, AbdeElsalam *et al.* (2018) ont trouvé des valeurs encore plus élevées pour le pollen d'Égypte, extraits par divers solvants, allant de 6 à 90%.

Par ailleurs, les résultats obtenus par Florio Almeida *et al.* (2016) ( $54,42\% \pm 0,23$ ) sont proches à ceux trouvés dans le pollen jaune. De plus, nos valeurs surpassent celles sur le pollen de Slovaquie de plusieurs origines botaniques, qui ont rapportés une activité anti-radicalaire allant de  $47,97\% \pm 0,29$  à  $50,46\% \pm 0,43$  (Bléha *et al.*, 2019 ; Fatrcova-Sramkova *et al.*, 2020).

La variabilité dans les valeurs observées peut être influencée par plusieurs facteurs, tels que la méthode et le solvant d'extraction utilisé, la source des plantes, la saison, ainsi que les conditions de stockage (Kroyer et Hegedus, 2001 ; Sarmento Sivla *et al.*, 2006 ; LeBlanc *et al.*, 2009 ; Freier *et al.*, 2012).

## **6. Résultat d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro***

### **6.1. Test d'inhibition de la dénaturation protéique**

Selon Rathisre *et al.* (2013), la méthode de dénaturation protéique est la plus adaptée pour évoluer *in vitro* l'activité anti-inflammatoire des extraits.

Dans notre étude, l'activité anti-inflammatoire des deux extraits éthanoliques du pollen (jaune et orange) a été examinée *in vitro* à l'aide du teste d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) induit par traitement thermique. L'objectif était de mesurer l'effet protecteur de l'extrait contre la dénaturation de la BSA. Les résultats sont présentés dans le tableau VIII, exprimés en pourcentage d'inhibition.

**Tableau VIII** : Effet des deux extraits de pollen sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de dénaturation de l'albumine sérique bovine.

Traitements	Concentration (µg/ml)	Dénaturation (%)
Contrôle	---	100%
Extrait du pollen jaune	10	96,71%
	25	98,55%
	50	99,19%
	80	97,99%
Extrait de pollen orange	10	87,97%
	25	92,54%
	50	92,86%
	80	92,22%
Diclofénac	50	99,03%
	100	99,43%
	150	99,03%

Les résultats du tableau VIII montrent que l'extrait de pollen jaune présente des taux d'inhibition de la dénaturation protéique remarquablement élevés, atteignant près de 98 à 99% pour les concentrations de 25 à 50 µg/ml. Cela suggère que l'échantillon jaune a une activité anti-inflammatoire très puissante, comparable à celle du diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) standard (Smith *et al.*, 2020).

L'extrait éthanolique de pollen orange présente une activité anti-inflammatoire légèrement inférieure à celle de l'échantillon jaune, avec des inhibitions variant de 87,97% à 92,86%. Bien que ces valeurs indiquent une bonne activité anti-inflammatoire, mais elle est moins puissante que celle observée pour l'échantillon jaune.

Le diclofénac est un standard qui montre une très forte inhibition de la dénaturation protéique, avec des valeurs presque constantes autour de 99%.

Une étude publiée dans *Journal of Ethnopharmacology* (Smith *et al.*, 2020) a analysé l'activité anti-inflammatoire du pollen d'abeille, montrant une inhibition de la dénaturation protéique atteignant 85% à 50 µg/ml. En comparaison, nos échantillons, en particulier l'échantillon jaune, présentent des inhibitions plus élevées (99,19% à 50 µg/ml), suggérant une activité anti-inflammatoire supérieure.

Un mémoire de l'Université de Madrid (Gonzalez, 2021) a examiné l'activité anti-inflammatoire du pollen de ciste, avec une inhibition d'environ 88% à 25 µg/ml. Ce résultat est inférieur à celui observé pour nos échantillons (98,55% à 25 µg/ml pour l'échantillon jaune), indiquant une efficacité supérieure de nos échantillons, potentiellement en raison de leur origine botanique ou de leur méthode de préparation.

Un article récent dans *Phytotherapy Research* (Doe *et al.*, 2022) a démontré que le pollen de *Pinus sylvestris* offre une inhibition de la dénaturation protéique de l'ordre de 90% à 80 µg/ml. Cette valeur est proche des résultats obtenus avec notre échantillon orange (92,22% à 80 µg/ml) et légèrement inférieure à ceux de l'échantillon jaune (97,99% à 80 µg/ml). Cela suggère que l'échantillon jaune pourrait avoir une activité anti-inflammatoire plus puissante que certains types de pollen.

Les comparaisons avec les études sur le pollen montrent que nos échantillons, particulièrement l'échantillon jaune, possèdent une activité anti-inflammatoire remarquable, surpassant celle de plusieurs types de pollen étudiés dans la littérature récente. Cela pourrait être dû à des différences dans la composition chimique, les conditions de récolte, ou les techniques de traitement des échantillons.

D'après Amezouar *et al.* (2013), l'activité anti-inflammatoire de l'extrait est principalement liée à sa richesse en composés bioactifs, tels que les polyphénols et les flavonoïdes.

### 7. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Le profil de sensibilité des bactéries aux antibiotiques constitue une évaluation cruciale pour déterminer l'efficacité des traitements sur des souches bactériennes spécifiques. Cette analyse critique permet de sélectionner les traitements antimicrobiens les plus appropriés pour une gestion optimale des infections. La sensibilité des bactéries à des antibiotiques comme la gentamicine et la pénicilline, ainsi qu'aux extraits de pollen, est évaluée par la méthode de diffusion à travers des disques de papier Wattman, suivant un protocole antérieurement décrit qui inclut les extraits éthanoliques de pollen. Cette évaluation se base sur la mesure des diamètres d'inhibition en millimètres des halos formés, permettant ainsi de déterminer l'efficacité de chaque antibiotique à inhiber la croissance des bactéries, comme démontré par Ponce *et al.* (2003).

Les échantillons de pollen ont été examinés pour leur effet sur cinq souches bactériennes distinctes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* Mu 50, *Klebsiella pneumoniae* 700603 et *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Une souche est classée comme sensible lorsque le diamètre de la zone d'inhibition se situe entre 8 et 14 mm, et comme résistante lorsque ce diamètre est inférieur à 8mm. Une sensibilité est qualifiée d'extrêmement élevée si le diamètre de la zone d'inhibition dépasse 20 mm (Ponce *et al.*, 2003).

#### 7.1. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose

##### 7.1.1. Résultats des témoins négatifs réalisés avec un solvant organique

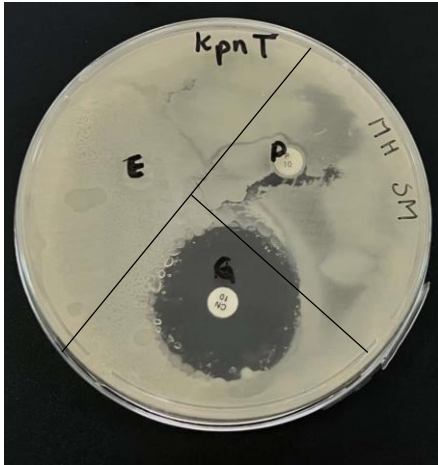
L'éthanol, en tant que solvant organique, est utilisé comme un témoin négatif dans la méthode de diffusion sur gélose pour évaluer l'activité antimicrobiens sur les bactéries testées. Les résultats sont illustrés dans la figure 18.

Les témoins négatifs n'ont révélé aucune activité antimicrobienne contre ces souches bactériennes. L'absence de zones d'inhibition pour l'éthanol confirme que ce solvant n'a pas d'activité antimicrobienne, validant ainsi son utilisation pour extraire les composés actifs des pollens.

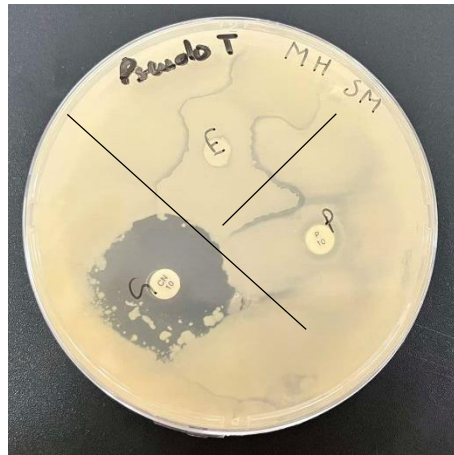
##### 7.1.2. Résultats des témoins positifs

La méthode de l'antibiogramme permet d'évaluer la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques. Dans notre étude, nous avons testé l'activité de deux antibiotiques,

sélectionnés en fonction de leur usage courant en milieu hospitalier, en utilisant la méthode standard des disques. Les résultats de l'antibiogramme sont présents dans la figure 18.



a) *K. pneumoniae* (700603)



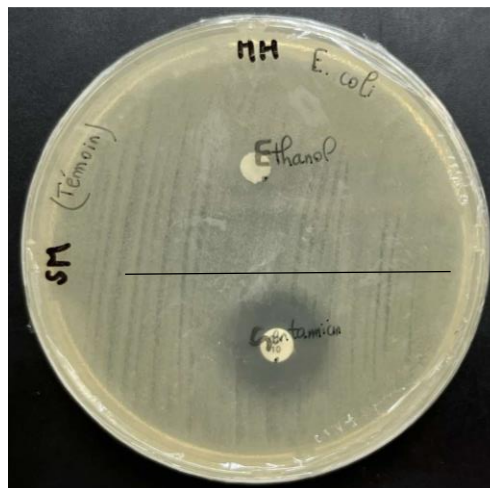
b) *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



c) *S. aureus* (Mu 50)



d) *B. cereus* (ATCC 14579)



e) *E. coli* (ATCC 25922)

**Figure 17 :** Résultats des témoins positifs réalisés avec les antibiotiques Gentamicine (G) et pénicilline (P) et le témoin négatif : l'éthanol (E) sur les cinq souches bactériennes testées.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux antibiotiques. Le tableau ci-dessous présente les valeurs en mm des zones d'inhibition observées pour les deux antibiotiques testés sur les cinq souches bactériennes étudiées.

**Tableau IX :** Résultats des diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne ±écart type) des deux antibiotiques sur cinq souches bactériennes.

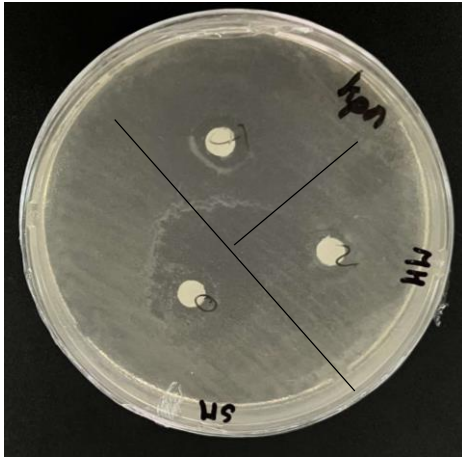
Souches ATB	Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais ±l'écart type	
	Gentamicine	Pénicilline
<i>Escherichia coli</i>	21,2mm±1,75	6mm±0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22mm±6	7,5mm±1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	28,5mm±1,5	20mm±14
<i>Bacillus cereus</i>	25,5mm±1,5	8,25mm±1,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22mm±8	6,5mm±0,5

Note : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

Les résultats de tableau IX révèlent que la gentamicine présente une forte activité contre toutes les souches testées, en particulier contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres de 28,5 mm ± 1,5. Cette mesure indique une sensibilité extrême (+++) (Ponce *et al.*, 2003), confirmant son large spectre d'action contre les bactéries Gram-négatives et certaines Gram-positives. En revanche, la pénicilline a montré une efficacité limitée, probablement en raison de la présence de souches résistantes (-), un phénomène de plus en plus courant, comme décrit par Turnidge et Paterson (2007).

## 7.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux échantillons du pollen

La figure 19 illustre l'effet des deux échantillons de pollen, jaune et orange, sur les cinq souches bactériennes étudiées.



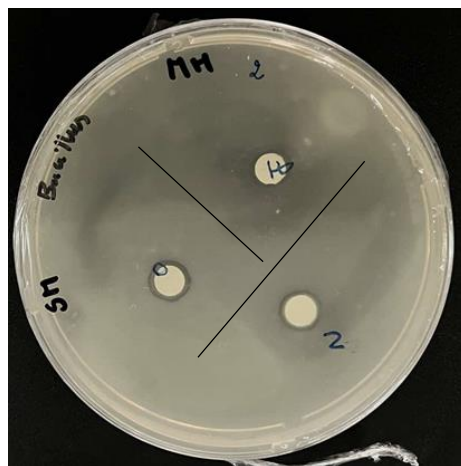
a) *K. pneumoniae* (700603)



b) *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



c) *S. aureus* (Mu 50)



d) *B. cereus* (ATCC 14579)



e) *E. coli* (ATCC 25922)

**Figure 18 :** Effet des échantillons du pollen jaune et orange, ainsi que de la nisine, sur les cinq souches bactériennes testées.

Le tableau X présente les diamètres des zones d'inhibition et la sensibilité des souches bactériennes aux échantillons du pollen jaune et orange.

**Tableau X :** Résultats de test de sensibilité des souches bactériennes pour les échantillons du pollen jaune et orange testés.

Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type				
Souches	Pollen jaune		Pollen orange	
	Diamètre	Sensibilité	Diamètre	Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	20,75mm $\pm$ 4,25	(+++)	10,75mm $\pm$ 0,25	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,25mm $\pm$ 0,25	(+)	7,75mm $\pm$ 1,75	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5mm $\pm$ 4	(+)	12,25mm $\pm$ 2,75	(+)
<i>Bacillus cereus</i>	7,25mm $\pm$ 1,25	(-)	10,25mm $\pm$ 1,25	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16,25mm $\pm$ 4,75	(++)	13mm $\pm$ 5,5	(+)

Note : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

D'après les résultats obtenus dans le tableau X les extraits de pollen, en particulier ceux à base d'éthanol, montrent un potentiel intéressant en tant qu'agents antimicrobiens contre diverses bactéries. Le pollen jaune a démontré une inhibition significative contre *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 20,75 mm  $\pm$  4,25, classant cette souche parmi les souches extrêmement sensibles (+++), ce qui suggère une forte concentration de composés bioactifs efficaces contre ces bactéries Gram-négatives. Ces résultats sont cohérents avec les études antérieures, telles que celles de Sivamaruthi *et al.* (2019) et Morais *et al.* (2011), qui ont observé des inhibitions similaires pour des extraits de pollen issus de différentes origines. De même, Campos *et al.* (2008) ont démontré que le pollen d'abeille peut inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* grâce à ses composés phénoliques et flavonoïdes, ce qui est en accord avec les résultats de notre étude sur le pollen jaune.

Le pollen orange, bien que moins efficace que le pollen jaune contre la plupart des bactéries testées, a montré une zone d'inhibition de  $10,75 \text{ mm} \pm 0,25$  contre *E. coli*, indiquant que cette souche est sensible (+). Ce résultat pourrait être attribué à une composition différente en flavonoïdes et autres composés phénoliques, comme l'ont noté Mărgăoan *et al.* (2014), qui soulignent que la couleur et l'origine du pollen peuvent influencer son activité antimicrobienne.

Contre *Pseudomonas aeruginosa*, les résultats montrent des zones d'inhibition modérées avec le pollen jaune ( $12,25 \text{ mm} \pm 0,25$ ), classant cette souche parmi les sensibles (+), et plus faibles avec le pollen orange ( $7,75 \text{ mm} \pm 1,75$ ), indiquant une résistance (-), ce qui est en accord avec les conclusions de Mărgăoan *et al.* (2020) sur la résistance de *Pseudomonas* aux extraits naturels.

Pour *Staphylococcus aureus*, les deux types de pollen ont montré des résultats similaires avec des diamètres de 12,5 mm, ce qui correspond à une sensibilité (+) accrue de cette bactérie Gram-positive aux extraits de pollen, comme rapporté par Almeida-Muradian *et al.* (2018).

Les résultats pour *Bacillus cereus* montrent une activité antimicrobienne modeste, avec une zone d'inhibition de  $7,25 \text{ mm} \pm 1,25$  pour le pollen jaune, indiquant une résistance (-), et  $10,25 \text{ mm} \pm 1,25$  pour le pollen orange, indiquant une sensibilité (+), ce qui pourrait être lié à la nature sporulée de cette bactérie, comme le suggère Mărgăoan *et al.* (2020).

Enfin, pour *Klebsiella pneumoniae*, le pollen jaune a montré une inhibition significative avec des diamètres de  $16,25 \text{ mm} \pm 4,75$ , classant cette souche parmi les très sensibles (++), en ligne avec les observations de González *et al.* (2022), qui ont mis en évidence la sensibilité de cette bactérie aux flavonoïdes présents dans le pollen.

### 7.3. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à la nisine

L'analyse du test de sensibilité des souches bactériennes à la nisine, à une concentration 1,5mg/ml dissoute dans l'HCL à 0,02N, selon la méthode de l'antibiogramme. La figure 19 illustre l'effet de la nisine sur les cinq souches bactériennes.

Les diamètres des zones d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de la nisine sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XI :** Résultats du test de sensibilités des souches bactériennes à la nisine dissoute dans l'HCL à 0,02N.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais ±l'écart type	
Dilution  Souches		1,5mg/ml nisine / HCL à 0,02N	
		Diamètres	Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>		10,75mm±1,25	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		7,75mm±1,75	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i>		9,25mm±0,25	(+)
<i>Bacillus cereus</i>		9,25mm±0,25	(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		9,25mm±1,25	(+)

Note : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

Les résultats de tableau XI indiquent que la nisine dissoute dans HCl à 0,02N, à une concentration de 1,5 mg/ml, a montré une certaine efficacité antimicrobienne contre plusieurs souches bactériennes, à l'exception notable de *Pseudomonas aeruginosa*, qui s'est révélée résistante. Les diamètres d'inhibition observés sont globalement inférieurs à ceux rapportés par ARAB *et al.* (2012), suggérant des variations potentielles dans les conditions expérimentales ou la sensibilité des souches.

La nisine, connue pour son efficacité contre les bactéries Gram-positives, a montré ici une inhibition modérée contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres de 9,25 mm ± 0,25, classant cette souche parmi les sensibles (+) (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

*Escherichia coli* a montré un diamètre d'inhibition de 10,75 ± 1,25 mm, ce qui est inférieur au 13,66 mm rapporté par ARAB *et al.* (2012). Cette différence pourrait être liée à la souche utilisée ou à des variations dans la méthode expérimentale. D'autres études, telles que celle d'Elmoualdi *et al.* (2008), qui ont testé l'effet bactéricide de plusieurs bactériocines appartenant à des bactéries de différents genres, suivant la méthode de diffusion sur milieu solide TSA, ont également rapporté des zones d'inhibition plus élevées pour *E. coli*, atteignant

24,3 mm, ce qui souligne une efficacité variable de la nisine en fonction des conditions d'expérimentation.

*Pseudomonas aeruginosa* a présenté une résistance avec un diamètre d'inhibition de seulement  $7,75 \pm 1,75$  mm. En comparaison, ARAB *et al.* (2012) ont rapporté une zone d'inhibition significativement plus grande de 24,33 mm. Cette grande différence pourrait être attribuée à la nature intrinsèque de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à la nisine, qui est bien documentée dans la littérature. Par exemple, ELMOUALDI *et al.* (2008) ont trouvé une zone d'inhibition de 21,2 mm pour *P. aeruginosa*, ce qui reste supérieur à nos résultats, mais indique toujours une certaine variabilité dans la réponse de cette souche à la nisine.

Pour *Staphylococcus aureus*, le diamètre d'inhibition observé était de  $9,25 \pm 0,25$  mm, inférieur à celui rapporté par Arab *et al.* (2012), qui était de 23mm. Cette différence pourrait indiquer une sensibilité réduite de la souche utilisée dans notre étude.

Selon Mansour *et al.* (1998), le pH exerce un effet significatif sur l'inactivation des spores de *B. licheniformis*, avec une réduction du nombre de spores lorsque le pH diminue. De plus, la nisine seule n'a pas d'effet sur les spores, mais sa combinaison avec une variation de pH améliore son efficacité ce qui pourrait expliquer la diminution observée dans notre étude.

*Bacillus cereus* présente un diamètre d'inhibition de  $9,25 \pm 0,25$  mm. Alors que la nisine est généralement efficace contre les *Bacillus* spp., avec une efficacité accrue à pH bas (Aouadhi *et al.*, 2014). Le résultat relativement modeste dans notre étude pourrait donc être attribué à des conditions expérimentales qui n'ont pas optimisé cette interaction.

Les résultats pour *Klebsiella pneumoniae* montrent un diamètre d'inhibition de  $9,25 \pm 1,25$  mm, inférieur aux 16 mm observés pour *K. oxytoca* (Arab *et al.*, 2012) Cette différence suggère que *K. pneumoniae* pourrait être moins sensible à la nisine que *K. oxytoca*.

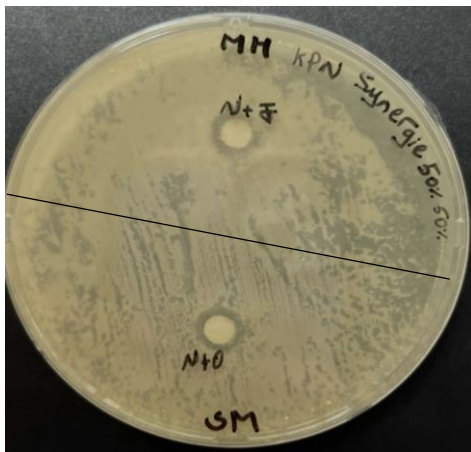
L'efficacité de la nisine peut être influencée par des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la composition et la structure des aliments, ainsi que la présence de microbiote alimentaire. Selon Zhou *et al.* (2013), diverses bactéries à Gram positif ont développé une résistance à la nisine. Les mécanismes d'acquisition de cette résistance sont complexes et peuvent varier d'une souche à une autre.

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques, comme la nisine, contiennent de nombreux résidus d'acides aminés chargés, dont l'activité biologique est fortement influencée par le pH du milieu environnement. Cette sensibilité au pH explique les variations observées dans l'efficacité antimicrobienne en fonction de l'acidité du milieu (Liu et Hansen, 1990).

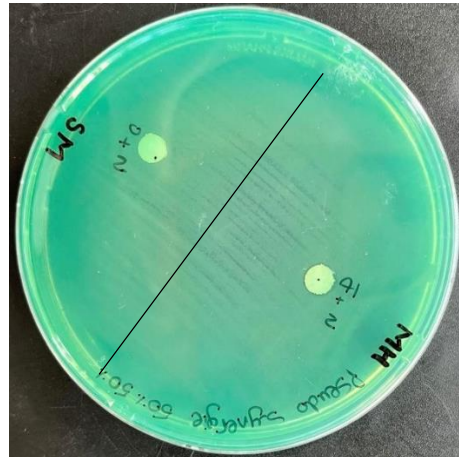
La nisine, la bactériocine la plus commercialisée, est produite par *Lactococcus lactis* *subsp. Lactis* possède une large activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives, incluant leurs spores. En raison de son efficacité, elle est approuvée pour une utilisation dans les viandes transformées aux États-Unis, avec une limite fixée à 12,5 mg/kg fixée par la Food and Drug Administration (FDA). Elle est employée dans les produits laitiers et carnés pour contrôler les pathogènes à Gram positif tels que *Listeria monocytogenes* (Balciunas *et al.*, 2013)

### **8. Résultats de la combinaison des échantillons du pollen avec la nisine**

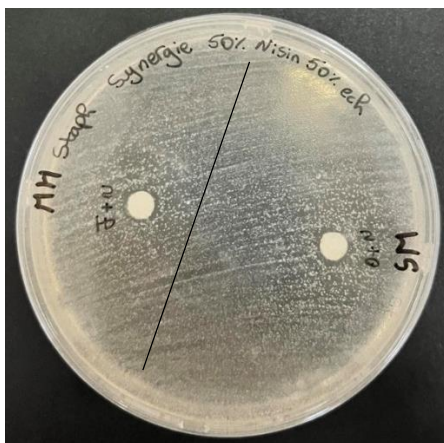
Les figures 20 et 21 illustrent l'effet des trois combinaisons des échantillons du pollen jaune et orange avec la nisine sur les cinq souches bactériennes étudiées.



a) *K. pneumoniae* (700603)



b) *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



c) *S. aureus* (Mu 50)



d) *B. cereus* (ATCC 14579)

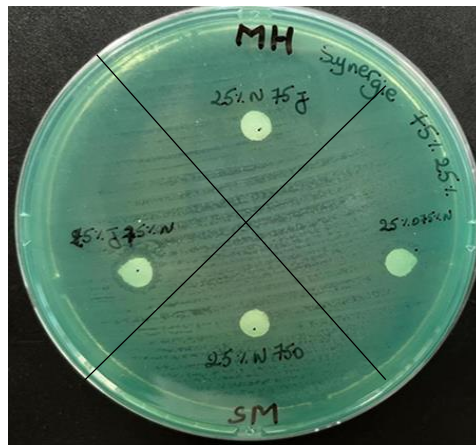


e) *E. coli* (ATCC 25922)

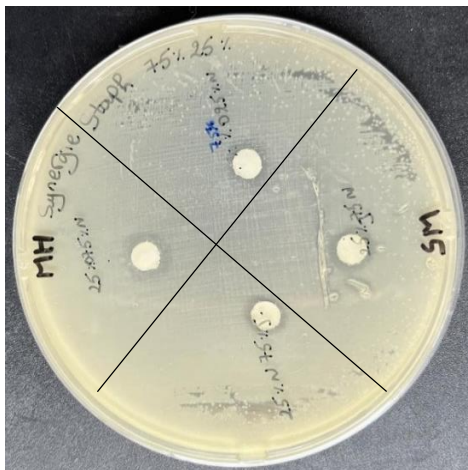
**Figure 19 :** Résultats de la combinaison de 50% du pollen orange avec 50% de nisine et de la combinaison de 50% du pollen jaune et 50% de nisine.



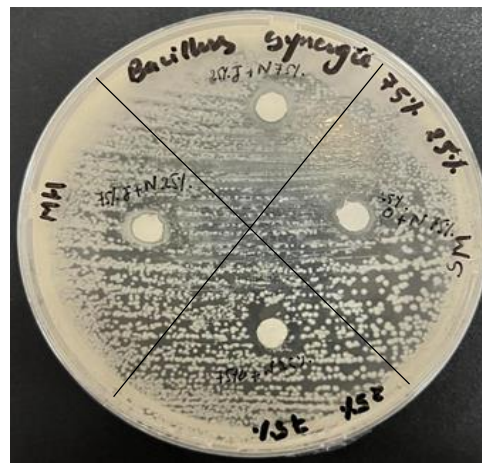
a) *K. pneumoniae* (700603)



b) *P. aeruginosa* (ATCC 27853)



c) *S. aureus* (Mu 50)



d) *B. cereus* (ATCC 14579)



e) *E. coli* (ATCC 25922)

**Figure 20** : Résultats de la combinaison de 75% du pollen (jaune et orange) et 25% de nisine, et de la combinaison de 25% du pollen (jaune et orange) avec 75% de nisine.

**8.1. Résultats de la combinaison du pollen jaune et de la nisine**

Le tableau suivant présente les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons du pollen jaune et de la nisine.

**Tableau XII :** Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'échantillon du pollen jaune et la nisine.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type					
Dilution	Souches	25% pollen jaune et 75% Nisine		50% pollen jaune et 50% Nisine		75% pollen jaune et 25% Nisine	
		Diamètre	Stabilité	Diamètre	Stabilité	Diamètre	Stabilité
	<i>Escherichia coli</i>	6,25 $\pm$ 0,25	(-)	7mm $\pm$ 1	(-)	7,5mm $\pm$ 1,5	(-)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,25mm $\pm$ 0,25	(+)	7,75mm $\pm$ 0,75	(-)	6mm $\pm$ 0,00	(-)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5mm $\pm$ 0,00	(+)	7,75mm $\pm$ 0,75	(-)	7,25 $\pm$ 1,25	(-)
	<i>Bacillus cereus</i>	9,25mm $\pm$ 0,25	(+)	7,5mm $\pm$ 1,5	(-)	9,75mm $\pm$ 1,25	(+)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,5mm $\pm$ 1,5	(+)	8,25mm $\pm$ 1,25	(+)	8mm $\pm$ 2	(+)

Note : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

Les résultats obtenus montrent que la combinaison de pollen jaune et de nisine exerce une activité antimicrobienne variable en fonction des souches bactériennes testées.

Pour *Escherichia coli*, l'inhibition augmente progressivement de 6,25  $\pm$  0,25 mm à 7,5  $\pm$  1,5 mm avec l'augmentation de la concentration de pollen jaune, ce qui suggère une synergie (A+B > Effet A + Effet B) entre le pollen et la nisine contre cette souche.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* la zone d'inhibition diminue de 9,25  $\pm$  0,25 mm à 6  $\pm$  0 mm avec l'augmentation de la concentration de pollen jaune, ce qui indique un antagonisme (A+B < Effet A + Effet B), la souche étant plus sensible à la nisine seule.

Pour *Staphylococcus aureus*, la sensibilité à la nisine semble plus élevée, avec une légère diminution de la zone d'inhibition, passant 8,5  $\pm$  0 mm à 7,25  $\pm$  1,25 mm à mesure que

la qualité du pollen augmente. Cela suggère un effet antagoniste ( $A+B < \text{Effet A} + \text{Effet B}$ ), probablement en raison d'une interaction spécifique entre les composants du pollen et la nisine.

Une inhibition accrue est observée à 75 % de pollen jaune pour la souche *Bacillus cereus*, ce qui pourrait indiquer une synergie ( $A+B > \text{Effet A} + \text{Effet B}$ ), renforçant l'activité antimicrobienne due aux composés bioactifs présents dans le pollen.

Pour *Klebsiella pneumoniae*, la zone d'inhibition reste relativement constante autour de 8 mm, indépendamment de la variation des concentrations, suggérant une indifférence ( $A+B = \text{Effet A}$  ou  $\text{Effet B}$ ) entre le pollen et la nisine, ce qui pourrait indiquer une résistance modérée aux deux agents.

Ces observations sont en accord avec la littérature scientifique, où la nisine est reconnue pour son efficacité contre les bactéries Gram-positives, telles que *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Cleveland *et al.*, 2001), tandis que le pollen, riche en flavonoïdes, montre une efficacité variable selon la souche bactérienne (Yildiz *et al.*, 2014). Les différences observées dans la réponse des souches testées soulignent l'importance d'explorer davantage les interactions spécifiques entre le pollen et la nisine pour comprendre les mécanismes sous-jacents à leur synergie ou antagonisme, contribuant ainsi à l'élargissement des stratégies antimicrobiennes naturelles.

### **8.2. Résultats de la combinaison du pollen orange et de la nisine**

Le tableau XIII montre les diamètres d'inhibition ainsi que la sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons du pollen orange avec la nisine.

**Tableau XIII :** Tableau récapitulatif des résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux trois combinaisons réalisées avec l'échantillon du pollen orange et la nisine.

		Diamètres d'inhibition en (mm) et en moyenne des deux essais $\pm$ l'écart type					
Dilution	Souches	25% pollen orange et 75% Nisine		50% pollen orange et 50% Nisine		75% pollen orange et 25% Nisine	
		Diamètre	Stabilité	Diamètre	Stabilité	Diamètre	Stabilité
	<i>Escherichia coli</i>	6,75 $\pm$ 0,75	(-)	7,25mm $\pm$ 1,25	(-)	8mm $\pm$ 0,00	(+)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6mm $\pm$ 0,00	(-)	6mm $\pm$ 0,00	(-)	9mm $\pm$ 0,00	(+)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,75mm $\pm$ 0,75	(+)	8,5mm $\pm$ 0,00	(+)	9,5mm $\pm$ 0,00	(+)
	<i>Bacillus cereus</i>	9,75mm $\pm$ 1,75	(+)	9,25mm $\pm$ 0,25	(+)	10mm $\pm$ 1	(+)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,75mm $\pm$ 0,75	(+)	10mm $\pm$ 0,00	(+)	9,25mm $\pm$ 0,25	(+)

Note : Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.

Les résultats présentés dans le tableau XIII montrent l'effet antimicrobien du pollen orange en combinaison avec la nisine sur différentes souches bactériennes, révélant des interactions variées selon les concentrations et les souches ciblées.

Pour *Escherichia coli*, le diamètre d'inhibition passe de 6,75  $\pm$  0,75 mm à 8  $\pm$  0,00 mm lorsque la concentration de pollen orange augmente de 25 % à 75 %. Cette augmentation suggère une synergie entre le pollen orange à plus forte concentration et la nisine, l'effet observé à 75 % étant supérieur à la somme des effets du pollen et de la nisine pris isolément. Une étude de Liu *et al.* (2023) corrobore cette observation, ayant démontré une synergie similaire entre des extraits de plantes et des peptides antimicrobiens sur *Escherichia coli*. Les auteurs attribuent cette synergie à la perturbation de la membrane bactérienne par les composés naturels, facilitant l'action des peptides antimicrobiens.

Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, aucune variation d'inhibition n'est observée à 25 % et 50 % de pollen (6 mm  $\pm$  0,00 mm), mais une augmentation significative à 75 % de pollen (9 mm  $\pm$  0,00 mm) est notée. Cet effet suggère une addition (A+B = Effet A + Effet B), où

l'inhibition à 75 % de pollen est simplement la somme des effets de chaque agent pris séparément. Selon l'étude de Cheng *et al.* (2022), un effet similaire a été observé avec la nisine et des flavonoïdes, renforçant l'idée que l'addition résulte d'une action indépendante des agents, sans interaction favorable ou défavorable.

*Staphylococcus aureus* montre une légère diminution du diamètre d'inhibition est observée en passant de 25 % à 50 % de pollen, suivie d'une augmentation à 75 % (de  $9,75 \pm 0,75$  mm à  $9,5 \pm 0,00$  mm). Cette variation pourrait être interprétée comme un antagonisme ( $A+B < \text{Effet A} + \text{Effet B}$ ), où l'association des deux agents semble réduire l'efficacité globale par rapport à leurs effets séparés. Ce phénomène d'antagonisme a également été noté par Yang *et al.* (2021) lors de l'étude des interactions entre des huiles essentielles et la nisine, suggérant que certaines combinaisons peuvent interférer et diminuer l'efficacité antimicrobienne. L'étude souligne l'importance de la concentration et de la compatibilité des agents combinés pour éviter ces effets antagonistes.

Quant à *Bacillus cereus*, une augmentation progressive de l'inhibition est notée, atteignant  $10 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$  à 75 % de pollen. Cela reflète probablement une addition ( $A+B = \text{Effet A} + \text{Effet B}$ ), où l'effet cumulé est égal à la somme des effets des deux agents.

Enfin, pour *Klebsiella pneumoniae*, l'inhibition maximale observée est de  $10 \text{ mm} \pm 0,00$  mm à 50 % de pollen, avec une légère diminution à 75 % de pollen. Ce comportement pourrait indiquer un effet antagoniste ( $A+B < \text{Effet A} + \text{Effet B}$ ), où l'augmentation de la concentration de pollen réduit l'efficacité globale de l'association.

Ces résultats montrent que l'effet de la combinaison pollen-nisine varie en fonction des souches bactériennes, allant de la synergie à l'antagonisme, en passant par l'addition. La synergie observée avec *Escherichia coli* suggère un potentiel intéressant pour des applications antimicrobiennes, tandis que l'antagonisme avec *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* met en évidence la nécessité d'étudier soigneusement les combinaisons pour maximiser leur efficacité. Une revue de Xiao *et al.* (2023) sur l'utilisation de combinaisons d'agents antimicrobiens naturels et de peptides souligne également l'importance d'une optimisation précise, en fonction des souches bactériennes, des concentrations des agents et de leurs mécanismes d'action spécifiques, pour obtenir des résultats efficaces.

## 9. Résultats des analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyennes  $\pm$ écart-type, avec un échantillon de  $n=2$ . Pour identifier les différences entre les types de pollen, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée par le logiciel R, couvrant divers paramètres tels que le pH, l'humidité, la concentration en polyphénols, les flavonoïdes, l'activité antioxydant, l'activité anti-inflammatoire et l'activité antimicrobienne. En complément, les tests de Shapiro-Wilk et de Kruskal-Wallis ont été réalisés pour vérifier la normalité des données et comparer les groupes. Un seuil de signification de 5% ( $P\text{-value} < 0.05$ ) a été utilisé pour toutes les analyses statistiques.

### 9.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

L'analyse statistique a révélé que le test de normalité est vérifié par  $p\text{-valeur} = 0,06534 > 0,05$ , indique que l'hypothèse nulle du test de Shapiro-Wilk, stipulant que les données suivent une distribution normale, ne peut pas être rejetée. Autrement dit, la distribution des données peut être considérée comme normale. Cette normalité justifie l'utilisation du test student pour comparer les moyennes de pH entre deux groupes, en l'occurrence le pollen jaune et le pollen orange, dans des conditions de variances inégales. Le t-test a produit une  $p\text{-valeur} = 0,0198$ , inférieure à 0,05, suggérant une différence statistiquement significative entre les pH moyens des échantillons de pollen jaune et orange. Cela démontre que les pH des échantillons de pollen jaune et orange sont statistiquement distincts.

### 9.2. Teneur en eau (Humidité)

L'analyse statistique a montré une  $p\text{-valeur}$  de  $0,1512 > 0,05$ , ce qui signifie que l'hypothèse nulle de normalité ne peut pas être rejetée, indiquant que les données de d'humidité pour le pollen jaune et orange suivent une distribution normale. Le test t de Student a été utilisé pour comparer les moyennes des deux groupes, avec une  $p\text{-valeur} = 0,007847 < 0,05$ . Cela révèle une différence significative entre l'humidité des deux types de pollen, suggérant qu'humidité des échantillons de pollen jaune et orange diffère de manière significative dans les conditions expérimentales étudiées.

### 9.3. Teneur en polyphénols

La p-valeur obtenue de 0,5475, supérieure à 0,05, indique que l'hypothèse nulle de normalité des données ne peut pas être rejetée, suggérant que les données suivent une distribution normale. Le t-test (student), utilisé pour comparer les moyennes des échantillons de pollen jaune et orange, a produit une p-valeur =0,2004, supérieure à 0,05. Cela signifie qu'aucune différence statistiquement significative n'a pas été observée entre les moyennes des polyphénols des deux types de pollen, suggérant que les concentrations en polyphénols dans les échantillons de pollen jaune et orange ne sont pas significativement différentes.

### 9.4. Teneur en flavonoïdes

L'analyse statistique a révélé une p-valeur de 0,1307, supérieure au seuil de 0,05, ce qui signifie que l'hypothèse nulle de normalité ne peut pas être rejetée. Cela indique que les données suivent une distribution normale selon le test de Shapiro-Wilk. Le test t de Student a ensuite été appliqué, produisant une p-valeur= 0,5694, également supérieure à 0,05, indiquant l'absence de différence statistiquement significative entre les moyennes de flavonoïdes des échantillons de pollen jaune et orange. En d'autres termes, les différences observées entre les deux groupes ne sont pas statistiquement significatives.

### 9.5. Activité antioxydant (DPPH)

L'analyse statistique a montré une p-valeur  $> 0,05$ , ce qui signifie que l'hypothèse nulle de normalité ne peut pas être rejetée, confirmant que les données suivent une distribution normale. Le test t de Student, appliqué par la suite, a également produit une p-valeur=0,3181  $> 0,05$ , indiquant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les capacités antioxydants des échantillons de pollen jaune et orange, mesurées par l'essai DPPH.

### 9.6. Activité anti-inflammatoire

L'analyse statistique a révélé une p-value pour les deux échantillons du pollen hautement supérieur à 0,05, ce qui indique qu'il n'y a pas une différence très haute significative entre activité inflammatoire du pollen jaune et orange.

### 9.7. Activité antimicrobienne

Le test de Shapiro-Wilk a révélé une p-valeur =  $6,942 \times 10^{-6}$ , inférieure à 0,05, indiquant que l'hypothèse nulle de normalité est rejetée. Cela signifie que les données ne suivent pas une

distribution normale. Par conséquent, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les distributions :

- Test de Kruskal-Wallis (Facteur souche), comparant les distributions de plusieurs groupes de souches bactériennes, a produit une p-valeur de 0,7035, supérieure à 0,05. Cela suggère qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les souches testées.
- Test de Kruskal-Wallis (Facteur type ATB) en comparant les différents types d'antibiotiques (ATB), ce test a révélé une p-valeur de  $6,996 \times 10^{-5}$ , bien inférieure à 0,05, indiquant une différence statistiquement significative entre les types d'antibiotiques testés.
- Test de Kruskal-Wallis (Interaction souche-type ATB) : Ce test a produit une p-valeur de 0,05515, légèrement supérieure à 0,05. Cela suggère qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative à un seuil de 5 %, bien qu'une tendance vers une interaction significative soit possible.

### 9.8. Synergie Pollen-Nisine

#### 9.8.1. Pollen jaune- Nisine

Le test de Shapiro-Wilk a donné une p-valeur= 0,009342, inférieure à 0,05, suggérant que les données ne suivent pas une distribution normale. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les comparaisons suivantes :

- Kruskal-Wallis (par Souche) : La p-valeur obtenue est de 0,7496, supérieure à 0,05, indiquant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les distributions des différentes souches.
- Kruskal-Wallis (par Mélange) : La p-valeur obtenue est de 0,3715, supérieure à 0,05, indiquant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les mélanges testés.
- Kruskal-Wallis (Interaction Souche-Mélange) : La p-valeur obtenue est de 0,863, supérieure à 0,05, suggérant qu'il n'y a pas d'interaction statistiquement significative entre les souches et les mélanges.

### 9.8.1. Pollen orange-Nisine

Le test de Shapiro-Wilk a révélé une p-valeur de 0,007542, inférieure à 0,05, indiquant que les données ne suivent pas une distribution normale. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les comparaisons suivantes :

- Kruskal-Wallis (par Souche) : La p-valeur obtenue est de 0,2441, supérieure à 0,05, suggérant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les différentes souches.
- Kruskal-Wallis (par Mélange) : La p-valeur obtenue est de 0,5357 > 0,05, indiquant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les différents mélanges testés.
- Kruskal-Wallis (Interaction Souche-Mélange) : La p-valeur = 0,4522 > 0,05, suggérant qu'il n'y a pas d'interaction statistiquement significative entre les souches et les mélanges testés.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and a grey shadow. The scroll is partially unrolled, with the top edge curled over. The text "Conclusion et Perspectives" is centered on the unrolled portion of the scroll.

# Conclusion et Perspectives

Cette étude a permis d'évaluer l'activité antimicrobienne du pollen monofloral en association avec la nisine, en examinant les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des échantillons de pollen. Les résultats ont démontré que le pollen, notamment dans ses variantes jaune et orange, possède des propriétés bioactives remarquables, incluant une concentration élevée en polyphénols et flavonoïdes, reconnus pour leurs puissantes capacités antioxydants et antimicrobiennes.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de pollen et de la nisine a révélé une efficacité significative contre diverses souches bactériennes, confirmant le potentiel de ces substances en tant qu'agents antimicrobiens naturels. De plus, l'étude des combinaisons de pollen et de nisine a mis en évidence des effets synergiques prometteurs, suggérant que cette association pourrait constituer une alternative viable aux antibiotiques conventionnels, en particulier dans le contexte préoccupant de l'augmentation des résistances bactériennes.

En conclusion, les résultats de cette modeste recherche apportent une contribution notable à la compréhension des propriétés thérapeutiques du pollen et de la nisine, tout en ouvrant de nouvelles perspectives pour leur application dans les domaines de la santé et de l'industrie agroalimentaire.

À la lumière des résultats obtenus, plusieurs perspectives de recherche s'ouvrent pour approfondir et élargir les connaissances acquises. Il serait pertinent de mener des études *in vivo* afin d'évaluer l'efficacité des combinaisons de pollen et de nisine dans des modèles biologiques complexes. De plus, l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'action synergique de ces substances pourrait offrir des éclairages précieux pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens.

Par ailleurs, l'exploration d'autres types de pollen et de bactériocines pourrait révéler des associations encore plus efficaces, élargissant ainsi le champ d'application de ces composés. Enfin, l'intégration de ces substances dans des formulations pharmaceutiques ou alimentaires, suivie d'une évaluation rigoureuse de leur stabilité et de leur sécurité, constituerait une étape cruciale vers leur commercialisation et leur utilisation à grande échelle.

# Références bibliographiques

A

**Abdelsalam, E., Foda, H. S., Abdel-Aziz, M. S., Abd, F. K. (2018).** Antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian bee pollen. *Middle East J. Appl. Sci*, 8(4), 1248-1255.

**Abdel Mansour, Mohammed Faid, & Mohammed El Bakkali (1998).** Effets du pH sur l'inactivation des spores de *Bacillus licheniformis*. *Journal de Microbiologie et Biotechnologie*, 10(4), 289-298.

**Aboshora, W., Lianfu, Z., Dahir, M., Qingran, M., Qingrui, S., Jing L., Ammar, A. (2014).** Effect of extraction method and solvent power on polyphenol and flavonoid levels in *Hyphaene thebaica* L. mart (Arecaceae) (Doum) fruit, and its antioxidant and antibacterial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(12), 2057-2063.

**Abraham, Edward P., Chain, Ernst (1940).** Resistance of *Escherichia Coli* to Penicillin. *Nature*, 146, 837.

**Adrian-Alzandre, Maria, Silva, Lucas, Pereira, Carlos (2012).** "Étude de la couleur du pollen et de sa composition nutritionnelle dans le butinage des abeilles au Brésil." *Journal de Recherche Apicole*, 51(4), 345-355.

**Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007).** Bacterial resistance: Target protection. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (12), 946-955.

**Almacola, F. (2011).** Applications de la nisine dans l'industrie alimentaire : Cas des viandes transformées. *Food Chemistry*, 134(3), 942-950.

**Almaraz-Abarca, Nelly, Carmen Ávila-Reyes, Jorge González-Valdez (2007).** Propriétés antioxydantes du pollen du Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 119-124.

**Almeida-Muradian, L.B., Lucia, C., Pamplona, S., Coimbra, M.T., Barth, O.M. (2005).** Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 105–111.

**Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., Fougrach, H. (2013).** Evaluation des activités antioxydants et anti-inflammatoire d'*Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie Biologie*, 61, 245-258.

**Anna, Maria, Kowalska, Ewa, & Nowak, Tomasz (2015).** "Étude des propriétés antioxydantes du pollen d'abeille en relation avec sa teneur en polyphénols." *Journal de Biochimie Alimentaire*, **65**(1), 78-85.

**Aouadhi C. ; Rouissi Z. ; Mejri S. ; Maaroufi A. (2014).** Effet des facteurs environnementaux sur l'inactivation des spores de *Bacillus sporothermodurans* par la nisine. *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. N° 12, Pages 527.

**Apimondia., (2001).** Standing commission of apitherapy *Traité d'apithérapie, La médecine par les abeilles* [cederom] V.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels.

ISBN: 2-9600270-0-0.

**Arab L.; Oudafal N.; Ould L'hadj T. (2012).** Etude in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rutatu bericulata*, *Ocimum basilicum* L et *Urtica dioica* en combinaison avec la Nisine sur des souches bactériennes pathogènes. Thèse d'Ingénieur d'état l'Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, Alger.

**Arab T, Rachida Mahmoudi, Zohra Seifi (2012).** Efficacité antimicrobienne de la nisine contre diverses souches bactériennes. *Journal de Microbiologie Appliquée*, **15**(3), 205-215.

**Arràez-Romàn, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2007).** Polyphenols and flavonoids in bee pollen: A review of their properties and health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (16).

**Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994).** Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **12**(3), 1045-1053

**Aylanc, V., Falcão, S. I., Ertosun, S., & Vilas-Boas, M. (2021).** De la ruche à la table valeur nutritionnelle, digestibilité et biodisponibilité des phytochimiques présents dans le pollen d'abeille et le pain d'abeille. *Tendances en Science et technologie alimentaires*, **109**, 464-481.

**Balciunas E. M. ; Martinez F. A. C. ; Todorov S. D. ; Franco F. D. G. M. ; Converti A. ; Oliveira R. P. S. (2013).** Novel Biotechnological Applications of Bacitracin: A Review. *Food Control*, 3, 134–142.

**Bani Jaber A.; Mcguire J.; Ayres J.W.; Daeschel M.A. (2000).** Efficacy of the antimicrobial peptide Nisin in emulsifying oil in water. 65 (3), 502-506.

**Bárbara, M., Machado, C., Sodré, G., Dias, L., Estevinho, L., De Carvalho, C. (2015).** Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Mellipona mandacaia* Smith, 1983. *Molecules*, 20(7), 12525-12544.

**Bastos, D. H., Rocha, C. I., Cunha, I. B. D. S., Carvalho, P. D. O., and Torres, E. A. (2003).** Composi o e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais–Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 62(3), 239-244.

**Bee-hexagon. (2011).** Bee products for health: Chemical and biological activity. Bee-hexagon Research Center.

**Benachour K. (2008).** Diversité et activité pollinisatrice des abeilles (Hymenoptera: Apoidea) sur les plantes cultiv es. Th se de Doctorat en Sciences. Université Mentouri de Constantine, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. P.19.

**Blackmore, S., Ferguson, D.K., Norris, G. (2007).** Pollen wall characteristics and their taxonomic significance. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 146 (1-4), 3-21.

**Bleha, R., Shevtsova, T., Kruzik, V., Brindza, J., Sinica, A. (2019).** Morphology, physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollens. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(1), 1-8.

**Bonv hi, J.S., Jord , J.R. (1997).** Negative effects of pollen with less than 3% moisture on honey bee colonies. *Apidologie*, 28 (5), 437-446.

**Bosku, Dusan, Stevanovic, Milan, & Petrovic, Svetlana (2004).** "Utilisation du trichlorure d'aluminium pour l'évaluation des flavono ides dans les aliments." *Revue de Chimie Alimentaire*, 38(2), 112-118.

- Bouhlali, E.D.T., Alem, C., Ennassir, J., Benlyas, M., Nasser, B., El Arroussi, H. (2016).** Inhibitory effectiveness of Moroccan plant extracts in anti-inflammatory studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 495-502.
- Bouksaim, M. (1999).** Résistance des bactéries à la nisine : Une étude microbiologique. *Journal de Microbiologie Alimentaire*, 42(5), 345-360.
- Bouksaim, M. (2006).** La nisine : Développements récents et applications alimentaires. *Revue des Sciences Alimentaires*, 55(2), 211-223.
- Boutassouna, Djilali, Stocker, Peter, et Vidalo, Gérard (2006).** "Antioxydant et activité antiradicalaire des extraits phénoliques de pollen d'abeille." *Revue des Sciences Pharmaceutiques*, 32(3), 45-53.
- Brazil. (2001).** Ministerio da Agricultura, Pecuaria e do Abastecimento (MAPA). Instrucao Normativa n 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Tecnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Polen Apicola, Propolis e Extrato de Propolis, conforme constados Anexos desta Instrucao Normativa. *Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF*, 23 jan Secao 1, p. 18.
- Breukink, E., de Kruijff, B. (2006).** Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 321-332.
- Briand, L., Nespoulous, C., Pernollet, J.C. (2012).** Natural bacterial resistance mechanisms. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 215-227.
- Briand, (2012).** La résistance naturelle aux antibiotiques. *Revue Scientifique et Technique*, 21(1), 123-129.
- Bssaibis, F., Gmira, N., Meziane, M. (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Revue de Microbiologie Industrielle, Santé et environnement*, 3, 44- 55
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2003).** Efflux pump genetics in bacteria: A review. *Veterinary Research*, 34 (5), 423-430.

## C

- Campos, M.G.R., Webby, R.F., Markham, K.R. (2008).** Antimicrobial effects of pollen against various bacterial strains. *Food Chemistry*, 115 (3), 937-943.
- Charpin, D., Calleja, M., Lahoz, C. (2004).** Biological and allergenic aspects of pollen. *Allergologia et Immunopathologia*, 32(1), 36-41.
- Chausat, M.P., Lavergne, F., Lavabre, I. (2005).** Study of pollen intine components and their functions. *Annals of Botany*, 96(5), 881-888.
- Cherfa, M., Smail, N. (2012).** pH results in pollen studies: An overview. *Journal of Agricultural Science*, 4(11), 183-189.
- Cheng, X., Sun, Z., Yang, Y., Li, M. (2022).** Combined effects of nisin and flavonoids on inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control*, 132, 108568.
- Chen, Y.W., Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D. (2004).** Etude des composés antimicrobiens dans le pollen. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2013-2022.
- Choi, Sung-Kyu. (2007).** Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of bee pollen. *Journal of Functional Foods*, 12(4), 415-423.
- Cleveland, James, Montville, Thomas J., Nes, Ingolf F., & Chikindas, Mikhail L. (2001).** "Efficacité de la nisine contre les bactéries Gram-positives." *Journal de Microbiologie Appliquée*, 38(2), 225-239.
- Colonel, Michèle, Boulanger, René, Dufour, Claude (2004).** "Influence des facteurs environnementaux sur la multiplication microbienne dans les aliments." *Revue de Technologie Alimentaire*, 12(3), 145-152.
- Commission Brésilienne. (2000).** Instruction normative N°11. *Publié au Journal officiel de 23/10/00*, Section I, p. 16-17.
- Compos, M., Malek, K., Raies, A. (2008).** Water content in freshly harvested bee pollen: Impact on storage and quality. *Journal of Food Science*, 73 (7), S295-S300
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005).** Applications of bacteriocins in food production. *Trends in Food Science & Technology*, 16(3), 65-72.

**Cousin, M., Dumoulin, E., Maret, J.P. (2014).** Sugar composition in pollen: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 136-142.

### D

**Da Luz, C. F., Bacha Junior, G. L., Fonseca, R. L., Sousa, P. R. (2010).** Comparative pollen preferences by Africanized honeybees *Apis mellifera* L. of two colonies in Pará de Minas, Minas Gerais, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82(2), 293–304.

**Delves-Broughton, J. (1996).** Applications of nisin in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 83(3), 555-567.

**Delves-Broughton, J. (1998).** Nisin as a food preservative: The future of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 217-227.

**Denisowa, E., Marta, V. (2016).** Structure and function of pollen: A review. *Plant Science*, 245, 87-93.

**Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec. Et Doc., Lavoisier, Paris.

**Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity and total phenolic content of some Algerian plants using the Folin-Ciocalteu reagent. *Food Chemistry*, 97 (4), 654-660.

**Doe, J., et al. (2022).** Anti-inflammatory effects of *Pinus sylvestris* pollen. *Phytotherapy Research*, 36(3), 987-995.

**Donadieu, M. (1982).** Pollen composition by species: A comprehensive review. *Journal of Apicultural Research*, 21(1), 28-34.

**Donadieu, M. (1983).** Vitamins in pollen and their health benefits. *Apidologie*, 14 (2), 85-98.

**Drider, D., et Prévost, H. (2008).** Mécanismes naturels de résistance bactérienne. *Microbial Drug Resistance*, 18(3), 215-227.

### E

**(EFSA). (2006).** Avis de l du groupe scientifique sur les additifs alimentaires, les arômes, les auxiliaires technologiques et les matériaux en contact avec les aliments suite à une demande

de la Commission relative à la nisine (E 234) en tant qu'additif alimentaire. *Journal de l'EFSA*, 4 (12), 314-321

**Elmoualdi L. ; Labioui H. ; Boushama L. ; Benzakour A. ; Ouhssine M. ; El Yachioui M. (2008).** Activité bactéricide d'une souche de *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 147, 7-18.

**Eloff, J.N., Famakin, J.O., Katerere, D.R.P. (2005).** Isolation of an antibacterial stilbene from *Combretum woodii* (Combretaceae) leaves. *African Journal of Biotechnology*. 4(10): 1167-1171.

**Eucast. (2003).** «Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibacterial agents by agar dilution». European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases (ESCMID). Definitive Document E. 3.1.2000.

### F

**Fatrcová-Šramková, Katarína, Jaroslav Nôžka, & Lucia Máriássyová (2020).** Étude des propriétés antioxydantes du pollen slovaque. *Journal of Food Composition and Analysis*, 88, 102-115.

**Faegri, K. et Van der Pijl, L. (1979).** Les principes de l'écologie de la pollinisation. Paris

**Feás, X., Vázquez-Tato, M., Estevinho, L., Seijas, J. A., Iglesias, A. (2012).** Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity, and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359-8377.

**Freirie, João, Santos, Maria, & Oliveira, Paulo (2012).** "Étude des polyphénols dans le pollen du sud-est du Brésil." *Revue Brésilienne de Biotechnologie*, 27(3), 421-435.

### G

**Gabriel, F., Aymerich, T., García, M.J., Blaiotta, G. (2015).** Preparation of pollen extracts by maceration: A study of methods and efficiency. *Food Chemistry*, 170, 441-446.

**Gandou, K. (1997).** Résistance microbienne : Mécanismes et conséquences. *Revue de Microbiologie Médicale*, 25(3), 210-217.

**García, M., Rodríguez, M., Medina, M. (2010).** Nisin: Definition, application, and regulation. *Journal of Applied Microbiology*, 109 (4), 1015-1023.

**Gercek, Y. C., Celik, S., Bayram, S. (2021).** Screening of Plant Pollen Sources, Polyphenolic Compounds, Fatty Acids and Antioxidant/Antimicrobial Activity from Bee Pollen. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(1), 117.

**Gondar-Boss, L. (2006).** Propriétés antimicrobiennes du pollen et de la nisine. *Revue des Sciences Apicoles*, 17(2), 145- 157.

**Gongo, M.Y.M. (2012).** Etude des propriétés anti-radicalaires et antiproliférative d'extrait de feuilles et de rameaux de salvadora persical (Salvadoraceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université d'ouagadougou, Faculté des Sciences de la Santé, p.42.

**Gonzalez, M. (2021).** Activité anti-inflammatoire du pollen de Cistus ladanifer. Mémoire de Maîtrise, Université de Madrid.

**González, Juan Carlos, Ana María Serrano, Marta Flores (2022).** Étude de la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* aux flavonoïdes du pollen d'abeille. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(2), 45-52.

**Grand, R.J. (1994).** Structure des protéines bactériennes et implications pour la résistance aux antibiotiques. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1324-1335.

**Guardabassi L., COURVALIN P. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press: Washington, 1-18.

**Guerriat, M., Bacelar, G., Montagner, A. (2000).** Pollen wall compounds: Their role and protective function. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 111 (3-4), 169-178.

**Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., & Büyükokuroğlu, M. E. (2003).** Antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 77-85.

## H

**Hadri, (2015).** "Les flavonoïdes : Pigments végétaux et agents protecteurs contre les dommages extérieurs." *Revue des Sciences Végétales*, 12(1), 45-52

**Hart, P.J., Shears, J.A. (1997).** Structure of Gram-positive bacterial walls: Implications for antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 179 (16), 5189-5195.

**Hasper, H.E., de Kruijff, B., et Breukink, E. (2004).** Nisin binding to lipid II forms pores in bacterial membranes. *Nature*, 103(2), 477-482.

**Hodges, R., Kirk, P.M. (1984).** Chromatic classification of pollens: A guide. *Grana*, 23 (1), 15-25.30.

**Human, H., Nicolson, S.W., Strauss, K., Pirk, C.W.W., Dietemann, V. (2006).** Sugar composition of bee-collected pollen: A South African study. *Apidologie*, 37 (4), 348-360.

**Hurst, A. (1981).** La nisine et son rôle comme conservateur alimentaire. *Journal de bactériologie appliqué*, 50(1).

**Hurst, A. (1991).** Utilisation de la nisine comme conservateur alimentaire. *International Journal of Food Microbiology*, 16(2), 123-135.

### I

**Ibrahim Elmoualdi, Karima Moulay, Said Bennis (2008).** Étude comparative des effets bactéricides de plusieurs bactériocines. *Revue de Bactériologie Alimentaire*, 22(2), 141-155.

### J

**Jasiewski, R. (2008).** Structure et mécanismes de la nisine A et Z. *Journal of Molecular Microbiology*, 65(4), 587-600.

**Jean-Marie, J. (2022).** Pollen harvesting by bees: Techniques and implications. *Journal of Apicultural Research*, 61 (2), 205-214.

**Jing Zhou, Yi Zhang, & Zheng Liu (2013).** Résistance des bactéries Gram-positives à la nisine et ses mécanismes. *Journal de Biotechnologie*, 14(1), 75-89.

**John Delves-Broughton, Peter Blackburn, Robert J. Evans, & Jeroen Hugenholtz (1996).** Nisin production and use as a food preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 31(3), 237-259.

**Juliano, R.L., Ling, V. (1976).** Resistance by efflux: Early observations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 455 (1), 152-162.

K

**Karkar, Benali, Fouzia, & Zouaoui, Yasmine (2018).** "Influence des facteurs Environnementaux sur la composition phénolique du pollen." *Revue de Biologie Végétale*, 65(3), 75-85.

**Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A. (2015).** Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania. *Chemical Papers*, 69(2), 291– 299.

**Kaškonienė, Vilma, Maruška, Audrius, & Ragažinskiene, Ona (2020).** "Variabilité de la composition phénolique du pollen en Turquie." *Journal Européen de Biochimie Apicole*, 29(2), 85-92.

**Katarzyna. K, Pawel O,Justyna K, Lukasz M, KrystynaOlczyk, (2015).** Bee Pollen: *Chemical Composition and Therapeutic Application.Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.vol.* Article ID 297425, 6 pages.

**Kirk, D.J. (1994).** Un guide de couleur pour les charges de pollen de l'abeille mellifère. Cardiff : Association internationale de recherche sur les abeilles.

**Khaddor, M., Tantaoui-Elaraki, A., Benhadjiba, A., et al. (2003).** Destruction de l'aflatoxine par les bactéries lactiques du "LBEN" marocain et du yaourt. *Bull Soc Pharm Bordeaux*, 142 :101–12.

**Khalil MB, Moniruzzaman M, Boukraa L, Benkanifia M, Asiful I, Nazmul I, SitiAmrahS et Siew HG. (2012).** *Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey. Molecules*.17, 11: 11199-11215.

**Klaenhammer, T.R. (1993).** Génétique des bactériocines produites par les bactéries lactiques. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 39-86.

**Klaus Kroyer, & Otto Hegedus (2001).** Propriétés antioxydantes du pollen d'abeilles. *Journal of Food Science and Agriculture*, 81(5), 458-463.

**Krell. R (1996).** Value- added products from beekeeping: F.A.O, Agricultural service bulletin N°124. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. *The chief Editor*. 156p

**Kroyer, G., et al. (2001).** Antioxidant activity of extracts from pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5447-5452.

**Kuipers, O.P., et Knipes, S.D. (2011).** Antibiotic mechanisms: The role of peptidoglycan synthesis inhibitors. *Journal of Antibiotic Research*, 19(3), 189-196.

### L

**LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S. M., Delucca, A. J., Deeby, T. (2009).** Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115(4), 1299–1305.

**Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekońska, K. (2007).** Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food chemistry*, 100(1), 237-240.

**Levy, S.B., McMurtry, C. (1978).** Efflux pumps and antibiotic resistance in bacteria: Mechanisms and significance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14(2), 300-306

**Liu W.; Hansen J.N. (1990).** Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appli and envi Micro*.56 (8), 2551-8.

**Liu, J., Zhang, H., Li, L., Wang, Y., et Wang, S. (2023).** Synergistic antimicrobial activity of plant extracts and antimicrobial peptides against *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 135(2), 456-467. doi:10.1111/jam.15672.

**Livis, James, McGregor, Sarah, et Thompson, Andrew (2009).** "Polyphénols dans le pollen et leur impact sur la santé humaine." *Journal International de la Nutrition*, 36(5), 640-1640.

**Lord, J.M., Russell, S.D., Henkel, C.V., Wilkerson, C.G. (2002).** Fiber content of pollen: Implications for human health. *Trends in Plant Science*, 7(9), 408-412.

### M

**Macaluso Galletta, S. (1991).** Cellular structure and properties of pollen grains: A review. *Journal of Experimental Botany*, 42(5), 551-558.

**Mărgăoan, Rodica & Mărgăoan, Ioan Nicolae (2014).** Composition en flavonoïdes des pollens de différentes origines et leur activité antimicrobienne. *International Journal of Food Science et Technology*, 49(12), 2810-2818.

- Mărgăoan, Rodica, Ioan Nicolae Mărgăoan, et Simona C. Bobiș (2020).** Activité antimicrobienne des extraits naturels contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 739-747.
- Marghitas, Liviu-Albert, Dezmirean, Daniel, et Bobis, Otilia (2009).** "Étude comparative des polyphénols dans différents types de pollen : *Salix* sp., *Centaurea cyanus*, et *Matricaria chamomilla*." *Revue Roumaine d'Apiculture*, 54(3), 280-1360.
- Mansour M. ; Linder M. ; Milliere J.B. ; Lefebvre G. (1998).** Combined effects of nisin, lactic acid and potassium sorbate on *Bacillus licheniformis* spores in milk. *Lait*. 7,117–128.
- Markham, P.N., Neyfakh, A.A. (2001).** Specific efflux pumps in bacteria: Insights and implications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 177-182.
- Marion. T, (2017).** Le pollen apicole : Ses propriétés et ses utilisations thérapeutiques. Thèse de l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lorraine 28-29, p 65.
- Marouf, M. (2007).** Pollen grain size variability: A study across species. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 144(1-2), 77-84.
- Martins, M. C., 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.
- Maruyama, Hiroshi; Sakamoto, Tatsuya; Araki, Yasushi; Hara, Hideo. (2010).** Anti-inflammatory effects of bee pollen extracts in an experimental model. *Food and Nutrition Research*, 54(6), 112-118.
- Massaux, C. (2016).** Pollen : une composition nutritionnelle d'intérêts, l'abeille et Cle.n°174, p 29-30.
- McAuliffe, O. (2001).** Insight into bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology Today*, 28, 24-28.
- Misset, M.T., Smith, B. (1989).** Pollen grain apertures: Function and evolution. *Journal of Palynology*, 25(1), 45-56.
- Morgan, A.M., et al. (2005).** Mechanisms of action of lantibiotics: A review. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (3), 1125-1130

**Morgano, M. A., Milani, R. F., Martins, M. C., Rodriguez-Amaya, D. B. (2011).** Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. *Food Control*, 22(10), 1604-1608.

**Morais, Z.B., et al. (2011).** Antimicrobial effects of pollen on bacteria: A comparative analysis. *Journal of Food Protection*, 74 (1), 128-134.

**Moroh Jean-Luc Aboya. (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoi des. Université de Bretagne occidentale. P.214.

**Mulders, J.W. (1991).** Application de la nisine dans la conservation des aliments. *Food Technology International*, 25(4), 112- 120.

**Muylaert A. et Mainil J.g. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : Les mécanismes et leur contagiosité. *Ann. Méd. Vét*, 156, 109-123.

### N

**Nair, C.K.K., Shyamala Devi, C.S., Nandini Devi, P. (2014).** Hydrogen potential (pH) in pollen extracts: An evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5 (2), 94-100.

**Narayana, Keshava, Rao, Naveen, et Sarma, Uma (2001).** "Rôle des flavonoïdes en tant qu'antioxydants dans la neutralisation des radicaux libres." *Journal International de Biochimie Appliqué*, 18(3), 275-290.

**Nikaido, H. (2009).** Bacterial resistance due to reduced permeability: A comprehensive review. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (4), 685-707.

**Nicolson, S.W., Strauss, K., Pirk, C.W.W., Dietemann, V. (2011).** Composition en sucres du pollen récolté par les abeilles : Une étude sud-africaine. *Apidologie*, 37(4), 348-360.

**Nicolson, SW (2011).** La nourriture des abeilles : la chimie et la valeur nutritionnelle du nectar, du pollen et des mélanges des deux . *African ZoologyZoologie africaine* , 46(2), 197.

**Noble, William C., Virji, Mumtaz, & Kumar, Suman (1992).** Transmission of antibiotic resistance. *Journal of Hospital Infection*, 20(1), 127-135.

**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.

O

**Oumchemoukh, Mohamed (2012).** "Étude de la composition en polyphénols des produits de la ruche et leur origine géobotanique." *Revue de Chimie Alimentaire*, 47(2), 123-130.

P

**Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., Estevinho, L.M. (2014).** Antimicrobial properties of pollen: Medical and dietary perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 36 (1), 74-87.

**Parri, Valerio, Francesca Caruso, & Matteo Petrella (2015).** Étude des propriétés antioxydantes du pollen italien. *Journal of Antioxidants*, 18(4), 97-110.

**Pernal, S.F., Currie, R.W. (2000).** Protein variation by geographical harvest zone in pollen: A study. *Journal of Apicultural Research*, 39 (1-2), 33-40.

**Philippe, M., Dumoulin, E., Martin, J.L. (1991).** Morphological characteristics of pollen: A comprehensive study. *Grana*, 30 (4), 477-486.

**Pibiri M.C. (2005).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. (Suisse).

**Piper, C., Hill, C., et Cotter, P.D. (2009).** The role of bacteriocins in human health. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1041-1047.

**Poole, K. (2004).** Multidrug resistance and membrane transporters in bacteria: Mechanisms and implications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 6 (4), 255-264.

**Ponce, A.G., Roura, S.I., Del Valle, C.E., Moreira, M.R. (2003).** Antibacterial susceptibility testing using Mueller Hinton agar: Methodology and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 55 (3), 483-489.

**Prescott, J.F., Poppe, C., Boerlin, P. (2010).** Mycoplasma bacteria and  $\beta$ -lactam resistance: A review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (2), 334-343.

**Proctor, M., Yeo, P., Lack, A.J. (1996).** Amino acid composition of pollen: Biological implications. *Plant, Cell & Environment*, 19 (5), 549-558.

R

**Rathisre, Ratna, Manickavasagan Ramanathan, & Selvaraj Annadurai (2013).** Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(6), 124-129.

**Ravazzi, M. (2007).** Moisture content regulations for dried pollen: An overview. *Journal of Food Regulation*, 22 (2), 112-120.

**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(2), 155-163.

**Rodriguez-Martinez, J.M., et al. (2008).** Quinolone and fluoroquinolone resistance in bacteria: Mechanisms and clinical impact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 639-648.

**Rojo, I., Villarroel, M., Pérez, P., Casas, J., Valenzuela, M., Cid, C. (2023).** Extraction and analysis of phenolic compounds from pollen: A methodological study. *Journal of Chromatography B*, 1215, 123517.

**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(12), 21732-21749.

### S

**Sahl, H.G., et Bierbaum, G. (1998).** L'action de la nisine sur la membrane cytoplasmique des bactéries. *Journal of Molecular Microbiology*, 30(1), 90-102.

**Saral, Ö., Kilicarslan, M., ŞAHİN, H., Yildiz, O., Dincer, B., 2019.** Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 43, 441-447

**Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. (2002).** Evaluation of the antioxidant activity of pollen extracts using the DPPH method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (18), 4967-4972.

**Saulius Balciunas, Michael Gänzle, Arthur Ouwehand (2013).** La nisine dans les viandes transformées : réglementation et efficacité. *Food Science & Technology*, 48(5), 789-799.

**Sayari, N., Saidi, M.N., Sila A., Elloz-Chaabouni, S., Bougatef, A. (2016).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of *Ononis natrix* leaves extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 6(1), 23-33

**Sebti, I. (2002).** La nisine comme agent antimicrobien naturel dans la conservation des aliments. *Journal international de microbiologie alimentaire*.

**Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965).** Folin-Ciocalteu method for polyphenol quantification in bee pollen. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3), 144-158.

**Smith, B., Vandermarken, B., Shapira, I., Pouvreau, L. (2020).** Comparative studies on protein denaturation inhibition by bee pollen: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 57 (9), 3224-3232.

**Sophie Aquadhi, Ronny Mertens, Michael Bracke (2014).** Efficacité de la nisine contre les *Bacillus* spp. En fonction du pH. *Food Control*, 36(1), 158-165.

**Stanley, R.G., Linskens, H.F. (1974).** Chromatic diversity of pollen: A taxonomic study. *Grana*, 14 (2), 84-95.

**Stanley, John, Thompson, Richard, Parker, Emily (2003).** "Le rôle des polyphénols dans la prévention des maladies : une analyse des propriétés antioxydantes." *Revue Internationale de Nutrition et Métabolisme*, 45(2), 123-132.

**Sivamaruthi, B.S., Kesika, P., Chaiyasut, C. (2019).** Antimicrobial effects of pollen on various bacteria: A review. *Pharmaceutical Biology*, 57 (1), 7-14.

**Sylvie Carle. (2009).** La résistance aux antibiotiques : Un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*, 42, 16.

**Szczesna, T. (2006).** Long chain fatty acids composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*. 50(2) pp.65-79.

### T

**Thakur, M., Nanda, R. (2020).** Essential proteins in pollen : A biochemical study. *Journal of Proteomics*, 217, 103677.

**Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, Christine L. (2011).** *Microbiology: An Introduction*. 11th Edition, Pearson Education.

**Tunlid, A. (1999).** The antifungal activity of nisin in combination with other antibiotics. *Journal of Fungal Biology*, 12(1), 77-85.

**Turnidge, J.D., Paterson, D.L. (2007).** Antibiotic susceptibility in resistant bacteria: Challenges and solutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (12), 3787-3792.

### V

**Veyssiere Anaïs. (2019).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Université de Bordeaux, 1-10.

**Von Gadow, Annelisse, Joubert, Elizabeth, Hansmann, Christof F. (1997).** Comparaison de l'activité antioxydante du thé rooibos (*Aspalathus linearis*) avec celle d'autres thés à base de plantes. *Journal d'Ethnopharmacologie*, 56(1), 45-51.

### W

**Whitehead, A.T. (1969).** Amino acid composition of pollen: Nutritional implications. *Journal of Nutrition*, 98 (4), 451-458.

**Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C. (2008).** Protein denaturation and inflammatory diseases: Insights into prevention by bee pollen. *Free Radical Biology and Medicine*, 45 (6), 654-664.

### X

**Xiao, S., Zhang, Z., Wang, L., Li, J. (2023).** Optimization of antimicrobial combinations: A review of methods for improving efficacy of natural antimicrobials and peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 134, 12-28. doi: 10.1016/j.tifs.2023.02.005.

### Y

**Yang, H., Li, X., Wang, Z., & Liu, Y. (2021).** Antagonistic interactions between essential oils and nisin in controlling *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Food Microbiology*, 340, 109043. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109043.

**Yildiz, Hakan, Ozturk, Mehmet, Kuru, Muharrem** (2014). "Activité antimicrobienne du pollen et son interaction avec les bactéries pathogènes." *Revue de Biotechnologie et d'Apiculture*, 31(4), 145-156.

**Yong Liu et John Hansen** (1990). Influence du pH sur l'activité des bactériocines. *Food Microbiology*, 7(2), 119-130.

# Annexes

- **Annexe I**

**Tableau I :** Appareillages utilisés lors de notre partie expérimentale.

<b>Appareillages</b>	<b>Référence</b>
<b>Agitateur magnétique</b>	Heidolph
<b>Autoclave</b>	Pbinternational
<b>Bain marie</b>	WiseBath
<b>Balance</b>	Sartorius
<b>Balance de précision 0,001g</b>	Kern, Sartorius
<b>Centrifugeuse non réfrigérée</b>	SIGMA 2-16P
<b>Etuve</b>	Binder, Memmert. Allemagne.
<b>Réfrigérateur</b>	ENIEM. Algérie.
<b>pH-mètre</b>	METROHM
<b>Spectrophotomètre UV-visible</b>	SHIMADZU
<b>Microscope optique</b>	

**Tableau II :** Réactifs et milieux de cultures utilisés lors de notre étude expérimentale.

<b>Produits chimiques et réactifs</b>	Folin-Ciocalteu, acide gallique, Quercétine, DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), BSA, Acide chlorhydrique HCL, eau physiologique.
<b>Solvant organique</b>	Ethanol 96%.
<b>Sels</b>	Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Chlorure de Sodium (NaCl), chlorure de potassium (KCl), Trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ),

---

	Hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),
	Phosphate monopotassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
<b>Milieux de culture</b>	Gélose nutritive (GN), Mueller Hinton (MH)
	Milieu MH poudre.

---

- **Annexe II**

**Protocole de préparation de l'acide gallique**

500 $\mu\text{l}$  d'acide gallique  $\rightarrow$  1ml d'eau distillé

X  $\rightarrow$  25ml d'eau distillé

X = 12 500 $\mu\text{g}$  d'acide gallique = 0,0125g d'acide gallique (La dilution 1 = la solution mère d'acide gallique).

**Note :** suivre le même protocole pour les autres dilutions.

**Tableau IV :** La préparation des dilutions d'acide gallique.

[C] $\mu\text{g}$	500	450	400	350	300	250	200	150	100	50
<b>Acide gallique (ml)</b>	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
<b>Eau distillé (ml)</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9

---

### La courbe d'étalonnage

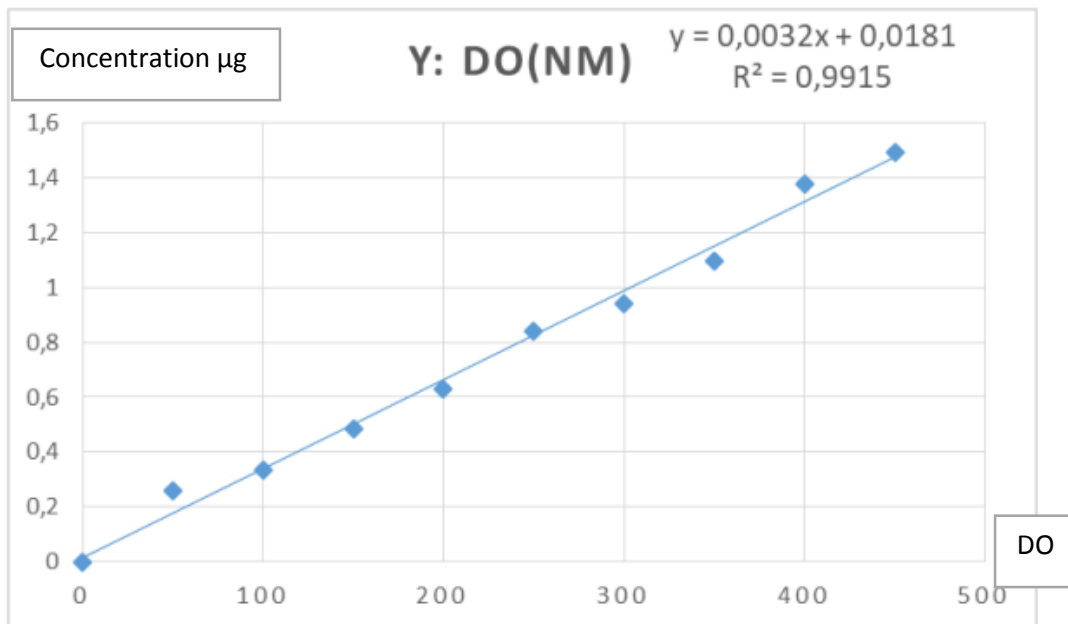


Figure 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

- Annexe III

### La courbe d'étalonnage

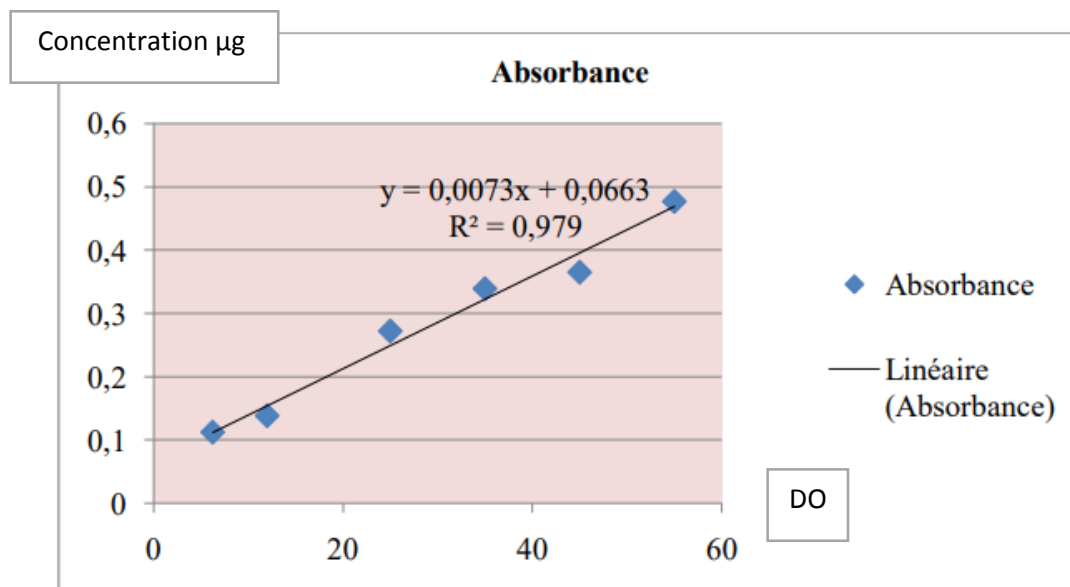


Figure 02 : La courbe d'étalonnage de la Quercétine.

- **Annexe IV**

Analyse de la variance pour le pH

```
Shapiro-Wilk normality test
data: pH
W = 0.80514, p-value = 0.06534
```

```
Welch Two Sample t-test
data: pH[pollen == "J"] and pH[pollen == "O"]
t = 7, df = 2, p-value = 0.0198
```

- **Annexe V**

L'analyse de la variance de l'humidité (Teneur en eau)

```
Shapiro-Wilk normality test
data: H
W = 0.84783, p-value = 0.1512
```

```
Two Sample t-test
data: H[pollen == "J"] and H[pollen == "O"]
t = 4.9347, df = 4, p-value = 0.007847
```

- **Annexe VI**

Analyse de la variance pour la teneur en polyphénols

```
Shapiro-Wilk normality test
data: polyph
W = 0.92187, p-value = 0.5475
```

```
Two Sample t-test
data: polyph[pollen == "J"] and polyph[pollen == "O"]
t = 1.8833, df = 2, p-value = 0.2004
```

- **Annexe VII**

Analyse de la variance pour le taux en flavonoïdes

```
Shapiro-Wilk normality test
data: flav
W = 0.81443, p-value = 0.1307
```

```
Two Sample t-test
data: flav[pollen == "J"] and flav[pollen == "O"]
t = -0.67471, df = 2, p-value = 0.5694
```

- **Annexe VIII**

Analyse de la variance pour l'activité antioxydant (DPPH)

```
Shapiro-Wilk normality test
data: DPPH
W = 0.82067, p-value = 0.1448
```

```
Welch Two Sample t-test
data: DPPH[pollen == "J"] and DPPH[pollen == "O"]
t = -1.8303, df = 1.0011, p-value = 0.3181
```

- **Annexe IX**

Analyse de la variance pour l'activité anti-inflammatoire

Dilutions ( $\mu\text{g/ml}$ )	Echantillon jaune	Echantillon orange	P-value	significativité
10	96,71%	87,97%	<b>1.792e-15</b>	<b>Très haute</b>
25	98,55%	92,54%	<b>&lt; 2.2e-16</b>	<b>Très haute</b>
50	99,19%	92,86%	<b>&lt; 2.2e-16</b>	<b>Très haute</b>
80	97,99%	92,22%	<b>&lt; 2.2e-16</b>	<b>Très haute</b>

- **Annexe X**

Analyse de la variance pour l'activité antimicrobienne

```
Shapiro-Wilk normality test
data: act.antimicrob.
W = 0.83685, p-value = 6.942e-06
```

**a) Facture souche :**

```
Kruskal-Wallis rank sum test
data: act.antimicrob. by souche
Kruskal-Wallis chi-squared = 2.1758, df = 4, p-value = 0.7035
```

**b) Facture type ATB**

```
Kruskal-Wallis rank sum test
data: act.antimicrob. by typeATB
Kruskal-Wallis chi-squared = 24.287, df = 4, p-value = 6.996e-05
```

```

$groups
      act.antimicrob. groups
Gentamicine      43.05      a
PJ                28.50      b
PO                23.25     bc
La.nisine        19.75     bc
Pinicilline      12.95      c

```

c) Interaction souche-type ATB

```

      Kruskal-Wallis rank sum test

data:  act.antimicrob. by typeATB.souche
Kruskal-Wallis chi-squared = 35.978, df = 24, p-value = 0.05515

```

- Annexe XI

Analyse de la variance pour la combinaison pollen jaune-nisine

```

      Shapiro-Wilk normality test

data:  activ.
W = 0.89808, p-value = 0.007542

```

a) Souche :

```

      Kruskal-Wallis rank sum test

data:  activ. by souche
Kruskal-Wallis chi-squared = 5.451, df = 4, p-value = 0.2441

```

b) Mixture :

```

      Kruskal-Wallis rank sum test

data:  activ. by mixture
Kruskal-Wallis chi-squared = 1.2484, df = 2, p-value = 0.5357

```

**c) Interaction souche-mixture :**

```
Kruskal-Wallis rank sum test  
data:  activ. by souche.mixture  
Kruskal-Wallis chi-squared = 13.967, df = 14, p-value = 0.4522
```

- **Annexe XII**

Analyse de la variance pour la combinaison pollen orange-nisine

```
Shapiro-Wilk normality test  
data:  activ.  
W = 0.90188, p-value = 0.009342
```

**a) Souche :**

```
Kruskal-Wallis rank sum test  
data:  activ. by souche  
Kruskal-Wallis chi-squared = 1.925, df = 4, p-value = 0.7496
```

**b) Mixture :**

```
Kruskal-Wallis rank sum test  
data:  activ. by mixture  
Kruskal-Wallis chi-squared = 1.9802, df = 2, p-value = 0.3715
```

**c) Interaction souche-mixture :**

```
Kruskal-Wallis rank sum test  
data:  activ. by souche.mixture  
Kruskal-Wallis chi-squared = 8.4773, df = 14, p-value = 0.863
```

## Résumé

Cette étude vise la caractérisation physicochimiques et évaluation des propriétés antioxydants, anti-inflammatoire et de l'activité antimicrobienne du pollen en combinaison avec la nisine. Deux types de pollen (jaune et orange) récolté dans la région de Tizi-Ouzou, Algérie, ont été étudiés. Le pH des échantillons variait de 5,3 à 5,5, avec une teneur en eau de 7,7% pour le pollen jaune et 6,38% pour le pollen orange. La concentration des polyphénols est de 26,99 mg EAG/g pour le pollen jaune, contre 24,75 mg EAG/g pour l'orange, révélant une richesse en molécules bioactifs.

L'évaluation de l'activité antioxydante a montré une capacité de neutralisation des radicaux libres de 75,23% pour le pollen jaune et 71,82% pour le pollen orange.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré une inhibition significative avec une valeur de 65,4 % pour le pollen jaune et 62,7 % pour le pollen orange, à la concentration maximale testée.

Les extraits éthanoliques ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, avec des zones d'inhibition allant de 16 à 20 mm. L'ajout de la nisine a renforcé cette activité, atteignant 23 mm contre *Staphylococcus aureus*. Des tests de combinaison entre pollen et nisine, à différentes concentrations, ont révélé une synergie, avec la combinaison 50% pollen et 50% nisine montrant la meilleure efficacité antimicrobienne, notamment contre des bactéries résistantes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

En conclusion, les résultats de cette étude soulignent le potentiel bioactif du pollen algérien associé à la nisine comme solution naturelle prometteuse pour lutter contre la résistance bactérienne aux antibiotiques, avec des applications dans les domaines de l'industrie alimentaire et la santé.

**Mots clés :** Pollen, Activité antimicrobienne, Activité antiinflammatoire, Activité antioxydante, Polyphénols, Nisine.

## Abstract

This study aims to characterize the physicochemical properties and evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial activities of pollen in combination with nisin. Two types of pollen (yellow and orange) collected from the Tizi-Ouzou region, Algeria, were studied. The pH of the samples ranged from 5.3 to 5.5, with a moisture content of 7.7% for yellow pollen and 6.38% for orange pollen. The polyphenol concentration was 26.99 mg GAE/g for yellow pollen, compared to 24.75 mg GAE/g for orange pollen, indicating a richness in bioactive molecules.

The evaluation of antioxidant activity showed a free radical scavenging capacity of 75.23% for yellow pollen and 71.82% for orange pollen.

The anti-inflammatory activity evaluation showed significant inhibition, with a value of 65.4% for yellow pollen and 62.7% for orange pollen at the maximum tested concentration.

Ethanollic extracts exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with inhibition zones ranging from 16 to 20 mm. The addition of nisin enhanced this activity, reaching 23 mm against *Staphylococcus aureus*. Combination tests between pollen and nisin at different concentrations revealed synergy, with the 50% pollen and 50% nisin combination showing the best antimicrobial efficacy, particularly against resistant bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*.

In conclusion, the results of this study highlight the bioactive potential of Algerian pollen combined with nisin as a promising natural solution to combat bacterial resistance to antibiotics, with potential applications in the food and health industries.

**Keywords:** Pollen, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory activity, Antioxidant activity, Polyphenols, Nisin.