REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 35/D3C/23
N° de série : 04 / BIO/ 23

Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3ème cycle
Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Immunologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue par :

MOKHTARI Mohamed Badreddine

Intitulé :

Evaluation de la relation entre la composition biochimique et le pouvoir immuno-modulateur du pollen d'abeille collecté de diverses régions d'Algérie

Membres du jury

Présidente	
ZERIZER Sakina	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
Directrice de thèse	
EL OUAR Ibtissem	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
Examinateurs	
DAHAMNA Saliha	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
TEBIBEL Souraya	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
ZELLAGUI Amar	Pr. Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

Année universitaire

2022-2023

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 35/D3C/23
N° de série : 04 / BIO/ 23

Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3ème cycle
Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Immunologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue par :

MOKHTARI Mohamed Badreddine

Intitulé :

Evaluation de la relation entre la composition biochimique et le pouvoir immuno-modulateur du pollen d'abeille collecté de diverses régions d'Algérie

Membres du jury

Présidente	
ZERIZER Sakina	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
Directrice de thèse	
EL OUAR Ibtissem	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
Examinateurs	
DAHAMNA Saliha	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
TEBIBEL Souraya	Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1
ZELLAGUI Amar	Pr. Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi

Année universitaire

2022-2023

بسم الله الرحمن الرحيم

REMERCIEMENTS

*En préambule à cette thèse, louange à **Allah** le tout miséricordieux pour son guide, son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail, Merci DIEU.*

*Je tiens tout d'abord à remercier ma très chère encadrante, Mlle **EL OUAR** I., de m'avoir supervisé, conseillé et aidé. Je tiens à la remercier vivement pour toutes ses contributions dans l'achèvement de cette thèse « une collaboration un jour, une collaboration pour toujours ! »*

J'exprime ma profonde gratitude à Mme ZERIZER S. de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury d'examinateur de cette thèse.

J'exprime mes sincères remerciements également à Mme TEBIBEL S., Mme DAHAMNA S. et Mr ZELLAGUI A. de m'offrir l'honneur de faire partie du jury d'examinateur.

Mes cordiaux remerciements s'adressent à m'a famille, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenu moralement, physiquement et financièrement.

Mes cordiaux remerciements s'adressent aussi à tout un et chacun qui a contribué de prêt ou de loin à ce travail.

شكرا, جزاكم الله عني كل خير كل بإسمه, بقدره و مقامه

MOKHTARI Mohamed Badreddine

Dédicace

Je dédie ce travail à ma mère, mon père, mes sœurs, à khalti Fouzia, à ma Femme, à tous mes oncles et tantes pour leurs encouragements, leurs sacrifices et leurs aides.

Je dédie ce travail à mes grands-parents « Djadi Said » et « Djadi Hafid », Allah yerhamhom, qui m'ont toujours poussé et encouragé à étudier, vos mots et vos encouragements, vous resterez toujours dans mon cœur.

A khali Mohamed et khali El Hadj Allah yerhamhom

Je dédie ce travail à toute personne qui m'a enseigné et contribué à ma formation pendant toute ma carrière.

Je dédie ce travail aussi à tous mes amis et mes collègues que j'ai côtoyé tout au long de mon parcours.

Mokhtari Mohamed Badreddine

Table de matières

Table des matières

Liste des abréviations i
Liste des tableaux iii
Listes des figures iv
Introduction 1
Partie théorique 3
Chapitre 01 Allergies respiratoires 3
1. Notions de bases 3
1.1. Allergie 3
1.2. Allergène 3
1.3. Atopie 4
2. Immunité des voies respiratoires 4
2.1. Cas physiologique 4
2.2. Rupture de la barrière respiratoire 6
3. Mécanisme de la réaction allergique respiratoire 7
3.1. Sensibilisation 7
3.2. Réaction allergique 8
4. Facteurs prédisposant aux allergies respiratoires 11
4.1. Génétique 12
4.2. Epigénétique 12
4.3. Exposition aux allergènes 12
4.4. Pollution 13
4.5. Fumée du Tabac 13
4.6. Microbiome 13
5. Types d'allergies respiratoires 14
5.1. Rhinite allergique 14
5.2. Asthme 14
5.3. Pollinose 14
Chapitre 02 Allergie au pollen 15
1. Pollen 15
2. Allergénicité du pollen 16
2.1. Allergènes de pollen 18
2.2. Pathogènes de la pollinose 19
2.3. Facteurs environnementaux affectant l'allergénicité du pollen 20
3. Syndrome pollen-aliment 22

3.1. Allergènes déclenchant le PFAS 23
3.2. Réactivité croisée entre les allergènes de pollen et d'aliments 23
Matériels & Méthodes 25
1. Echantillons de pollen d'abeille 25
2. Analyse palynologique 26
3. Etude phytochimique des extraits de pollen d'abeille 27
3.1. Préparation d'extraits 27
3.2. Composants phénoliques 27
3.3. Profil phénolique du pollen d'abeille 28
4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits 30
4.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH 30
4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS 31
4.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test CUPRAC 32
4.4. Evaluation de l'activité antioxydante par le test du β-carotène 33
4.5. Evaluation de l'activité antioxydante par le test FRAP 34
4.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test GOR 34
4.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à la 1,10-Phénanthroline 35
4.8. Evaluation de l'activité antioxydante par le test SNP 35
5. Analyse des protéines du pollen d'abeille 36
5.1. Extraction des protéines polliniques 36
5.2. Dosage des protéines totales 37
5.3. Electrophorèse des protéines par SDS-Page 37
6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* 38
7. Evaluation de l'activité anti-allergique *in vivo* 40
8. Analyses statistiques 45
Résultats 46
1. Analyse palynologique 46
2. Etude phytochimique des extraits de pollen d'abeille 51
2.1. Composants phénoliques 51
2.2. Profil phénolique du pollen d'abeille 53
2.3. Analyse de la relation entre l'origine botanique et la teneur en polyphénols 56
3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits 57
3.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH 57
3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS 58
3.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test CUPRAC 59

3.4. Evaluation de l'activité antioxydante par le test du β-carotène 60
3.5. Evaluation de l'activité antioxydante par le test FRAP 61
3.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test GOR 62
3.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à la 1,10-Phénanthroline 63
3.8. Evaluation de l'activité antioxydante par le test SNP 64
3.9. Analyse du pouvoir antioxydant des extraits 65
4. Analyse des protéines du pollen d'abeille 67
4.1. Dosage des protéines totales 67
4.2. Profils Electrophorétiques des protéines 68
5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* 70
7. Evaluation de l'activité anti-allergique *in vivo* 74
7.1. Effet de l'extrait sur la réponse allergique des rats 74
7.2. Effet de l'extrait sur le profil des protéines sériques chez les rats allergiques 75
7.3. Etude histologique 82
Discussion 84
Conclusion et perspectives 102
Annexe 101
Références 124
Publication 148
الملخص .....
Abstract .....
Résumé .....

Liste des abréviations

Liste des abréviations

$A_{0.5}$	Absorption Médiane
ABTS	*2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonic acid)*
ACP	Analyse en Composantes Principales
BALT	*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue* ; Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches
BHA	ButylHydroxyAnisole
BHT	ButylHydroxyToluène
CI_{50}	Concentration Inhibitrice Médiane
CLRs	*C-type Lectin Receptors*
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CP	Composante principale
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigène
CUPRAC	*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*
DAD	*Diode Array Detector*
DAG	Diacylglycérol
DC-SIGN	*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin*
DPPH	1,1-Di-Phényl-2-Picryl Hydrazyl
FcεRI	Récepteur IgE à forte affinité
FRAP	*Ferric Reducing Antioxidant Power*
GCP	Granules Cytoplasmiques de Pollen
GOR	Galvinoxyle
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ILC2	*Group 2 Innate Lymphoid Cells*
LC-MS	*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*
MALT	*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

mg EAG/ g	Milligrammes Equivalent d'Acide Gallique pour un gramme d'extrait de pollen
mg EQ/ g	Milligrammes Equivalent de Quercétine pour un gramme d'extrait de pollen
NALT	*Nose-Associated Lymphoid Tissue*
Ole e 1	Allergène du pollen de l'olivier
OVA	Ovalbumine
PAR	*Protease-Activated Receptor-2*
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PFAS	*Pollen-Food Allergy Syndrome*
Phl p 1/5	Allergènes de *Phleum pratense*
PM	*Particulate Matter* ($PM_{2.5}$ et PM_{10})
RCP	Régression sur Composantes Principales
ROS	*Reactive Oxygen Species*
RPM	*Round Per Minute*
SDS	*Sodium Dodecyl Sulfate*
SNP	*Silver NanoParticule*
TCR	*T Cell Receptor*
TFlT	Teneurs en Flavonols Totaux
TFT	Teneurs en Flavonoïdes Totaux
TGF-β	*Transforming Growth Factor* β
TLR	*Toll Like Receptor* (TLR 1- 10)
TNF	*Tumor Necrosis Factor*
TPT	Teneurs en Polyphénols Totaux

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des allergènes polliniques en familles de protéines..... 19
Tableau 2. Tableau récapitulatif des réactivités croisées entre les allergènes polliniques et les allergènes alimentaires. 24
Tableau 3. Les fréquences d'occurrence des différents types de pollen enregistrées dans les 8 échantillons de pollen d'abeille collectés du Nord Algérien. 47
Tableau 4 . Teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille. 51
Tableau 5. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille. 52
Tableau 6. Teneurs en flavonols totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille. 52
Tableau 7. Profile phénolique des extraits de pollen d'abeille. 54
Tableau 8. Diagramme Présence / Absence (1/0) et fréquences des bandes protéiques des échantillons du pollen d'abeille. 69
Tableau 9. Taux de polymorphisme protéique entre les échantillons de pollen d'abeille. 70
Tableau 10. Synthèse bibliographique des travaux rapportant les teneurs des extraits de pollen en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux. 87
Tableau 11. Synthèse bibliographique des travaux rapportant les activités antioxydants des extraits de pollen. 93

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1. Anatomie et types de cellules associés à l'épithélium pseudostratifié des voies respiratoires 6
Figure 2. Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'allergie respiratoire..... 10
Figure 3. Voie de signalisation intercellulaire activée suite à la réticulation des IgE liées au FcεRI 11
Figure 4. Structure d'un grain de pollen 16
Figure 5. Les facteurs environnementaux affectant l'allergénicité du pollen 22
Figure 6. Géopositionnement des ruchers dans la zone d'étude. 25
Figure 7. Piégeage du radical DPPH° par un antioxydant. 30
Figure 8 . Génération et piégeage du radical ABTS•+ par un Antioxydant. 31
Figure 9. Réduction du complexe Cu (II)-Néocuproïne par un antioxydant donneur d'électron..... 32
Figure 10. Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*. 39
Figure 11. Protocole expérimental de l'activité anti-allergique in vivo. 41
Figure 12. Profil d'électrophorèse des protéines sériques obtenu par électrophorèse capillaire 43
Figure 13. Projection des variables (Types de pollen et composants phénoliques) sur les composantes principales (CP1 et CP2). 57
Figure 14. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test DPPH. 58
Figure 15. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test à l'ABTS..... 59
Figure 16. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test CUPRAC. 60
Figure 17. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test de blanchissement du β-carotène. 61
Figure 18. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test FRAP. 62
Figure 19. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test GOR. 63
Figure 20. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test à la 1,10-Phénanthroline. 64

Figure 21. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test SNP. 65
Figure 22. Biplot de la régression sur composantes principales (RCP) réalisée sur les deux composantes principales de l'ACP des tests antioxydants. 66
Figure 23. Taux des protéines totales dans les différentes solutions protéiques du pollen d'abeille. 67
Figure 24. Gel SDS-Page (12 %) des 8 échantillons de pollen d'abeille. 68
Figure 25. L'activité anti-inflammatoire des extraits de pollen d'abeille exprimée en pourcentage d'augmentation de l'œdème. 72
Figure 26. Projection des résultats de l'activité anti-inflammatoire, l'analyse palynologique et des dosages des composants phénoliques sur les deux premières composantes principales. .. 73
Figure 27. Fréquences des différents symptômes chez les rats allergiques traités avec l'extrait de pollen d'abeille (exprimées en pourcentages comparativement aux fréquences des rats allergiques). 74
Figure 28. Effet des différents traitements sur le taux des protéines sériques totales. 75
Figure 29. Effet des différents traitements sur le taux d'Albumine sérique. 76
Figure 30. Effet des différents traitements sur le Taux des protéines Alpha 1. 77
Figure 31. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Alpha 2. 78
Figure 32. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Bêta 1. 79
Figure 33. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Beta 2. 80
Figure 34. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Gamma. 81
Figure 35. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine des rats contrôles. 82
Figure 36. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine des rats traités avec l'extrait de pollen. 82
Figure 37. Coupe histologique du tissu pulmonaire, colorée par l'hématoxyline- éosine des rats allergiques. 83
Figure 38. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine chez les rats allergiques traités avec l'extrait éthanolique de pollen 83
Figure 39. Structure chimique, mécanisme d'action, voie d'administration et métabolisme du diclofénac 96
Figure 40. Illustration des mécanismes d'action du pollen et de ces composés flavonoïdes sur la réponse immunitaire. 101

Introduction

Introduction

Les allergies respiratoires représentent la plus grande partie des maladies pulmonaires chroniques. L'incidence croissante des allergies respiratoires est largement reconnue à travers le monde. Environ un tiers de la population mondiale est affectée par ces allergies respiratoires. Plus de 400 millions de personnes souffrant de rhinite allergique et de 330 millions d'asthme. L'augmentation drastique de la prévalence de ces maladies respiratoires allergiques est expliquée par les changements environnementaux, l'industrialisation et la forte exposition aux allergènes (Almatroudi et al., 2021).

Les coûts des soins de santé liés aux allergies respiratoires pèsent de plus en plus lourd sur les économies de toutes les nations. En 2019, parmi les 28 États membres de l'Union Européenne, des coûts d'environ 380 milliards d'euros par an étaient imputables aux seuls soins des patients atteints d'allergies respiratoires (Soriano et al., 2020).

Actuellement, suite à l'augmentation de la pollution atmosphérique et aux changements climatiques, l'Algérie est en plein transition épidémiologique qui se caractérise par une hausse conséquente de la prévalence des allergies respiratoires. En 2020, plus 4 millions d'Algeriens sont affectés d'allergie respiratoires dont environ 3 millions souffrent de rhinite allergique et plus de 1 million d'asthmes (Bounil et al., 2022; Necib et al., 2021).

Depuis l'antiquité, les produits de la ruche tels que le miel, la propolis, le pollen, la gelée royale, la cire et le venin d'abeille sont parmi les denrées naturels les plus couramment utilisés dans la médecine traditionnelle en raison de leurs puissantes propriétés curatives et de leur forte teneur en molécules bioactives (Giampieri et al., 2022). Cette branche de la médecine traditionnelle, avec ses fondements scientifiques, est communément appelée apithérapie. Elle est utilisée pour prévenir ou guérir des maladies comme les maladies rhumatismales, les troubles du tube digestif et les affections immunitaires et neurologiques (Martinello et al., 2021).

Le pollen d'abeille est une mixture complexe de pollen floral, gamétophyte mâle des plantes à grain, et de nectar avec des substances salivaires d'abeille. Ce produit est collecté grâce à des trappes à pollen sous forme de grain. Il est soit mono/ou hétérofloral, prédominé par un seul type de pollen ou ayant plusieurs origines florales (Thakur et al., 2020).

Le pollen d'abeille est très connu par sa haute valeur nutritionnelle et sa richesse en molécules bioactives. Il est considéré comme une source potentielle de nutriments vitaux, dotés de propriétés immunomodulatrice, anti-inflammatoire, antinociceptive, anti-allergique,

antibactérienne, antiviral et antifongique. En outre, il est très riche en métabolites secondaires à un fort potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-allergique comme les composés phénoliques (Khalifa et al., 2021; Tutun et al., 2021).

A cet égard, l'objectif de ce présent travail est d'évaluer la relation entre la constitution biologique et chimique du pollen d'abeille et ses pouvoirs antioxydant, anti-inflammatoire et anti-allergique.

Huit échantillons de pollen d'abeille collectés de diverses régions du North-Est de l'Algérie sont analysés par un examen palynologique afin d'identifier les origines botaniques. Il a été rapporté que la composition variée du pollen est affectée par les origines florales, les conditions édaphoclimatiques, le processus de séchage et de conservation. En effet, un échantillon de pollen d'abeille reflète parfaitement la biodiversité florale du voisinage du rucher (Aylanc et al., 2021).

Des extraits éthanoliques sont préparés à partir des huit échantillons de pollen, les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux sont quantifiées ainsi que le profil phénolique qualitatif et quantitatif.

Les protéines totales des huit échantillons sont mesurées spectroscopiquement et les profils électrophorétiques, obtenus par SDS-Page, sont ainsi comparés.

Le pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire des extraits éthanoliques du pollen d'abeille sont déterminés *in vitro* et *in vivo* par diverses méthodes.

L'extrait ayant montré la meilleure activité anti-inflammatoire est utilisé afin d'estimer le pouvoir anti-allergique *in vivo* sur un modèle animal d'allergie respiratoire au pollen. Le pouvoir anti-allergique est apprécié par un contrôle des symptômes allergiques, une analyse des protéines sériques totaux et une étude histologiques des poumons.

Partie théorique

Chapitre 01
Allergies respiratoires

Le concept « allergie respiratoire » décrit généralement un groupe de symptômes apparaissant après l'inhalation d'allergènes. Les allergies respiratoires se présentent sous différentes formes et symptômes et peuvent être divisées selon leur emplacement dans les voies respiratoires supérieures et/ou inférieures, néanmoins un contact répétitif avec des allergènes peut également être démontré par des symptômes oculaires ou auditifs (Dierick et al., 2020). Elles peuvent être déclenchées par un allergène tels que le pollen, les acariens, les squames animales, les moisissures et les protéines alimentaires inhalées (Eguiluz-Gracia et al., 2020; Jeebhay et al., 2019). Les troubles respiratoires les plus courants, largement liés à l'hypersensibilité de type I, sont la rhinite et l'asthme qui décrivent des symptômes cliniques généraux (Jakubczyk et al., 2021).

1. Notions de bases

1.1. Allergie

L'allergie, un concept introduit pour la première fois par Clemens Vos Piquet en 1906, désigne une affection chronique impliquant une réaction immunitaire inappropriée hypersensible à une substance normalement inoffensive ne provoquant pas de réponse immunitaire chez la plupart des gens (Vedanthan et al., 2021). Actuellement, les termes l'hypersensibilité et l'allergie sont utilisées de manière interchangeable. Une réaction allergique provoque différents symptômes nocifs tels que :

- des démangeaisons dans le nez, le palais de la bouche, la gorge, les yeux ;
- des éternuements ;
- une congestion (nez bouché) ;
- un nez qui coule ;
- des yeux larmoyants ;
- des cernes sous les yeux ;
- une inflammation ;
- une anaphylaxie.

1.2. Allergène

Le terme allergène désigne toute protéine capable de stimuler la production d'immunoglobulines E (IgE) spécifiques chez un individu génétiquement prédisposé « atopique ». Chez ces personnes, la capacité à produire des IgE spécifiques à l'allergène reflète d'une part le génotype de l'individu et d'autre part la concentration, la solubilité, la complexité

et les propriétés biochimiques de l'allergène. La plupart des allergènes pénètrent dans l'organisme par les voies respiratoires, mais ils peuvent également être introduites dans l'organisme par le tractus gastro-intestinal, être absorbés par voie percutanée ou être injectés naturellement ou par voie iatrogène. La voie d'exposition (par inhalation, ingestion ou contacte cutané) influence les types de symptômes allergiques ressentis, les aéroallergènes provoquent des symptômes respiratoires, tandis que les allergènes ingérés, injectés ou absorbés provoquent des symptômes gastro-intestinaux ou dermiques localisés et/ou des symptômes systémiques potentiellement mortels comme l'anaphylaxie (Burks et al., 2020).

1.3. Atopie

L'atopie est définie par la prédisposition génétiquement médiée à produire des IgE spécifiques après exposition à des allergènes. Sur le plan clinique, elle est définie comme ayant des preuves de sensibilisation allergique à au moins un allergène. L'atopie est fondamentale dans la pathogenèse des troubles allergiques, qui se manifestent par toute combinaison de conjonctivite, intolérance, asthme, rhinite et dermatite atopique. Cependant, ces présentations cliniques peuvent également apparaître en l'absence d'atopie, suggérant qu'il existe probablement des facteurs, y compris des facteurs génétiques, qui déterminent la susceptibilité aux maladies allergiques qui sont indépendants de l'atopie (Choi et al., 2022).

2. Immunité des voies respiratoires

2.1. Cas physiologique

Les voies respiratoires représentent un puissant outil de contact avec l'environnement et de défense du soi contre les organismes et les substances nocives. Il est admis que la surface générale du poumon est d'environ 100 m^2 et la superficie alvéolaire seule est 50 fois plus grande que celle de la barrière cutanée. La quantité d'air inhalé s'élève à 600 L par jour. Quotidiennement, en une seule respiration, des millions de différentes particules sont inhalées et distribuées dans les voies respiratoires. Certaines d'entre eux sont expulsées et certaines sont déposés sur les parois des voies respiratoires (Fröhlich et al., 2016; Yuksel et al., 2017).

D'un point de vue anatomique, les voies respiratoires sont constituées des voies respiratoires supérieures et inférieures. La partie supérieure comprend le nez, les sinus, le pharynx et le larynx. La partie inférieure comprend la trachée, les bronches, les bronchioles et les alvéoles (Burks et al., 2020).

Dans les voies respiratoires, les tissus lymphatiques sont bien développés. Le NALT humain (*NALT : Nose-Associated Lymphoid Tissue*) fait partie des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (*MALT : Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*) et consiste en des structures disséminées de tissu lymphoïde. Il renferme des cellules lymphocytaires T avec ses différentes sous-populations, des lymphocytes B, des cellules dendritiques et des macrophages. Il est exclusivement présent chez la population enfantine, non décrit chez les adultes, à différents endroits de la cavité nasale (la conque nasale inférieure, moyenne et supérieure), les sinus, le palais et autres (Pabst, 2015). Le BALT (*BALT : Bronchus-associated lymphoid tissue* ; tissu lymphoïde associé aux bronches) fait également partie du MALT et est présent dans la muqueuse bronchique. La présence du BALT est constatée chez les enfants et les jeunes adultes. Généralement, l'occurrence du BALT et du NALT varie d'un individu à un autre. Ils jouent un rôle primordial à la fois dans la réponse immunitaire et l'induction de la tolérance (capture de l'antigène, présentation et activation des cellules T et B), en particulier pendant l'enfance. Leur fonction princiqpale est de fournir une réponse immunologique spécifique conduisant à la production d'immunoglobulines, spécialement la production d'IgA (Kato et al., 2013).

Les cellules épithéliales sont dotées de récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*), tels que les récepteurs TLR 1-10 (*Toll Like Receptor*), le RLR (*Retinoic acid-Inducible Gene I (RIG-I)-Like Receptor*) et les PAR (*Protease-Activated Receptor*), qui permettent la détection des antigènes microbiens, viraux ou allergiques .

La réponse immunitaire naturelle non-spécifique est basée d'une part sur la capacité sécrétoire des cellules épithéliales et d'autre part leur capacité phagocytaire. L'épithélium contient trois principaux types de cellules : ciliées, sécrétoires et basales (Tata et al., 2017). Les cellules ciliées sont responsables de l'élimination mécanique des antigènes étrangers. Les cellules sécrétoires produisent du mucus, des facteurs antimicrobiens neutralisant des toxines. Les cellules basales ont une fonction progénitrice (Hiemstra et al., 2015). Les cellules épithéliales fournissent une barrière physique en raison des connexions étroites entre elles. Tout près des cellules basales et de la membrane basale se trouvent des cellules immunitaires tels que les granulocytes, les lymphocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes (Figure 1) (Kawa, 2015; Smith et al., 2019).

A l'état physiologique, les allergènes sont neutres et n'activent plus aucune cascade. Néanmoins, dans un organisme prédisposé ou lors d'une exposition chronique à l'allergène, la rupture de la barrière respiratoire a lieu. Cela conduit à l'activation et à la maturation des cellules immunitaire et ainsi à une réaction d'hypersensibilité allergique (Burks et al., 2020).

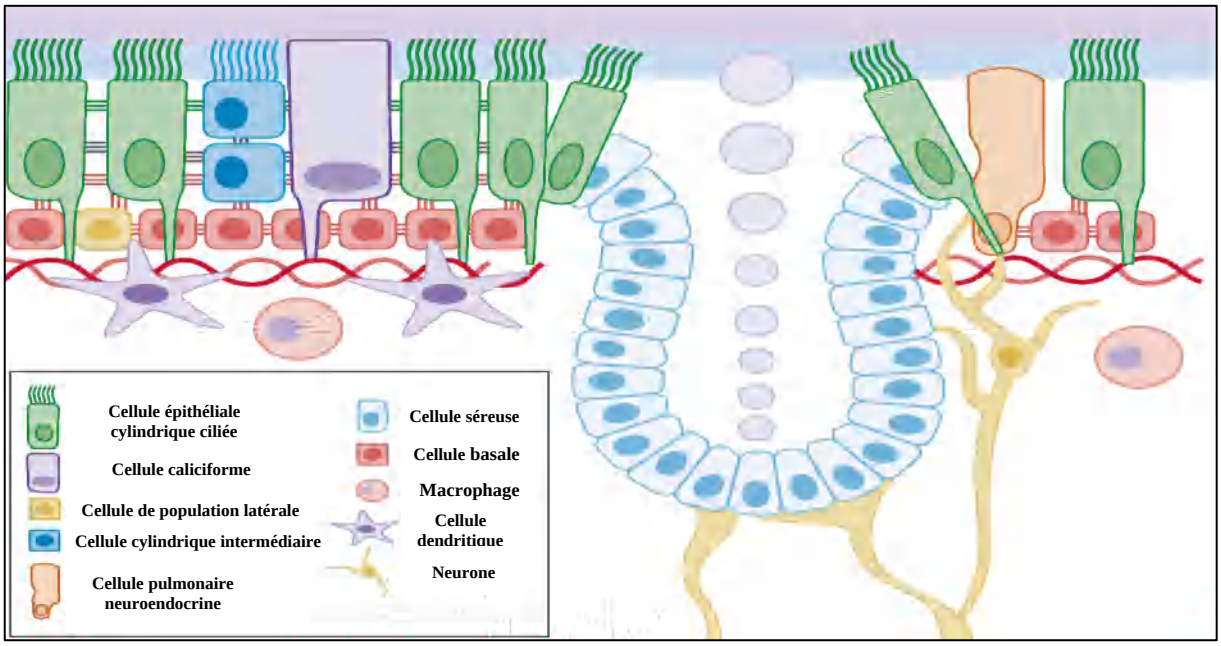


Figure 1. Anatomie et types de cellules associés à l'épithélium pseudostratifié des voies respiratoires (Burks et al., 2019).

2.2. Rupture de la barrière respiratoire

La rupture de la barrière des voies respiratoires entraîne une hypersensibilité. Le descellement de la bordure a un caractère à la fois physique, mécanique et fonctionnel. La rupture fonctionnelle se résume à la perte, la diminution ou la surproduction du mucus et des facteurs antimicrobiens. La rupture physique et mécanique repose sur la perte des liaisons étroites entre les cellules épithéliales, ce qui permet le contact direct entre les allergènes et les cellules immunitaire pro-inflammatoire induisant la production de cytokines qui favorise ainsi le développement d'une réaction allergique (Jakubczyk et al., 2021). Certains aéroallergènes peuvent modifier directement la consistance de la barrière épithéliale et agir de manière dépendante des protéases ce qui augmente directement la perméabilité de la barrière épithéliale en diminuant le nombre de jonctions serrées (Henriquez et al., 2013; Matsumura, 2012). A titre d'exemple, le pollen d'abeille diminue la présence d'occludine et de claudine (jonctions serrées localisées dans la parties apicale) (Georas et al., 2014). Au contraire, certains allergènes dépourvus d'activités enzymatiques agissent de manière indépendante des protéases. Ce groupe d'allergènes possède une certaine structure qui active directement les récepteurs cellulaires, par exemple les excréments de cafards peuvent affecter directement les neutrophiles par une

activation du TLR-2, et le Der p 7 (allergène principal de l'acarien domestique *Dermatophagoides pteronyssinus*) contient une protéine bactéricide augmentant la perméabilité qui stimule directement le système immunitaire. De plus, les infections virales respiratoires, la fumée de cigarette, la pollution de l'air et les toxines inhalées à chaque minute peuvent également perturber et affecter directement cette barrière. Outre les facteurs externes cités ci-dessus, l'environnement interne de l'organisme, tel que l'aspect génétique, la présence de certaines maladies/états inflammatoires, peut également diminuer la fonction de la barrière respiratoire (Vedanthan et al., 2021).

3. Mécanisme de la réaction allergique respiratoire

3.1. Sensibilisation

Le premier contact avec l'allergène chez une personne allergique entraîne la production d'IgE. L'allergène pénètre dans les voies respiratoires soit en lésant l'épithélium ou à travers la barrière précédemment endommagée (Marshall et al., 2018). La détection de l'allergène réside dans la reconnaissance du récepteur par des composants immunitaires et non-immunitaires. Les cellules épithéliales sont équipées de récepteurs tels que les PRR et PAR dont l'activation entraîne la libération de cytokines et ainsi une activation supplémentaire des cellules immunitaires. Simultanément, l'allergène est traqué par les CPA (les cellules présentatrice d'antigène), qui le captent et le traitent. Les cellules dendritiques veillent perpétuellement sur la détection des stimuli externes et internes. Ces cellules sont équipées d'une large gamme de récepteurs qui permettent la détection des allergènes, à savoir : les CLRs (*C-type Lectin Receptors*), principalement le DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin*)], TLRs et le FcεRI. Les cellules dendritiques apprêtent les allergènes détectés (Salazar et al., 2013). Ainsi, l'allergène est absorbé ou phagocyté, puis dégradé en peptides (fragments d'allergènes) par la cellule dendritique avant d'être présenté sur le CMH II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité classe II) à la surface cellulaire (Humeniuk et al., 2017). La présentation de l'antigène a généralement lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, principalement les ganglions lymphatiques. L'interaction entre les CPA et les lymphocytes T est médiée par la réaction entre le CMH II avec un allergène apprêté et le TCR (*T Cell Receptor*) en présence de molécules co-stimulatrices spécifiques (CD80 et CD86).

Dans les conditions saines, les lymphocytes T activées basculent vers la sous-population Th1 responsable sur la production des IgG par les lymphocytes B (Galli et al., 2008, 2012). Bien

que, chez les organismes atopiques, les lymphocytes T basculent vers la sous-population Th2, qui a un fort rôle pro-inflammatoire.

Il existe également une autre voie d'activation des Th2 médiée par les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2, *group 2 Innate Lymphoid Cells*). Les ILC2 répondent aux cytokines libérées par les cellules épithéliales endommagées (principalement l'IL-25 et l'IL-33), ce qui conduit à une production supplémentaire de cytokines : IL-4 (impact sur le Th2, production d'IgE par les cellules B), IL-5 (recrutement et activation des éosinophiles, activation des cellules B), IL-9 (maturation des basophiles, production de mucus), IL-13 (activation des cellules B, soutien des cellules dendritiques dans la migration vers les ganglions lymphoïdes, remodelage et contraction des voies respiratoires). De plus, les ILC2 peuvent introduire l'antigène apprêté directement dans les cellules T, via les molécules du CMH II (Cheng et al., 2018; Helfrich et al., 2019; Martinez-Gonzalez et al., 2015).

Les cellules Th2 activées stimulent les lymphocytes B à produire des IgE (après commutation de classe). Les anticorps IgE se fixent sur les mastocytes et les basophiles via le récepteur à forte affinité au IgE, le FcεRI. Ce récepteur est également exprimé à la surface des cellules dendritiques, des macrophages, des cellules de Langerhans, des éosinophiles et des monocytes (Shin et al., 2015). Structurellement, les récepteurs FcεRI sont constitués de chaînes α, β et γγ. La chaîne α est responsable de l'ancrage de l'IgE. Les chaînes restantes participent à la stabilisation de l'ensemble de la structure, ainsi qu'à la transmission du signal. Le récepteur FcεRII pour les IgE, et notamment sous sa forme dissoute, n'interagit pas directement avec les IgE mais semble avoir plus une fonction régulatrice. La plupart des IgE spécifiques produites sont liées aux mastocytes et restent stockées jusqu'au prochain contact avec le même allergène. Le pool mineur d'IgE spécifiques non liées circule librement dans le sang périphérique (Galli et al., 2012). Cette préparation, appelée sensibilisation, est primordiale dans le développement ultérieur de la réaction allergique.

3.2. Réaction allergique

Les allergies respiratoires sont le plus souvent des réactions d'hypersensibilités de type I médiées par les IgE et qui surviennent après un second contact avec un allergène (Figure 2). Lors du second contact avec l'allergène, les mastocytes reconnaissent l'allergène via les IgE spécifiques préfixées à leur surface. Il s'agit de la première phase du développement de l'hypersensibilité/réaction allergique. Les mastocytes, avec les IgE préalablement ancrées, relient les particules allergènes. L'allergène doit être relié par au moins deux IgE sur le

mastocyte. Pendant la phase de repos/anticipation, les récepteurs FcεRI sont uniformément répartis sur la surface des mastocytes. La liaison avec l'allergène permet à la formation de clusters, qui conduisent à l'activation cellulaire et à sa dégranulation (Kawakami et al., 2016). Ce processus commence par la réaction des chaînes gamma et bêta du FcεRI avec une protéine kinase, par exemple, Syk (*spleen tyrosine kinase*), Btk (Bruton's tyrosine kinase), LYN et Fer (protéines tyrosine kinase), qui provoque l'activation de deux voies de signalisation : MAP kinase (*Mitogen activated protein*) et la phospholipase C (Figure 3). La phospholipase C transforme le PIP2 (*Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate*) en IP3 (*Inositol-1,4,5-triphosphate*) et DAG (*Diacylglycerol*). L'IP3 est responsable de l'ouverture du canal calcique. Le DAG active la protéine kinase C (PKC), qui influence davantage la phosphorylation des protéines. La PKC et le calcium influencent la structure du cytosquelette. Les vésicules granulaires se rapprochent de la membrane cellulaire et se préparent à l'exocytose. L'activation de la MAP kinase conduit à des processus de phosphorylation des protéines, qui déclenchent la synthèse de leucotriènes et de prostaglandines (Moeller et al., 2019; Steelman et al., 2015).

Les mastocytes et les basophiles produisent de nombreux facteurs affectant les processus pro-inflammatoires et allergiques. Ces médiateurs peuvent être divisés en trois groupes : (1) ceux stockés dans les granules (préformés), (2) les médiateurs produits *de novo* et (3) les cytokines. L'histamine est située parmi les médiateurs stockés dans les granules et peut être libérée des cellules par un stimulus immunologique (IgE) ou de manière non immunologique. L'histamine, réagissant par l'intermédiaire des récepteurs H1 ou H2 sur les cellules effectrices, est responsable de réactions pro-inflammatoires locales, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'un spasme des muscles lisses. L'histamine, puissant chimio-attractant, favorise la sécrétion de prostaglandines. Lors d'une dégranulation très intense des mastocytes, l'histamine peut pénétrer dans le sang et présenter des symptômes systémiques (anaphylaxie) (Borriello et al., 2017; Thangam et al., 2018). En plus de l'histamine, les protéoglycanes, sérine protéases, TNF-α, facteurs chimiotactiques sont stockés dans les granules.

Parmi les médiateurs produits *de novo* figurent les métabolites de l'acide arachidonique : les prostaglandines, les leucotriènes et le facteur d'activation plaquettaire (PAF). Les mastocytes secrètent toute une panoplie de cytokines : l'IL-4, l'IL-1, l'IL-3, l'IL-10, l'IL-13, le TNF-α et le TNF-β (Moon et al., 2014). Ils peuvent être activés, non seulement par l'allergène et les IgE, mais aussi par les protéines du complément (C3a, C4a et C5a), les cytokines (IL-4, IL-5 et IL-8), les activateurs du TLR, l'acétylcholine, la méthacholine, le changement de température, le stress et le rayonnement UV (Wang et al., 2016). Sur le plan clinique, cette activation non

spécifique des mastocytes peut provoquer des symptômes similaires à ceux de l'allergie de type I mais sans l'implication des IgE, ce qui peut conduire à un diagnostic incorrect (Cardet et al., 2013; González-de-Olano et al., 2016). Les manifestations cliniques dépendent du lieu où la dégranulation cellulaire s'est produite et peuvent avoir un caractère spécifique à un organe ou systémique.

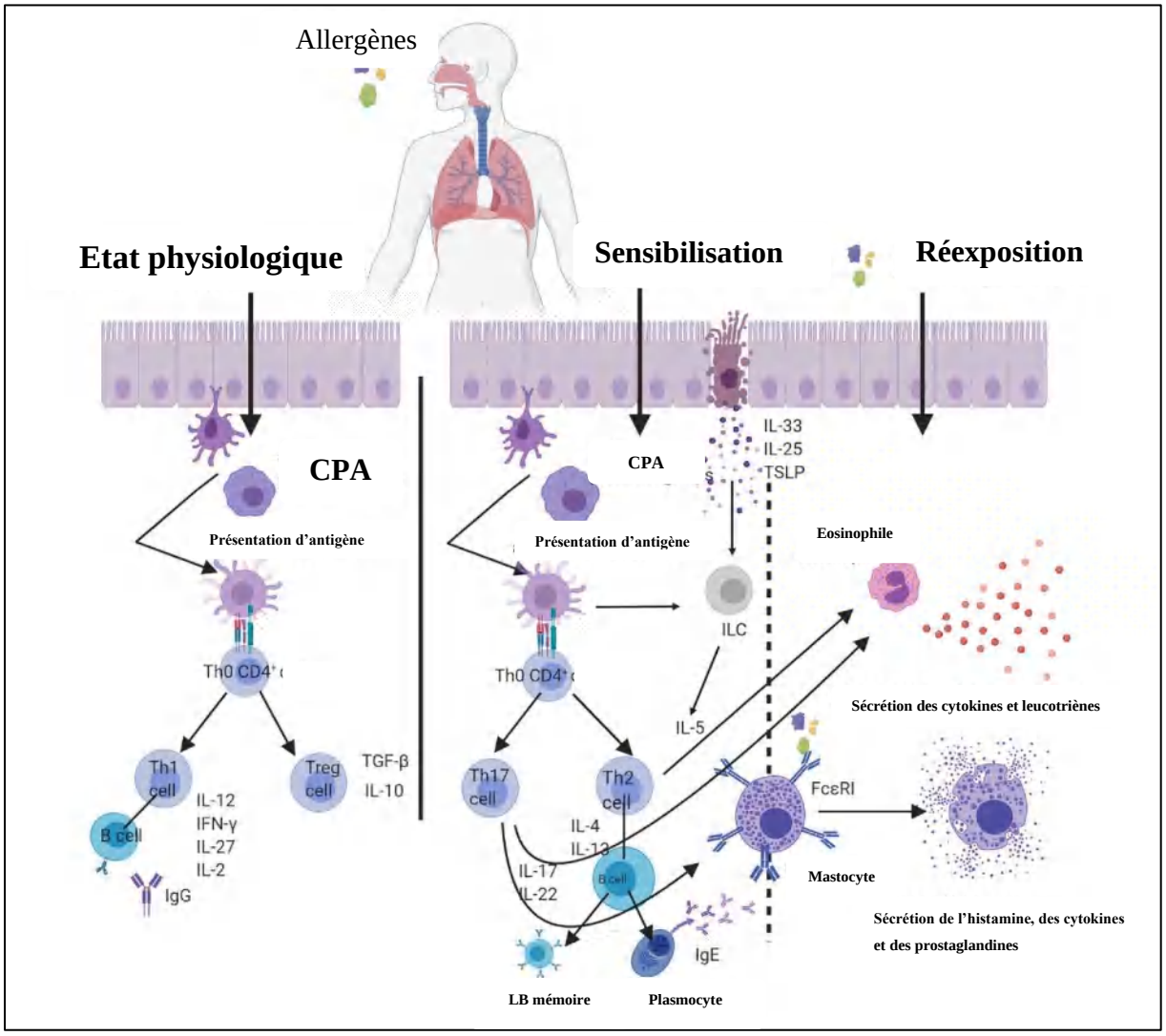


Figure 2. Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'allergie respiratoire (Jakubczyk and Górska, 2021).

L'intensité et la nature de la réaction allergique dépendent de nombreux facteurs, dont le nombre d'IgE et de mastocytes, le type d'allergène, la voie d'activation et le niveau de sensibilisation. Les médiateurs pro-inflammatoires (par exemple, l'histamine) libérés par le mastocyte dans les voies respiratoires ont une importance chimiotactique, bronchoconstrictrice, vasodilatatrice et augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins, ce qui est une cause d'infiltration

inflammatoire, d'œdème, de larmoiement, de difficulté respiratoire et d'augmentation de mucus (Massoud et al., 2019).

L'innervation de la fibre neuronale déclenche les bronchospasmes, la dyspnée, les démangeaisons et les rougeurs. La phase précoce commence juste après quelques secondes/minutes après le contact avec un allergène et dure 1 à 2 h. Pour la phase tardive de la réaction, la caractéristique est un apport de basophiles, d'éosinophiles, de lymphocytes T et de médiateurs pro-inflammatoires produits *de novo*. La phase tardive est moins intense que la phase précoce mais dure plus longtemps (Vedanthan et al., 2021).

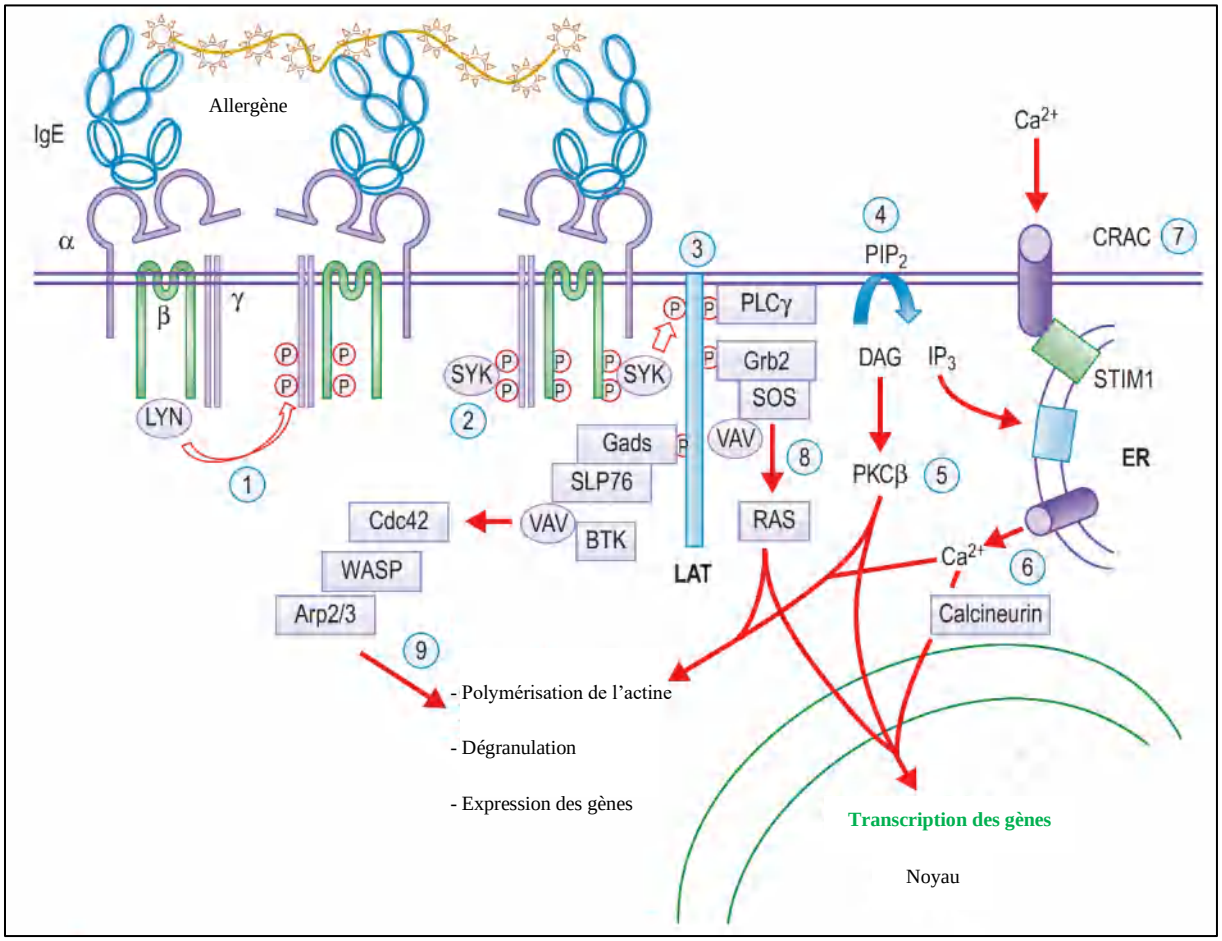


Figure 3. Voie de signalisation intercellulaire activée suite à la réticulation des IgE liées au FcεRI (Burks et al., 2020).

4. Facteurs prédisposant aux allergies respiratoires

Étant donné que l'allergie a généralement une matrice à multiples facettes, de nombreux facteurs peuvent augmenter la probabilité de son développement. Les facteurs prédisposant les plus connus sont :

4.1. Génétique

Il a été bien établi que les allergies respiratoires sont fortement affectées par l'hérédité et qu'avoir un membre de famille de premier degré allergique (ayant une rhinite allergique ou asthmatique) est un des plus grands facteurs de risques. L'héritabilité d'une allergie respiratoire est estimée à environ 70 % pour la rhinite allergique. Cependant, aucun gène unique ni un polymorphisme donné ne sont constatés comme gène ou polymorphisme directement impliqué dans le développement, la persistance ou la sévérité d'une allergie respiratoire. Mais, plusieurs gènes et différent variants, chacun à faible effet, sont responsables de cet effet héréditaire. Plusieurs études d'association pangénomique (GWAS, *Genome-Wide Association Study*) ont identifié de manière reproductible un certain nombre de loci candidats associés aux allergies respiratoires, y compris DENND1B, CHI3L1, IL1RL1/IL18R1, PDE4D, TSLP, RAD50, IL33, SMAD3 et ORMDL3/GSDM A/B, DPP10 et CDHR3 (Khan, 2014; Mims, 2015; Padem et al., 2019; Vedanthan et al., 2021).

4.2. Epigénétique

L'épigénétique est définie comme toute modification dans un phénotype ou une expression d'un gène qui aura lieu (par des mécanismes de méthylation ou d'acétylation) sans affecter la séquence d'ADN. Elle est désormais proposée comme le lien entre les facteurs génétiques et les facteurs environnementaux. Plusieurs études ont constaté que la méthylation d'ADN est fortement liée de manière causale au développement d'une rhinite allergique et/ou d'asthme. Par exemple la différentiation du Th1 est associée à une déméthylation du gène qui code l'IFNγ. Bien que la différentiation du Th2 est liée à une déméthylation de la région promotrice de l'IL-4 (Burks et al., 2020; Chang et al., 2020).

4.3. Exposition aux allergènes

Une forte exposition aux allergènes *in utero* et surtout durant la petite enfance est considérée comme un important facteur de risque de développer une allergie respiratoire (Eguiluz-Gracia et al., 2020). Les allergènes les plus liés au développement d'allergie respiratoire sont:

- l'exposition par inhalation :
    - le pollen ;
    - les acariens ;
    - les allergènes fongiques ;
    - les squames d'animaux (Berko et al., 2020).

- les allergènes alimentaires (Jeebhay et al., 2019).

4.4. Pollution

Un des facteurs de risques recevant de plus en plus d'attention. La pollution de l'air ambiant contient plusieurs composés ; cependant la plupart des études se sont principalement concentrées sur :

- les matières particulaires PM (*Particulate Matter*) :
  - PM_{10} : < 10 µm ;
  - $PM_{2.5}$: < 2.5 µm.
- le dioxyde de Nitrite (NO_2) ;
- le dioxyde de Sulfure (SO_2) ;
- le monoxyde de Carbon (CO) ;
- l'Ozone (O_3) (D'Amato et al., 2020; Helander et al., 1997; Millar et al., 2022; Ziemianin et al., 2021).

Ces matières particulaires peuvent contribuer au développement d'atopie par différents mécanismes :

- d'affecter l'épithélium nasal ;
- d'affaiblir le système immunitaire ;
- d'augmenter le pouvoir allergène d'autres allergènes (Burks et al., 2020).

4.5. Fumée du Tabac

Les allergies respiratoires sont souvent associées à la fumée active ou passive du tabac. L'exposition au tabac peut contribuer à l'installation d'une atopie via différents mécanismes, dont les plus connus sont :

- un endommagement direct de la surface de la muqueuse nasale ;
- une altération des mécanismes épigénétiques par une acétylation des histones, une expression de microARN et une méthylation de l'ADN ;
- une sécrétion de cytokines / chimiokines favorisant la formation des Th2 (Massoud et al., 2019).

4.6. Microbiome

Une perturbation dans le microbiome des voies respiratoires ou/et du tractus gastro-intestinal est considérée comme un facteur de risque dans le développement des allergies respiratoires.

Par exemple, une colonisation précoce par *Corynebacterium spp.*, *Dolosigranulum spp.* et *Moraxella spp.* est corrélée à une voie respiratoire saine. Cependant, une colonisation nasopharyngée par *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Haemophilus influenzae* est associée au développement d'une allergie respiratoire chez les nouveaux nées (Barcik et al., 2020; Gensollen et al., 2017; Koidl et al., 2021; Ver Heul et al., 2019).

5. Types d'allergies respiratoires

5.1. Rhinite allergique

La rhinite allergique est une affection nasale causée par une réponse inflammatoire médiée par les IgE suite à l'exposition de la muqueuse nasale à des allergènes. Les principaux symptômes qui caractérisent la rhinite allergique comprennent les démangeaisons nasales, les éternuements, la rhinorrhée et la congestion nasale. La rhinite allergique peut être caractérisée par sa gravité, sa durée ou son caractère saisonnier. Elle est classée en fonction des symptômes généralement divisés en saisonniers ou pérennes. La variante saisonnière de la rhinite allergique est le plus souvent causée par le pollen des arbres (Wise et al., 2018).

5.2. Asthme

L'asthme, maladie respiratoire chronique, se définit par une inflammation des voies respiratoires provoquant une obstruction réversible des voies respiratoires et implique souvent une respiration sifflante, un essoufflement, une toux et une oppression thoracique. Il existe différents types d'asthme dont le plus courant est l'asthme allergique (Choi et al., 2022).

5.3. Pollinose

La pollinose ou « allergie au pollen », également connu sous le nom de rhume des foins ou rhinite allergique saisonnière, survient suite à l'exposition répétée d'une personne atopique à des allergènes du pollen. Cette exposition se traduit par une réaction d'hypersensibilité de type I (Massoud et al., 2019).

Chapitre 02
Allergie au pollen

L'allergie au pollen est parmi les maladies non-transmissibles les plus fréquentes. Même si elle est souvent considérée comme une affection banale, la pollinose est une maladie respiratoire majeure avec une morbidité ayant un impact socioéconomique lourd suite à l'affection majeure de la qualité de vie (Suanno et al., 2021).

Les grains de pollen en suspension dans l'air, en particulier ceux des espèces végétales pollinisées par le vent (anémophiles), comptent parmi les agents étiologiques les plus importants de la rhinite et l'asthme allergiques (Hellings et al., 2017; Meng et al., 2020). En outre, plusieurs études ont mis en évidence l'association du pollen au problème croissant de respiration sifflante, de dermatite atopique (eczéma) et des maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC) chez les personnes sensibles (Singh et al., 2021).

La sensibilisation allergique au pollen a une distribution mondiale mais dépend plus des contributions régionales des espèces végétales endémiques. Le pollen dérivé de ces espèces est libéré dans l'atmosphère à divers intervalles saisonniers tout au long de l'année et l'exposition personnelle peut entraîner des profils uniques de sensibilisation aux aéroallergènes au sein d'une communauté (Ramon et al., 2021).

1. Pollen

Les grains de pollen (environ 5 - > 200 μm) représentent les gamétophytes mâles dans la reproduction sexuée des plantes à graines (gymnospermes et angiospermes/plantes à fleurs). Leur fonction intrinsèque est de décharger les gamètes mâles près du gamète femelle pour la fécondation en passant par plusieurs étapes séquentielles. Les grains de pollen se développent dans les anthères (phase de développement) ; après leur dispersion à partir des anthères, les grains de pollen restent des unités fonctionnelles indépendantes (phase de libre dispersion) jusqu'à ce qu'ils atterrissent sur le stigmate par pollinisation. La phase de dispersion libre couvre les événements à partir du moment où le pollen est libéré de l'anthère jusqu'à ce qu'il se pose sur le stigmate. Au cours de cette phase, les grains de pollen répondent aux différentes variables environnementales. Les grains de pollen de la majorité des espèces sont excrétés dans des conditions desséchées (avec une teneur en humidité généralement <20 %); cependant, les grains de pollen de Poaceae (graminées) sont libérés dans des conditions plus hydratées (environ 50 % d'humidité) (Shivanna et al., 2020).

Les grains de pollen présentent une structure relativement homogène renfermant tout le matériel biochimique nécessaire pour délivrer le gamète mâle à l'ovule. Ils comprennent une cellule reproductrice renfermée dans une double enveloppe. L'enveloppe interne « intine » est lisse et cellulosique. L'enveloppe externe « exine » est de nature protéique et ornementée d'épaisseur

et de pores appelés apertures (Figure 4). Le grain de pollen lui-même est immobile et sa dispersion est facilitée par des agents tels que l'eau, les insectes, les oiseaux et le vent. Par conséquent, les grains de pollen sont considérés comme des aéroplanctons (flottant dans l'air) entourant les êtres humains (Xie et al., 2019).

Les plantes entomophiles (pollinisées par les insectes) produisent une faible quantité de pollen lourd ou collant qui ne sont pas aéroportés en raison de leur poids moléculaire élevé. Alors que les plantes anémophiles (pollinisés par le vent), y compris les arbres, les dicotylédones herbacées (mauvaises herbes) et les graminées, possèdent de grandes étamines portées sur de longs filaments bien exposés, souvent organisés en chatons. Leurs fleurs manquent généralement de couleur, de parfum et de nectar et libèrent de grandes quantités de pollen durant les temps chauds et secs. Selon la saison, les grains de pollen anémophiles peuvent rester en suspension dans l'air pendant des jours et être transportés à des centaines de kilomètres de leur point d'origine. La taille est un attribut physique critique pour les aéroallergènes et une considération importante dans la pathogenèse des allergies respiratoire en général et des pollinoses en particulier. Les grains de pollen aéroportés varient en taille de 15 à 75 μm (Jae-Won, 2022).

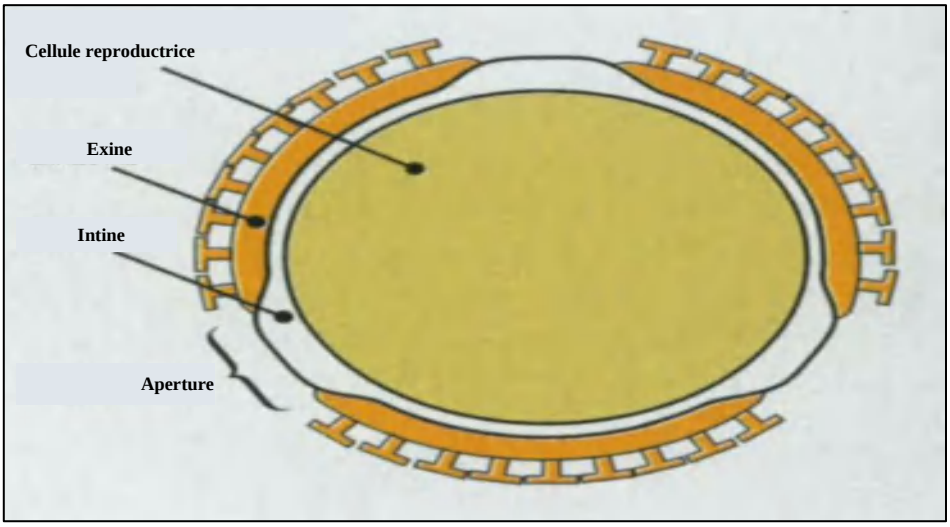


Figure 4. Structure d'un grain de pollen (Katifori et al., 2010).

2. Allergénicité du pollen

Le pollen affecte en général la muqueuse des voies respiratoires supérieures. Chaque grain de pollen est une structure à double paroi (sauf dans certains cas) contenant différents métabolites comme des protéines, des glucides, des hormones, des acides organiques, des pigments et des minéraux, etc.

Les protéines présentes à l'intérieur des grains de pollen peuvent être à l'origine de l'activation de fortes réactions d'hypersensibilité de type I chez les personnes sensibilisées. Ainsi, le déclenchement de ces réactions allergiques exige au préalable la libération des protéines allergéniques du pollen (Ravindra et al., 2022). Deux mécanismes préliminaires sont nécessaires pour que les particules allergènes soient expulsées des grains de pollen :

a- l'hydratation des grain de pollen au contact de l'épithélium respiratoires humides, telles que la conjonctivite et le nez, favorise la diffusion et l'expulsion de ses constituants allergiques ;
b- le pollen peut libérer des matières allergènes par choc osmotique au contact de l'eau de pluie respirables lors du dessèchement (Stone et al., 2021).

L'expulsion du contenu pollinique vers l'extérieur donne naissance à de petites structure appelées granules cytoplasmiques de pollen « GCP ». Ces dernières contiennent les principaux allergènes du pollen et regroupent principalement :

- des micro-granules cytoplasmiques (< 5µm) :
  - les submicroniques ;
  - les subpolliniques ;
  - les paucimicroniques.
- des granules d'amidon (amyloplastes, 3 µm de diamètre ; environ 700 par grain de pollen) ;
- des particules P qui sont des corps précurseurs de paroi contenant des polysaccharides (pectine).

Les GCP, en raison de leur taille très réduite, peuvent atteindre les voies respiratoires inférieures et induire ainsi des réactions allergiques, médiées par les IgE, plus fortes comparativement à celles provoquées par le grain de pollen entier. Ces mécanismes reflètent la probabilité d'induire des épidémies, comme l'asthme lié aux orages et leur lien avec l'augmentation des hospitalisations quelques heures après le passage de l'orage (Hew et al., 2019; Ravindra et al., 2021; Stone et al., 2021).

Une densité de 20 à 100 grains de pollen/m^3 est considérée comme suffisante pour déclencher une pollinose chez des personnes sensibilisées. Pour tout individu, l'allergie au pollen reflétera la flore d'un endroit particulier, ainsi que les caractéristiques spécifiques au pollen et aux allergènes de pollen telles que la capacité de libération, la densité flottante, la dispersibilité, l'abondance et la profusion (Jae-Won, 2022; Suanno et al., 2021).

2.1. Allergènes de pollen

D'après **Allergome**, base de données spécialisée des molécules allergènes, 1407 différents variants d'allergènes polliniques sont répertoriés. Environ 1000 allergènes polliniques sont désormais identifiés : la structure moléculaire, la source botanique ainsi que les espèces sensibles possibles. Parmi eux, plus de 150 différents allergènes de pollen ont été confirmés comme allergènes impliqués dans le développement d'allergies respiratoires chez l'Homme (Suanno et al., 2021; Xie et al., 2019).

En fonction de la séquence protéique, les allergènes du pollen sont répartis sur 29 familles de protéines (Tableau 1). Les allergènes appartenant aux familles d'Expansines N-terminal (Groupe 1) et Ole e 1–like (Groupe 5) sont les plus allergisants et les principaux contributeurs à l'allergie au pollen. Les poids moléculaires des protéines polliniques allergéniques sont compris entre 10 et 94 KDa (Radauer et al., 2006; Sénéchal et al., 2015; Yagami et al., 2019).

Les principaux types de pollen causant la pollinose dans la région méditerranéenne proviennent des graminées (type de pollen *Poaceae*) et de l'olivier (type de pollen *Olea*). Les graminées sont la principale cause d'allergie dans le monde. Alors que l'olivier est compté comme l'allergène le plus important dans le bassin méditerranéen en raison de la vaste distribution de cette culture agricole (García-Mozo, 2017).

Dans le cas des groupes d'allergènes des graminées (famille Poaceae), il existe une prédominance de la prévalence de sensibilisation des groupes 1 et 5 (Plaza et al., 2016). Les deux groupes comprennent les allergènes majeurs, en particulier les allergènes de *Phleum pratense*, Phl p 1 (groupe 1) et Phl p 5 (groupe 5). L'analyse des IgE spécifiques permet de distinguer les patients sensibilisés à ces allergènes qui déclenchent des réactions allergiques chez respectivement plus de 90 % pour le Phl p 1 et 65 à 85 % pour le Phl p 5 des personnes sensibles aux graminées (D'Amato et al., 2007; Kailaivasan et al., 2018).

Dans le cas de l'olivier, Ole e 1 est l'allergène majeur avec 80 % des individus allergiques au pollen de l'olivier sensibilisés à cet allergène (Asam et al., 2015). Ole e 1 est impliqué dans l'hydratation et la germination du pollen (Feo Brito et al., 2011; Lara et al., 2023; Plaza et al., 2016).

Tableau 1. Répartition des allergènes polliniques en familles de protéines (Radauer et al., 2006).

Famille	Ordre (sur 29)	Membres de famille (sur 157 séquences protéiques identifiées)
Expansine N-terminal	1	14
Profiline	2	21
Main EF (*EF-Hand*)	3	14
Expansine C-terminal	4	26
Ole e 1–like	5	9
Pectate lyase	6	9
Ribonucléase	7	8
Bet v 1–like	8	8
Glycosyl hydrolase 28	9	7
Domaine de liaison au FAD (*FAD-binding domain*)	10	7
Thaumatin-like	11	6
Prolamine	12	4
Amb V allergènes	13	3

*Seules les familles d'allergènes polliniques comptant au moins 3 membres sont répertoriées

2.2. Pathogènes de la pollinose

Les réactions immunologiques liées à l'allergie au pollen sont souvent décrites comme associées à une activation dépendante des IgE spécifiques de l'allergène, une réaction d'hypersensibilité type I (Vedanthan et al., 2021).

Outre le mécanisme allergique classique décrit dans le chapitre précédent, de nouvelles cytokines émergentes IL-33, IL17 et leurs cellules productrices Th17 contribuent également aux réponses immunitaires pathogènes de l'allergie respiratoire au pollen. Au jeune âge, les mutations de FOXP3 peuvent conduire au syndrome lié à l'X appelé poly-endocrinopathie et entéropathie d'immunodéficience (IPEX : *Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked*), qui est une combinaison d'auto-immunité et de troubles allergiques

graves. Contrairement à la Th17, il a été suggéré que les cellules T régulatrices (Treg) $Foxp3^+$, $CD4^+$ et $CD25^+$ suppriment l'inflammation allergique principalement par contact cellulaire ou par sécrétion de cytokines solubles, telles que l'IL-10 et le TGF-β (*Transforming Growth Factor* β). Les cellules Treg atténuent les symptômes des patients souffrants d'allergie au pollen non seulement en inhibant les mastocytes et la production d'IgE spécifiques au pollen, mais également en inhibant la maturation des cellules dendritiques (D'Amato et al., 2020; Damialis et al., 2019; Sone et al., 2005; Yagami et al., 2019).

2.3. Facteurs environnementaux affectant l'allergénicité du pollen

En raison de la nature omniprésente des grains de pollen, on estime qu'un pourcentage élevé d'humains sont sensibles à ces types d'allergènes. La prévalence des allergies au pollen sont en augmentation continue. Par exemple, il a été établi par l'enquête européenne sur la santé respiratoire (*European Community Respiratory Health Survey*) que la prévalence de la rhinite allergique est passée de 4 % à 32 % en Europe (Jae-Won, 2022). De nombreux facteurs sont impliqués dans l'augmentation du nombre et/ou du pouvoir allergénique des allergènes polliniques dans l'atmosphère (Figure 5) (Ravindra et al., 2022), tels que :

2.3.1. Changement climatique et le réchauffement climatique

Le changement climatique et l'augmentation de la température de surface globale dans l'atmosphère ont un impact significatif sur les événements du cycle de vie des plantes (photosynthèse et croissance des plantes) et leurs paramètres physiologiques (tels que la production de pollen, la morphologie et la saison pollinique) (Damialis et al., 2019; Poole et al., 2019; Ziello et al., 2012).

Par conséquent, la relation globale entre les facteurs climatiques, les conditions météorologiques et les concentrations de pollen peut être complexe et multidimensionnelle. Le CO_2 est considéré comme la seule source de carbone aux plantes, ce qui affecte la photosynthèse, la croissance des plantes et la production de pollen (Ziska et al., 2019). Une augmentation de la température et du CO_2 influence la concentration de pollen, la chronologie des saisons, la force et la durée, et peut-être une augmentation du contenu allergène, qui ne reste pas constant et se révèle variable entre les diverses espèces émettant du pollen dans l'atmosphère (Beggs, 2015; Ziska et al., 2019). Par conséquent, ces événements changeants affectent le modèle de pollen qui pourrait affecter la pollinose et exacerber d'autres maladies allergiques.

2.3.2. Conditions météorologiques et de la répartition géographique

Un autre aspect contribuant à l'ampleur et à la concentration du pollen est le changement des conditions météorologiques et de la répartition géographique (Gross et al., 2019; Skjøth et al., 2013; Wjst et al., 2005). La concentration de pollen sur un site particulier reflète la distribution des sources de pollen à quelques kilomètres du site (Ravindra et al., 2022). Les changements des facteurs météorologiques, en particulier la vitesse et la direction du vent, auront un impact direct sur les activités polliniques aérobiologiques telles que l'émission, la dispersion, la transmission et le dépôt. Cela a un effet direct sur la prévalence et l'occurrence des allergies au pollen (Poole et al., 2019). Certaines preuves soutiennent que les populations sensibles réagissent aux changements météorologiques brusques dans l'environnement, par exemple, les orages (Hew et al., 2019; Sabih et al., 2020). De nombreuses études ont rapporté le transport à longue distance du pollen à partir de leurs sites de libération. Les grains de pollen se dispersent et se déplacent d'un endroit à un autre en raison des conditions météorologiques changeantes, exposant les humains à de nouveaux allergènes (S. Yang et al., 2019).

2.3.3. Pollution

L'urbanisation rapide non planifiée avec des émissions élevées de véhicules a été signalée comme étant liée à l'incidence croissante des pollinoses en particulier de toutes les allergies respiratoires induites par le pollen (Ghiani et al., 2012). Des études cohérentes soutiennent que les personnes vivant dans les zones urbaines sont plus susceptibles au développement d'allergies au pollen que les personnes vivant dans les zones rurales (Charalampopoulos et al., 2021; Sénéchal et al., 2015). De plus, les polluants atmosphériques et le pollen sont connus pour avoir un effet synergique sur la santé humaine (Ravindra et al., 2022). Les polluants atmosphériques peuvent se fixer à la surface des grains de pollen et peuvent modifier la morphologie (changement de diamètre, amincissement de l'exine, rupture de l'exine) de ces agents porteurs d'antigènes et altérer le potentiel allergisant (Oduber et al., 2019). L'exposition aiguë et chronique à divers polluants tels que le dioxyde d'azote (NO_2), le dioxyde de soufre (SO2), l'ozone (O_3) et les matières particulaires (les $PM_{2.5}$ et les PM_{10}) intensifie la réactivité des voies respiratoires au pollen chez les individus atopiques (Zhao et al., 2016).

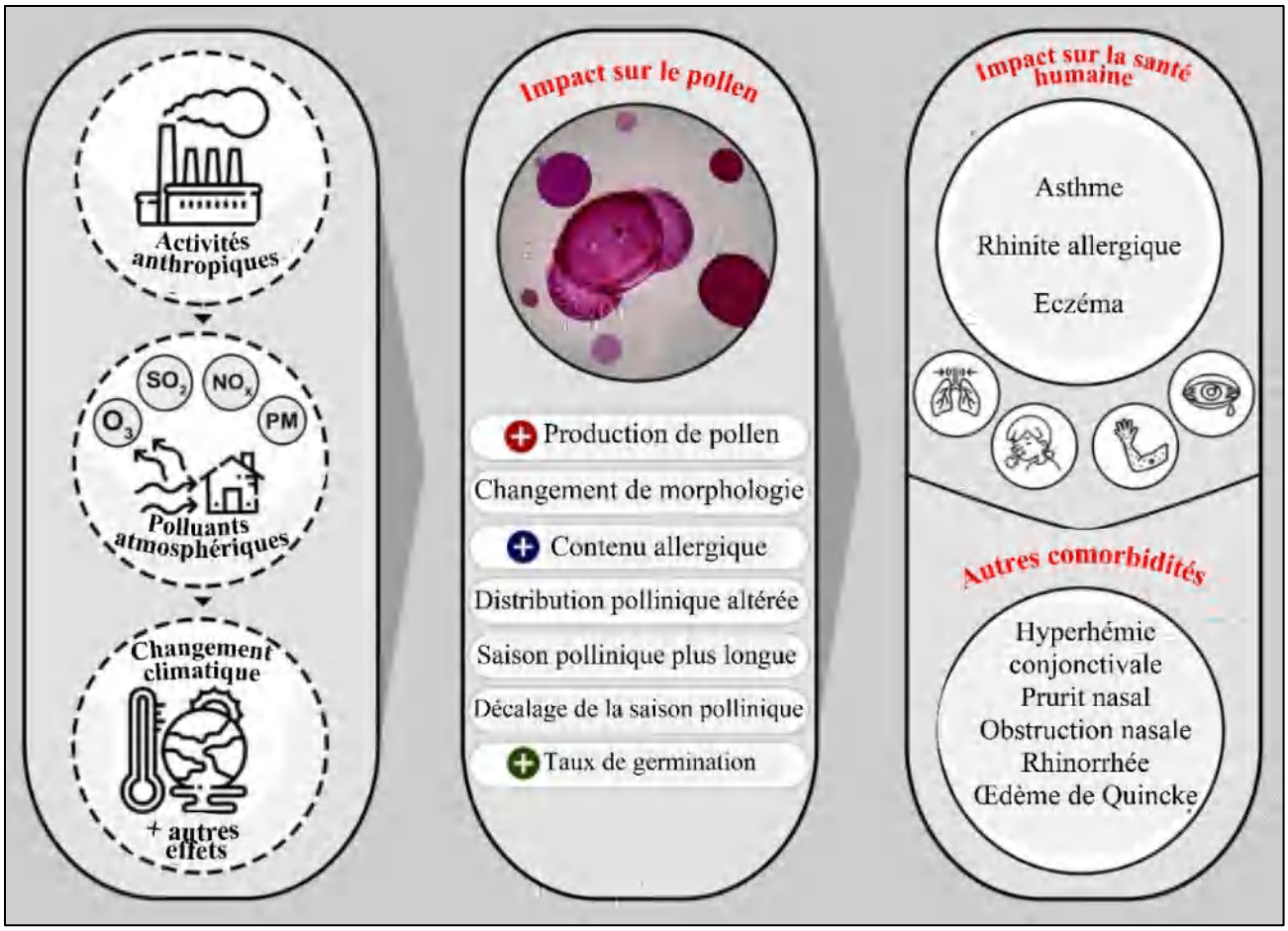


Figure 5. Les facteurs environnementaux affectant l'allergénicité du pollen (Ravindra et al., 2022).

Ces observations montrent une association claire entre les changements de température, les paramètres météorologiques, la pollution de l'air et le nombre/concentration de pollen ambiant. La relation entre les facteurs climatiques et la production de pollen en suspension dans l'air pourrait avoir un système multifactoriel multiple (Ravindra et al., 2021).

3. Syndrome pollen-aliment

Le syndrome d'allergie au pollen-aliment (PFAS : *Pollen-Food Allergy Syndrome*), est une réaction allergique immédiate localisée qui survient principalement dans la bouche et la gorge. Le PFAS se développe suite à la consommation d'aliment (légumes ou de fruits frais) présentant une réactivité croisée avec le pollen chez les patients allergiques au pollen. Avec le nombre croissant de patients atteints de pollinose, le nombre de patients atteints de PFAS a également augmenté ces dernières années (Carlson et al., 2019; Poncet et al., 2020; Sakamoto et al., 2022).

Le PFAS est un sous-type du syndrome d'allergie orale (OAS : *Oral Allergy Syndrome*). Il se caractérise généralement par les symptômes suivants : des démangeaisons et une gêne au niveau

des muqueuses buccale, pharyngienne et labiale. Ces symptômes disparaissent spontanément dans de nombreux cas. Bien que très rarement, des symptômes respiratoires (rhinite et congestion pharyngée), gastro-intestinaux (diarrhée et douleurs abdominales) et systémiques (urticaire et choc anaphylactique) peuvent survenir (Ebisawa et al., 2017; Yagami et al., 2019).

3.1. Allergènes déclenchant le PFAS

La principale préoccupation dans le PFAS concerne les allergènes alimentaires de classe II. Ces derniers représentent les allergènes d'origine alimentaire qui ne sont pas impliqués dans la sensibilisation chez une personne atopique, mais qui sont responsables seulement du déclenchement de la réaction allergique. Cependant, les allergènes alimentaires de classe I sont tout allergène d'origine alimentaire impliqué directement dans la sensibilisation et le déclenchement d'une réaction allergique chez une personne atopique (Carlson et al., 2019).

Lors du PFAS, la sensibilisation des patients atopiques est assurée par les allergènes du pollen et non pas les allergènes alimentaires. Cependant, la réaction d'hypersensibilité est déclenchée par des allergènes alimentaires de classe II. Ces derniers possèdent une réactivité croisée avec l'allergène pollinique où l'individu est sensibilisé (Burks et al., 2020).

3.2. Réactivité croisée entre les allergènes de pollen et d'aliments

La réactivité croisée en termes immunologiques fait référence à la capacité des composants du système immunitaire (dans le cas d'allergie, les anticorps IgE et/ou les lymphocytes T) à reconnaître différents antigènes. Les allergènes de pollen induisent des schémas larges et complexes de réactivité croisée avec les IgE, bien que la réactivité croisée entre les allergènes de pollen soit principalement observée en relation avec l'allergène pollinique majeur « Bet v 1 ». Les extraits d'aulne, de charme, de noisetier, de chêne, de châtaignier et de hêtre contiennent des allergènes homologues et présentant une réaction croisée in vitro avec l'allergène pollinique « Bet v 1 ». Cette réactivité croisée a été confirmée par les résultats des tests cutanés (SPT) et du RAST (*RadioAllergoSorbent Test*) (Biedermann et al., 2019). D'autres exemples de la réactivité croisée entre des allergènes protéiques et des allergènes alimentaires sont récapitulés dans le tableau 2 (Poncet et al., 2020).

Tableau 2. Tableau récapitulatif des réactivités croisées entre les allergènes polliniques et les allergènes alimentaires (Poncet et al., 2020).

Familles d'allergènes	**Sources d'allergènes**		**Syndrome ou l'association**	
	Pollen	Aliment	Pollen	Aliment
PR10 (Pathogenesis-Related proteins 10)	Bet v 1	Mal d 1	Bouleau	Pomme
Profiline	Bet v 2	Api g 4, Mal d 4 et Pru p 4	Bouleau	Céleri-rave, Pomme et Pèche
	Che a 2	Cuc m 2	Chénopodes	Melon
	Phl p 12 Cyn d12	Sola l 1 Cuc m 2	Herbe	Fruits
	Art v 4	Lit c 1 Api g 4 Pru p 4 Sin a 4	*Compositae* Armoise Armoise Armoise	Fruits exotiques Céleri-rave et les épices Pèche Moutarde
	Amb a 8	Cuc m 2 et Mus a 1	Ambroisie	Melon et Banane
LTP (*Lipid Transfer Proteins*)	Amb a 6	Mus a 3	Ambroisie	Banane
	Art v 3	Sin a 3 Pru p 3	Armoise	Moutarde Pèche
	Pla a 3	Pru p 3	Platane	Fruits
Oxydoréductase FAD-dépendante	Art v 60 KDa	Api g 5	Armoise	Céleri-rave et les épices
	Art v 60 KDa	Inconnu	Armoise	Moutarde
Défensine	Art v 1 (putatif)	Inconnu	Armoise	Camomille
Snakin/GRP (*Gibberellin-Regulated Proteins*)	Cup s 7, Cry j 7 et Jun a 7	Pru p 7 et Cit s 7	*Cupressaceae*	Pèche et agrumes
Polygalcturonase	Cry j 2 et Jun a 2	Sola l PG	*Cupressaceae*	Tomate
Isoflavone réductase	Bet v 6	Pyr c 5	Bouleau	Fruits
B-1,3 Glucanase	Ole e 9	Mus a 5	Pollen	Latex Aliments

Partie Pratique

Matériels et Méthodes

Matériels & Méthodes

1. Echantillons de pollen d'abeille

Huit échantillons de pollen d'abeille destinés à la consommation humaine proviennent de différents ruchers des colonies de l'abeille *Apis melliféra intermissa tellienne* localisés dans le Nord de l'Algérie : Constantine, Guelma, Boumerdès, Sétif, Jijel, Skikda, Khenchla et Tizi Ouzou (Figure 6 et annexe 1).

Les échantillons de pollen d'abeille ont été collectés par les apiculteurs durant la saison florale de l'année 2019. Les échantillons préséchés, par les apiculteurs, ont été conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

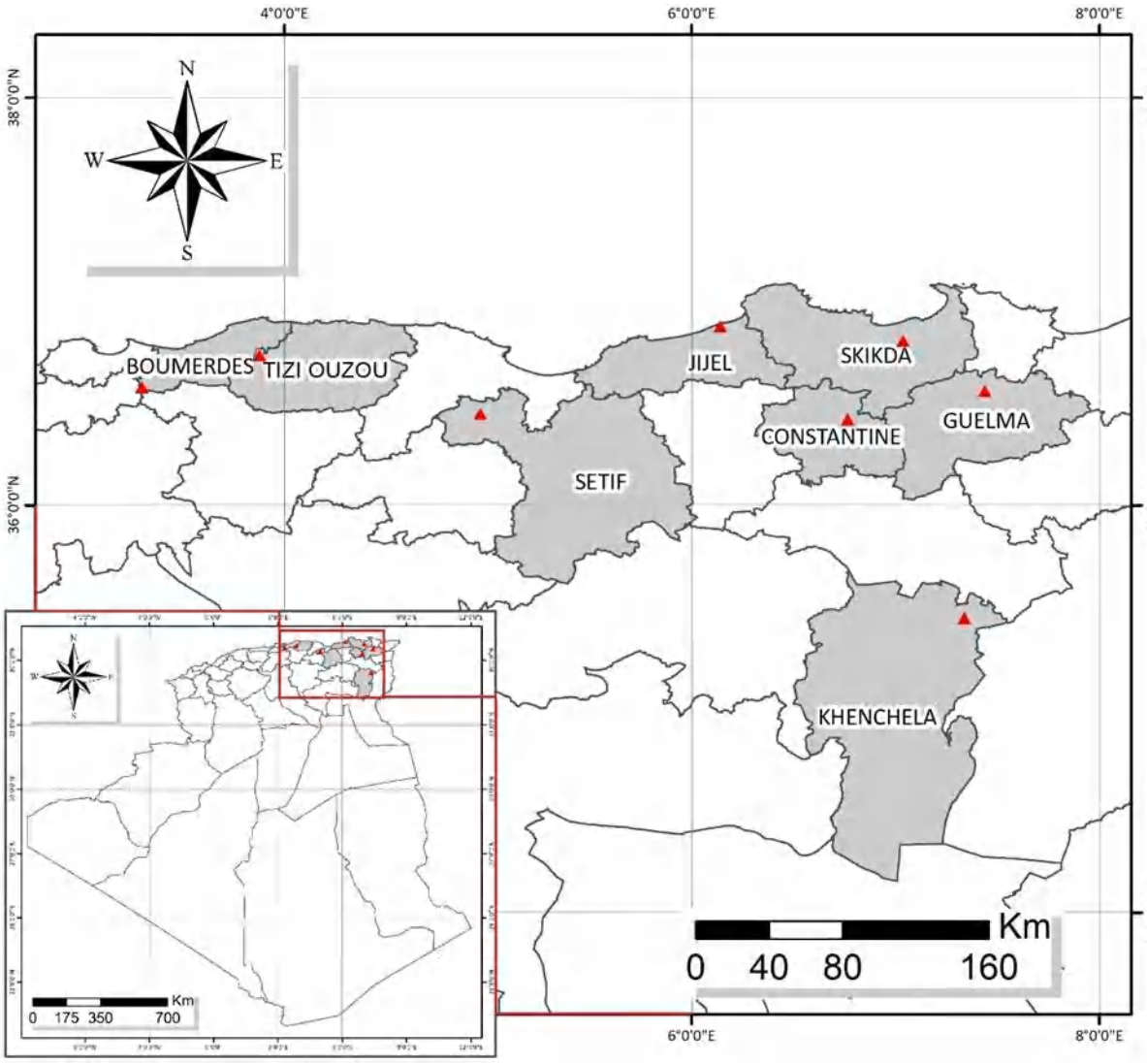


Figure 6. Géopositionnement des ruchers dans la zone d'étude.

2. Analyse palynologique

2.1. Principe

L'analyse palynologique des échantillons de pollen d'abeille a été réalisée par microscopie (Louveaux et al., 1978). Le principe est basé, en premier temps, sur l'identification sous microscope de l'origine botanique de chaque grain de pollen, puis, sur la détermination des fréquences d'occurrence de chaque type de pollen, par un comptage sous microscope, sur un nombre total qui dépasse les 500 grains tous types confondus.

2.2. Mode opératoire

Des spécimens de dix grammes de chaque échantillon ont été mélangés avec 100 mL de l'eau chaude (50°C). Deux heures plus tard, les pelotes de pollen d'abeille ont été totalement macérés avec un bâton en verre. Les mélanges ont été centrifugés à 2500 rpm pendant 10 min et les surnageants ont été éliminés. Ensuite, 50 mL d'une solution glycérine : eau (1v : 1v) ont été rajoutés aux résidus du pollen d'abeille. Deux autres centrifugations ont été effectuées, dans les mêmes conditions, après 2 heures et 24 heures. Enfin, le montage des lames a été procédé selon la méthode de la gelée de glycérine (Riding, 2021). Pour augmenter le contraste, la fuchsine basique a été utilisée comme colorant durant le processus de montage des lames.

L'observation des grains de pollen a été réalisée à l'aide d'un microscope optique, BIOSTAR B4 SP Microscope (Exacta Optech, München, Allemagne), équipé d'un système d'analyse d'images EOS 450 D (CANON Inc., Japon). Les types de pollen ont été identifiés en comparant la forme des grains ainsi que la texture de leur surface par rapport à la littérature spécialisée, « Atlas de pollen » et une collection de référence du Département de Biologie Végétale et Sciences du Sols de la Faculté des Sciences, Université de Vigo à Ourense, Espagne.

Quand le grain de pollen est constaté comme une espèce spécifique ou appartenant à un genre bien déterminé, le nom scientifique de l'espèce ou du genre est attribué et ce grain est ainsi désigné. Cependant, lorsqu'un grain de pollen possède une morphologie similaire à celle de certaines espèces, d'un genre ou d'une famille botanique, la nomenclature « type de pollen » est utilisée. A cet effet, un type de pollen peut être défini comme un groupe de plantes ayant des grains de pollen morphologiquement similaires sous microscope optique.

La fréquence d'occurrence (FO) a été attribuée aux types de pollen de chaque échantillon en fonction du pourcentage d'occurrence de chaque type de pollen dans l'ensemble d'échantillon, les fréquences d'occurrence ont été réparties en quatre catégories :

- rare (moins de 10 %) ;
- peu fréquent (10 à 20 %) ;
- fréquent (21 à 50 %) ;
- très fréquent (plus de 50 %) (Alves et al., 2014).

3. Etude phytochimique des extraits de pollen d'abeille

3.1. Préparation d'extraits

Les extraits ont été préparés par la macération de 300 g d'échantillons de pollen d'abeille broyés dans 600 mL de l'éthanol (96 %) (1p : 2v) pendant 5 jours à température ambiante sous agitation, avec renouvellement du solvant le troisième et le quatrième jours. Les extraits éthanoliques de pollen d'abeille ont été obtenus en mélangeant, filtrant et concentrant les produits de toutes les extractions pour chaque échantillon dans un rotavap à 40 °C.

3.2. Composants phénoliques

3.2.1. Teneurs en polyphénols totaux (TPT)

Principe

Les teneurs totales en composés phénoliques des 8 extraits ont été évaluées par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965). Brièvement, en présence de composés phénoliques le réactif de Folin-Ciocalteu est réduit en mélanges d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite est directement proportionnelle à la quantité de polyphénols présentes dans l'extrait.

Mode opératoire

Dans des microplaques de 96 puits, 100 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (à 1/10 (v/v)) et 7,5 µL de carbonate de sodium (7,5 %) ont été rajoutés à 20 µL d'extrait. Après une incubation de 2 heures dans l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 765 nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique pour un gramme d'extrait de pollen d'abeille (mg EAG/ g).

3.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux (TFT)

Principe

Les teneurs totales en flavonoïdes ont été déterminées par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (Topçu et al., 2007). Le principe de la méthode est fondé sur la

détection de complexes stables formés par le trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes en milieu acide ayant une absorption maximale à 415 nm.

Mode opératoire

Dans chaque puits, 130 µL de méthanol, 10 µL de nitrate d'aluminium (10%) et 10 µL d'acétate de potassium aqueux (1 M) ont été ajoutés à 20 µL d'extrait. Après 40 minutes d'incubation, les absorbances sont lues à 415 nm. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine pour un gramme d'extrait de pollen d'abeille (mg EQ/ g).

3.2.3. Teneurs en flavonols totaux (TFlT)

Principe

Les teneurs totales en flavonols ont été déterminées en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (Kumaran et al., 2007). Dans milieu à pH acide les groupes C4-Cétone et C-3 hydroxyle des flavonols interagissent avec le trichlorure d'aluminium et forment des complexes stables ayant une absorption maximale à 440 nm. Une augmentation de l'absorbance correspondant à une forte teneur en flavonols.

Mode opératoire

Dans une plaque de 96 puits, 50 µL de chaque extrait ont été ajoutés à 50 µL de nitrate d'aluminium (2%) et 150 µL d'acétate de sodium aqueux (5%). Après 2 heures d'incubation, les absorbances ont été enregistrées à 440 nm. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine pour un gramme d'extrait de pollen d'abeille (mg EQ/100 g).

3.3. Profil phénolique du pollen d'abeille

Le profil phénolique des extraits de pollen d'abeille a été réalisé par l'analyse des échantillons par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.

Principe

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* ou LC-MS) est une technique d'analyse associant le pouvoir séparatif de la chromatographie en phase liquide (HPLC) et la performance en sensibilité et sélectivité analytique de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances.

Mode opératoire

L'analyse LC-MS a été réalisée sur l'instrument HPLC série Agilent 1200 Infinity couplé à un MS Agilent 6130B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Le système du chromatographe (paramètres de fonctionnement en annexe 2) est composé de :

- une pompe quaternaire ;
- un dégazeur ;
- un échantillonneur automatique (autosampler) ;
- un détecteur à barrette de diodes (DAD, *Diode Array Detector*).

Les composés ont été séparés à 25 °C sur une colonne en phase inverse C18 : taille des particules 5 µm, longueur 250 mm et diamètre 4,6 mm (Thermo Scientific™ Hypersil™ ODS). La phase mobile est initialement composée de 80 % d'éluant A (1 %, v/v, solution d'acide formique dans de l'eau ultrapure) et de 20 % d'éluant B (acétonitrile) et le gradient est comme suivant :

- 30 % B à 10 min ;
- 40 % B à 40 min ;
- 60 % B à 60 min ;
- 90 % B à 80 min.

La phase mobile a été réinitialisée à 20% de B à 85 min pour un rééquilibrage de 4 min.

Les extraits (10 mg) ont été dissous dans 1 ml de méthanol. Tous les échantillons ont été filtrés par une membrane en nylon de 0,2 µm (Agilent). Une aliquote de 10 µL de chaque échantillon a été injectée sur la colonne à un débit de 0,8 mL/min. Les effluents du détecteur DAD ont été introduits directement dans le spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électro-nébuliseur (ESI, *ElectroSpray Ionization*).

La détection a été effectuée par balayage entre 190 à 400 nm, et la quantification à 280, 325 et 350 nm en fonction de l'absorption maximale du composé identifié. 14 standards chimiques ont été utilisés pour identifier les composés phénoliques par comparaison de leurs caractéristiques chromatographiques ainsi que leurs comportements spectrophotométriques aux UV et les informations de la spectrométrie de masse.

L'identification et la quantification des composés ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec différentes concentrations des standards. Les résultats ont été exprimés en microgramme par milligramme d'extrait.

4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

Etant donné que les processus d'oxydation sont très complexes et que les antioxydants sont très diversifiés, les activités antioxydantes des extraits éthanoliques du pollen d'abeille ont été évaluées à l'aide de 8 différentes méthodes complémentaires : test au DPPH, test à l'ABTS, Test CUPRAC, test de blanchissement du β-carotène, test FRAP, test à la galvinoxyle (GOR), test à la 1,10-Phénanthroline et le test SNP.

4.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH

Principe

Le dosage du pouvoir antiradicalaire a été déterminé par la méthode de dosage spectrophotométrique du (DPPH°) avec quelques modifications (BLOIS, 1958). Ce test permet de mesurer la capacité d'un antioxydant (AH, les plus souvent des composés phénoliques) à réduire le radical chimique DPPH° (de couleur violet) en DPPH-H (de couleur jaune pâle) (Figure 7).

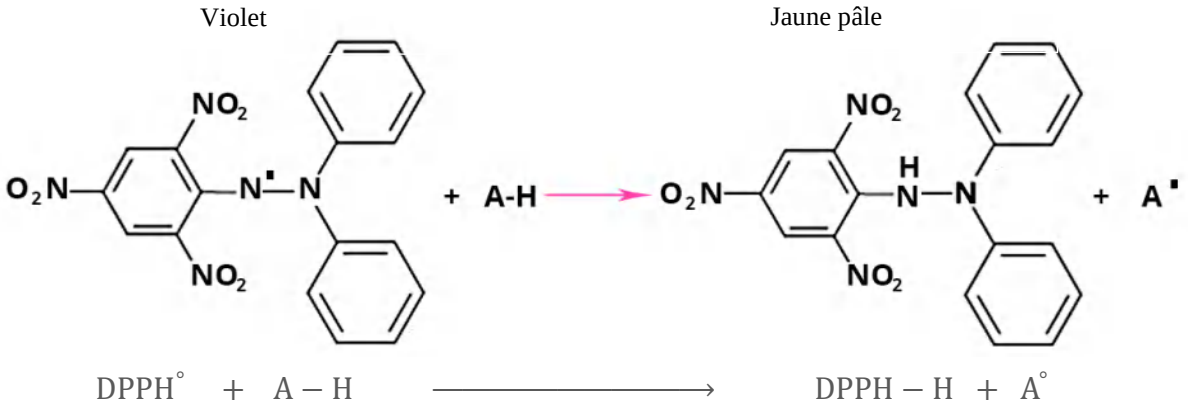


Figure 7. Piégeage du radical DPPH° par un antioxydant.

Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de différentes dilutions des extraits et de standards ont été mélangés à 160 µl d'une solution de DPPH (1mM) préparée dans du méthanol. L'absorbance a été mesurée à 517 nm après 30 min en utilisant le lecteur de microplaques. Les pourcentages de l'activité antiradicalaire du DPPH de chaque extrait ont été calculés comme suit :

$$Effet\ de\ piégeage\ du\ DPPH\ (\%) = \{(A_{Contrôle} - A_{échantillon})/A_{Contrôle}\} \times 100$$

$A_{contrôle}$ est l'absorbance du blanc et $A_{échantillon}$ est l'absorbance du standard ou de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en CI_{50} (µg/mL), Concentration inhibitrice médiane, correspondant

à la concentration de l'extrait requise pour une inhibition à 50 % du DPPH et les résultats sont comparés aux antioxydants standards : BHA (ButylHydroxyAnisole), BHT (ButylHydroxyToluène), acide tannique, acide ascorbique et α-tocophérol.

4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS

Principe

Le test ABTS est considéré comme une des techniques d'évaluation de l'activité antioxydante les plus sensibles. Il est basé sur la détermination spectrophotométrique de la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique coloré de l'Acide 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (le chromophore $ABTS^{\bullet+}$ bleu/vert) par le transfert d'électrons, qui est visualisé par une décoloration correspondante au moment où le radical $ABTS^{\bullet+}$ est réduit en $ABTS^{+}$ (Figure 8) (Chanput et al., 2016; Re et al., 1999).

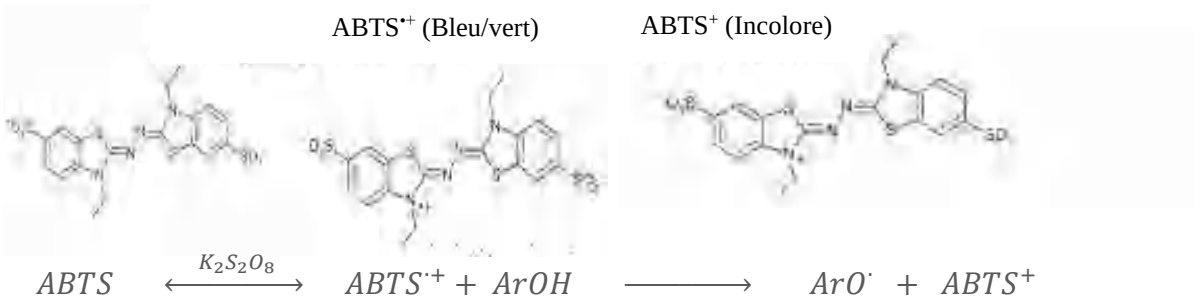


Figure 8 . Génération et piégeage du radical ABTS•+ par un Antioxydant.

Mode opératoire

Une solution du chromophore d'$ABTS^{\bullet+}$ bleu/vert a été préparée par réaction d'ABTS à 2 mM dans l'H_2O avec le persulfate de potassium à 2,45 mM (K2S2O8), qui est ensuite incubée dans l'obscurité à une température ambiante pendant 16 h. La solution d'$ABTS^{\bullet+}$ a été ajustée pour donner une absorbance de 0,700 ± 0,025 à 734 nm.

Ensuite, 40 µl de différentes dilutions des échantillons ou de standards ont été ajoutés à 160 µl de la solution d'$ABTS^{\bullet+}$ dans des microplaques à 96 puits. L'absorbance est enregistrée à 734 nm après 10 min. Les pourcentages d'activité de piégeage des radicaux d'ABTS de chaque extrait sont calculés par l'équation suivante :

$$Effet\ du\ piégeage\ de\ l'ABTS\ (\%) = \{(A_{Contrôle} - A_{échantillon})/A_{Contrôle}\} \times 100$$

$A_{contrôle}$ est l'absorbance du blanc et $A_{échantillon}$ est l'absorbance du standard ou de l'échantillon. Les résultats sont exprimés en CI_{50} (µg/mL) puis comparés aux antioxydants standards suivants : BHA, BHT, acide tannique, acide ascorbique et α-tocophérol.

4.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Principe

Le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre a été utilisé pour déterminer la capacité antioxydante totale des extraits de pollen (Apak et al., 2008). Le principe de ce test est fondé sur l'évaluation de la variation de l'absorbance accrue du complexe « Néocuproïne-Cuivrique ". Sous l'action des antioxydants, le complexe Cu (II)- Néocuproïne (de couleur bleu clair) se transforme au chromophore Cu (I)- Néocuproïne (de couleur jaune-orange), quantifiable spectrophotométriquement à 450 nm, par transfert d'électron (Figure 9).

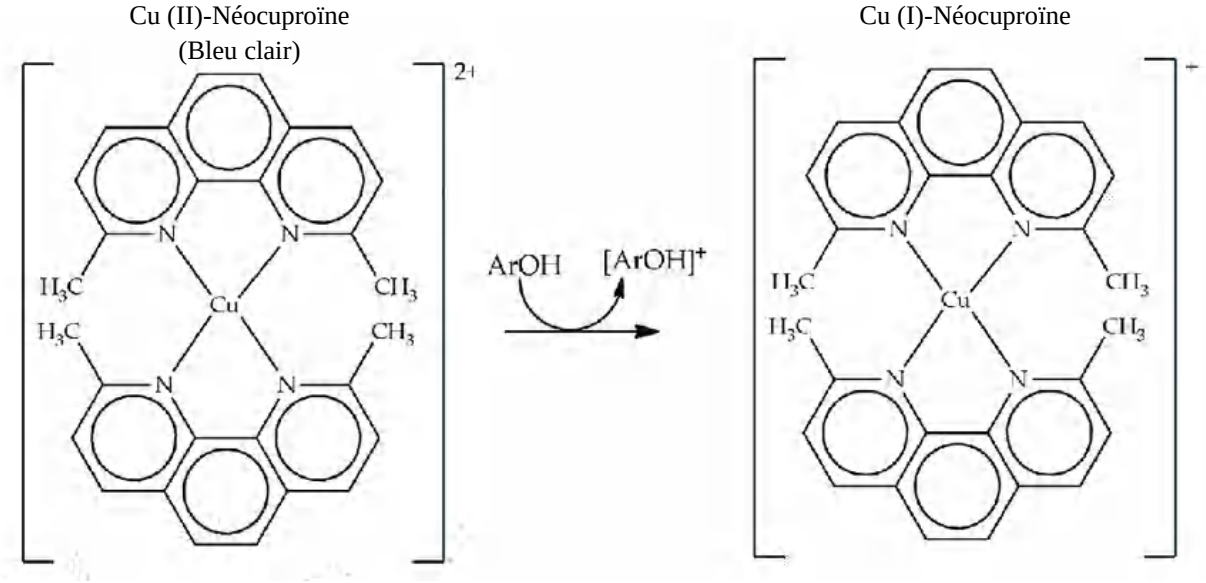


Figure 9. Réduction du complexe Cu (II)-Néocuproïne par un antioxydant donneur d'électron

Mode opératoire

50 µL de la solution de chlorure de cuivre (II) (10 mM) ont été mélangés avec 50 µL de la solution de néocuprine (7,5 mM) et 60 µL de la solution tampon d'acétate d'ammonium (1 M, pH = 7,0). Ensuite, 40 µL de différents extraits ou du standard ont été ajoutés au mélange initial. Après 1 h d'incubation, l'absorbance est lue à 450 nm.

Les résultats sont exprimés en absorbance médiane ($A_{0.5}$) en µg/mL, correspondant à la concentration indiquant une intensité d'absorbance de 0.50.

Le BHA, le BHT, l'acide tannique, l'acide ascorbique et l'α-tocophérol sont utilisés comme antioxydants standards.

4.4. Evaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du β-carotène

Principe

La capacité des extraits du pollen d'abeille à piéger les radicaux libres a été réalisée par le test de blanchissement du β-carotène (Marco, 1968). Le principe de ce test repose sur la mesure spectrophotométrique de la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition d'acide linoléique (composés organiques volatils et hydro-peroxydes conjuguais diène). En présence d'antioxydants, les radicaux libres générés par la décomposition de l'acide linoléique seront neutralisés, ce qui prévient l'oxydation et le blanchissement de la β-carotène.

Mode opératoire

L'émulsion d'acide linoléique avec la β-carotène a été obtenue en ajoutant 20 µL d'acide linoléique avec 200 µL de Tween 40 à 0,5 mg de β-carotène dissous dans 1 mL de chloroforme. Après évaporation du solvant dans un rotavap, 50 mL d'H_2O_2 (30 volumes) ont ensuite été ajoutés au mélange sous agitation vigoureuse, puis, l'absorbance a été ajustée à 0,8-0,9 à 470 nm.

Dans des microplaques à 96 puits, 40 µL des extraits ou des standards à différentes concentrations ont été mélangés avec 160 µL de l'émulsion d'acide linoléique avec la β-carotène. Les absorbances sont enregistrées à 470 nm à 0 min et 120 min.

Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$Pourcentage\ d'Inhibition\ (I\ \%) = \left(\frac{A_{e\ (0)} - A_{e\ (120)}}{A_{c\ (0)} - A_{c\ (120)}}\right) \times 100$$

$A_{c\ (0)}$ et $A_{c\ (120)}$ sont les absorbances (470 nm) du contrôle négatif (Méthanol seul (sans extrait ni standard)) à 0 min et 120 min respectivement. Alors que $A_{e\ (0)}$ et $A_{e\ (120)}$ sont les absorbances des échantillons testés à 0 min et 120 min. Les résultats sont présentés en CI_{50} et le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants standards.

4.5. Evaluation de l'activité antioxydante par le test FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Principe

Le test de la capacité antioxydante par réduction du fer a été utilisé pour examiner le pouvoir réducteur des différents extraits éthanoliques (Oyaizu, 1986). Le principe de ce test est basé sur la capacité des antioxydants à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{2+}). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux et une augmentation de l'absorbance correspondant à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Mode opératoire

Dans chaque puit, 10 µL d'échantillon préparé à différentes concentrations ont été mélangés avec 40 µL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 50 µL du ferricyanure de potassium (1 %). Après 20 min d'incubation à 50 °C, 50 µL de l'acide trichloroacétique (10 %), 40 µL d'eau distillée et 10 µL de la solution aqueuse de chlorure ferrique (0,1 %) ont été rajoutés au mélange. Les absorbances sont mesurées à 700 nm après 10 min.

Le BHA, le BHT, l'acide tannique, l'acide ascorbique et l'α-tocophérol sont utilisés comme standards antioxydants. Les résultats sont exprimés en $A_{0.5}$ (µg/mL).

4.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au galvinoxyle (GOR)

Principe

Le radical libre stable du galvinoxyle a été utilisé pour évaluer le pouvoir antiradicalaire des extraits bruts (Shi et al., 2001). Le principe de ce test repose sur la détermination de la capacité d'antioxydants à transférer des protons aux radicaux du glavinoxyle. Le virement de couleur, de jaune-orange au jaune pâle, est mesuré par spectrophotométrie et la diminution d'absorbance correspondant à une augmentation de l'activité antiradicalaire des extraits testés.

Mode opératoire

Dans chaque puit, 40 µL de différentes concentrations d'extraits dissous dans le méthanol ont été ajoutés à 160 µL de solution méthanolique de galvinoxyle 0,1 mM. L'absorbance est lue à 428 nm après 120 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante. Une solution de galvinoxyle dans du méthanol a été utilisée comme contrôle négatif, tandis que le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. L'équation suivante est utilisée pour calculer les pourcentages d'activité de piégeage du radical galvinoxyle :

$$Effet\ du\ piégeage\ du\ GOR\ (\%) = \{(A_{Contrôle} - A_{échantillon})/A_{Contrôle}\} \times 100$$

Les résultats de l'activité antiradicalaire des échantillons sont présentés en CI_{50}.

4.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à la 1,10-Phénanthroline

Principe

Le pouvoir réducteur des échantillons a été évaluée par le test à la 1,10-phénanthroline (Szydłowska-Czerniak et al., 2008). Le principe de test repose sur la capacité de la 1,10-phénanthroline (appelée aussi orthophénanthroline) a formé un complexe stable avec le fer ferreux (Fe^{2+}), dénommé le complexe ferroïne, de couleur rouge orangé mesurable photométriquement à 510nm. Le fer ferreux est généré dans le milieu réactionnel par la réduction du fer ferrique sous l'action des antioxydants donneurs d'électrons. L'augmentation d'absorbance est proportionnelle à la capacité réductrice des antioxydants.

Mode préparatoire

Dans une microplaque, 10 µL des différentes concentrations d'extraits préparées dans le méthanol ont été ajoutés à 30 µL de 1,10-phénanthroline (0.5% dans du méthanol), 50 µL de chlorure ferrique (0,2 %) et 110 µL de méthanol. Après 20 min d'incubation à 30 C°, l'absorbance des mixtures sont mesurées à 510 nm. Les résultats sont exprimés en absorbance médiane ($A_{0.5}$ (µg/mL)). Les BHA et BHT sont utilisés comme antioxydants standards.

4.8. Evaluation de l'activité antioxydante par le test SNP (*Silver NanoParticule*)

Principe

L'activité métal chélate a été déterminée pour l'ensemble d'extraits par la méthode des nanoparticules d'argent (Özyürek et al., 2012). Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction de l'ion Ag^{+} par les polyphénols en nanoparticules d'argent sphériques A^{0}, en présence de citrate trisodique. Cette réduction produit une bande d'absorption de résonance plasmonique de surface très intense des SNP à 423 nm. Une augmentation d'absorbance est en rapport avec une augmentation de l'activité métal chélate des extraits.

Mode opératoire

Pour la préparation de la solution SNP. 50 mL du nitrate d'argent ($AgNO_3$) ont été chauffé pendant 10 min puis 5 mL de citrate trisodique (1%) ont été ajouté goutte à goutte jusqu'au virement de la couleur vers le jaune pâle. La solution est prête à l'usage une fois refroidie.

Ensuite, dans des microplaques, 20 µL d'extrait ont été mélangés avec 130 µL de la solution SNP et 50 µL d'eau. La lecture est effectuée à 423 nm après une incubation de 30 min température ambiante. Le trolox est utilisé comme antioxydant standard et les résultats sont exprimés en $A_{0.5}$.

5. Analyse des protéines du pollen d'abeille

Les protéines totales des huit échantillons de pollen d'abeille ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de soduim « SDS-Page » (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*).

5.1. Extraction des protéines polliniques

5.1.1. Principe

Le procédé d'extraction des protéines du pollen d'abeille est extrêmement délicat à cause de la rigidité du grain de pollen en raison de la présence d'une couche externe constituée de la sporopollénine (un biopolymère de nature lipidique) appelée « exine » (Luo et al., 2021). Par conséquent, un traitement préliminaire doit être appliqué « une délipidation » qui consiste à l'élimination des lipides et la libération des protéines. Ensuite les protéines sont solubilisées dans un tampon et récupérées dans le surnageant après centrifugation avant d'être concentrées par lyophilisation (Maqsoudlou et al., 2019).

5.1.2. Mode opératoire

- **Délipidation**

  La procédure de dégraissage a été effectuée comme suit : 20 g de chaque échantillon de pollen d'abeille moulu ont été mélangés avec 60 mL d'hexane (selon le rapport 1 : 3 (P/V). Le mélange a été laissé sous agitation pendant 24 heures. Ensuite, l'hexane est éliminé par filtration puis par séchage à l'air sous une hotte. Enfin, le pollen d'abeille dégraissé est conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation.

- **Solubilisation des protéines**

  10 g de pollen d'abeille dégraissé ont été mélangé avec 50 ml du tampon phosphate salin pH 7 (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) selon le rapport 1 : 5 (P/V). Le mélange a été homogénéisé par ultrasonication. Finalement, le surnageant a été récupéré après centrifugation à 4000 G pendant 30 min à 4 °C et lyophilisé.

5.2. Dosage des protéines totales

Principe

La méthode Bradford a été utilisée pour quantifier les protéines totales des lyophilisats polliniques (Bradford, 1976). Le principe de cette méthode colorimétrique repose sur la complexation du bleu de Coomassie G 250 avec les protéines par le biais de ses groupements amines ($-NH_2$). La présence des protéines est révélée photométriquement par le virement de couleur rouge/vert du réactif dans sa forme cationique (non-complexée) en couleur bleu dans sa forme anionique (complexée). L'augmentation de l'absorbance est linéairement proportionnelle à l'élévation du taux des protéines.

Mode opératoire

Dans une plaque microtitre à 96 puits, 20 µL de lyophilisat ont été mélangés avec 180 µL du réactif de Bradford (0.1-1.4 mg/mL de protéine Sigma-Aldrich). La lecture a été réalisée à 595 nm après une incubation de 10 min à une température ambiante. Le BSA (Bovine Serum Albumin) a été utilisé comme protéine de référence pour tracer la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en µg / mg de lyophilisat.

5.3. Electrophorèse des protéines par SDS-Page

Les profils électrophorétiques des protéines des lyophilisats issues des différents échantillons ont été comparés pour réveiller toute variation probable entre les divers échantillons.

Principe

La SDS-Page est considérée comme une technique de référence pour la séparation de mélanges de protéines uniquement sur la base de leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Elle consiste à une séparation réalisée en conditions dénaturantes en raison de la présence de SDS et du β-mercaptoéthanol. Ce dernier exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui dissocie les sous unités des protéines. Le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée, avec laquelle il interagit avec les protéines en un rapport molaire constant, et une extrémité chargée négativement. Les protéines enrobées au SDS sont donc dénaturées ayant toutes une charge apparente négative. A cet égard, le facteur charge électrique des protéines n'est plus mis en jeu et donc seul le facteur masse molaire influencera la migration. En appliquant un champ électrique, toutes les protéines migreront vers l'anode (électrode positive) avec différentes vitesses, plus le poids moléculaire est élevé plus la migration est lente et vice versa. L'acrylamide polymérisé (polyacrylamide)

constitue une matrice en forme de maille adaptée à la séparation de protéines de taille typique (Matsumoto et al., 2019).

Mode opératoire

Cette technique nécessite une cuve à électrophorèse, un générateur électrique, un gel de polyacrylamide, des solutions tampons adaptés au gel, une solution de coloration, une préparation des échantillons et un système d'imagerie pour l'analyse des résultats.

Avant de lancer la migration, les échantillons ont été dénaturés par la chaleur en présence du tampon de charge (voir annexe 3). Puis, 50 µL de chaque échantillon ont été déposés délicatement dans les puits. 5 µL du marqueur de taille ont été déposés aussi. A la fin de la migration, le gel de polyacrylamides est récupéré et coloré par le bleu de Coomassie, puis décoloré dans l'eau jusqu'à diaphanisation totale du fond du gel. Finalement, le gel a été photographié sur le Gel Doc System (Gel Doc XR^+, BioRad®) et les données numériques ont été traitées sur le logiciel Image Lab™ version 5.1 (BioRad®).

6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Matériel biologique

L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été réalisée sur 50 rats albinos mâles de souche Wistar ayant un poids moyen de 275 ± 25 g et âgés de 3 à 4 mois. Les animaux ont été répartis aléatoirement en 10 lots homogènes de 5 rats chacun, puis laissés en acclimatation pendant 7 jours dans les conditions de laboratoires (température 22 ± 2 °C, cycle photopériodique (lumière/obscurité) de 12 heures et une humidité relative de 50 ± 5 %) et un accès libre à l'aliment et l'eau.

Principe

L'activité anti-inflammatoire des extraits de pollen d'abeille a été évaluée *in vivo* par le test d'œdème de la patte induit par le formaldéhyde chez les rats (Arzi et al., 2015). Ce test est basé sur l'induction d'une inflammation aigüe dans la patte postérieure du rat par l'administration d'un agent phlogistique, le formaldéhyde, qui provoque une exsudation. Cette dernière peut être inhibée par une pré-administration d'une substance douée de propriétés anti-inflammatoires. L'activité anti-inflammatoire des extraits est déterminée par mesure et suivie de l'évolution du gonflement. Plus ce dernier est important plus l'activité anti-inflammatoire est faible.

Mode opératoire

Apres une période de jeûne de 12 heures, les rats de chaque lot ont reçu les différents traitements par voie intrapéritonéale (I.P.) :

- le lot 1 : de l'eau physiologique (5 mL/Kg) et considéré comme contrôle négatif ;
- le lot 2 : le médicament anti-inflammatoire (Diclofénac) à la dose de 20 mg/Kg du poids corporel vivant et considéré comme molécule de référence ;
- les lots 3 à 10 : les différents extraits de pollen à la dose de 200 mg/Kg du poids corporel vivant.

Trente minutes plus tard, l'inflammation sera induite par une injection de 100 µL de la solution du formaldéhyde à 1% au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite chez tous les rats (Figure 10).

Le volume de la patte a été mesuré avant et après l'induction de l'inflammation à T0, T+30, T+60, T+120, T+180, T+240 (0, 30, 60, 120, 180 et 240 minutes respectivement) par un pléthysmomètre à déplacement d'eau (Fereidoni et al., 2000). Les résultats (% du gonflement) sont exprimés en moyenne du pourcentage d'augmentation du volume de la patte selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'augmentation du volume} = \left[\frac{V_t - V_i}{V_i}\right] \times 100$$

V_i : le volume initial de la patte (avant injection du formaldéhyde)

V_t : le volume de la patte après injection du formaldéhyde aux différents points de temps.

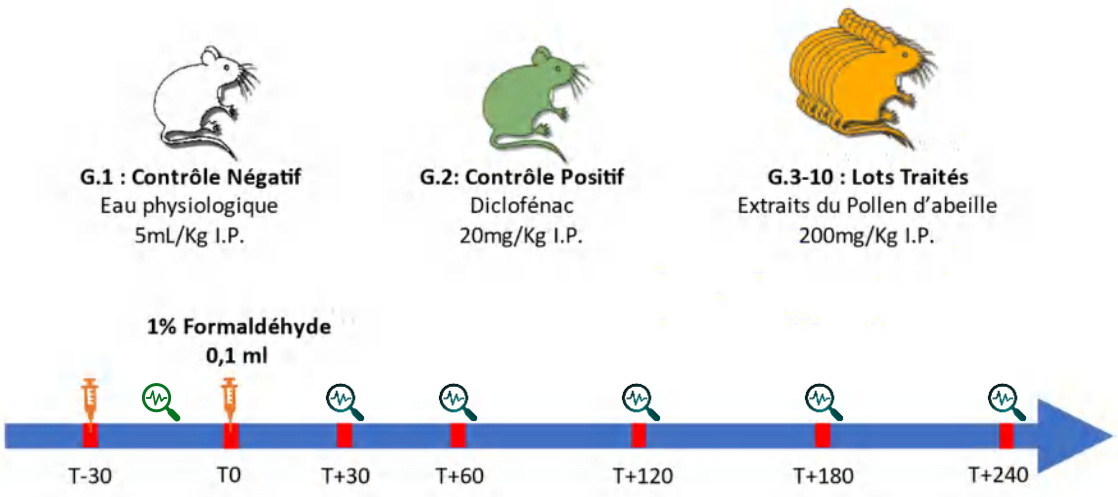


Figure 10. Protocole expérimental de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*.

7. Evaluation de l'activité anti-allergique *in vivo*

7.1. Matériel biologique

L'activité anti-allergique *in vivo* a été réalisée sur 20 rattes albinos femelles de souche Wistar ayant un poids moyen de 110 ± 10 g et âgées de 4 à 5 semaines. Les animaux ont été répartis aléatoirement en 4 lots homogènes de 5 rats chacun.

7.2. Principe

L'activité anti-allergique de l'extrait de pollen d'abeille collecté de la région de Jijel a été évaluée *in vivo* sur un modèle animal d'allergie au pollen d'abeille. Ce modèle a été inspiré et développé à partir d'un modèle animal d'allergie respiratoire aigüe induite par l'ovalbumine (OVA) chez le rat (Yasar et al., 2016). L'induction de ce modèle est basée sur deux étapes, la première, une étape de sensibilisation des rats à l'ovalbumine et au pollen, puis, la deuxième étape d'induction de la réaction allergique. L'intensité de la réaction allergique a été évaluée macroscopiquement par un contrôle des symptômes de l'allergie respiratoire puis par un dosage des protéines sériques par électrophorèse capillaire et est confirmée par une analyse histologique des poumons.

7.3. Mode opératoire

7.3.1. Développement du modèle

Le modèle animal d'allergie respiratoire aux protéines de pollen d'abeille a été développé, chez les rats, en deux phases :

a. **immunisation :** pour les deux premières semaines, les rats ont reçu une administration intrapéritonéale de l'ovalbumine (Sigma Aldrich) à une dose de 10 mg/mL et une dose de 2 mg/Kg de protéines du pollen d'abeilles ;
b. **sensibilisation :** l'induction de la réaction allergique a été effectuée par une administration intranasale de 10 µL de pollen d'abeille pendant quatre jours.

7.4. Le déroulement de l'expérimentation

Les 20 rattes ont été réparties en 4 lots (Figure 11) :

- lot 1 : groupe témoin négatif, les rattes n'ont reçu aucun traitement ;
- lot 2 : les rattes ont reçu une administration par voie orale de l'extrait éthanolique du pollen d'abeille collecté de la région de Jijel à une dose de 200 mg/Kg pendant 4 jours consécutifs ;
- lot 3 : les rattes ont suivi le protocole de développement d'allergie (expliqué ci-dessus) ;

- lot 4 : les rats ont suivi le protocole de développement d'allergie combiné à une administration par voie orale de l'extrait éthanolique du pollen d'abeille à une dose de 200 mg/Kg pendant 4 jours consécutifs débutée avec la phase de provocation.

A la fin du traitement, tous les rats ont été disséqués. Le sang a été récupéré dans des tubes héparinés, puis le plasma est récupéré et conservé au congélateur à – 20 °C. Les poumons ont été prélevés et fixés au formaldéhyde 10 %.

7.5. Evaluation de l'effet anti-allergique de l'extrait du pollen

L'activité anti-allergique a été évalué sur trois échelles : macroscopiquement par un contrôle des symptômes d'allergie respiratoire, une analyse du taux des protéines sériques dans le sang par électrophorèse capillaire et microscopiquement par une étude histologique des poumons.

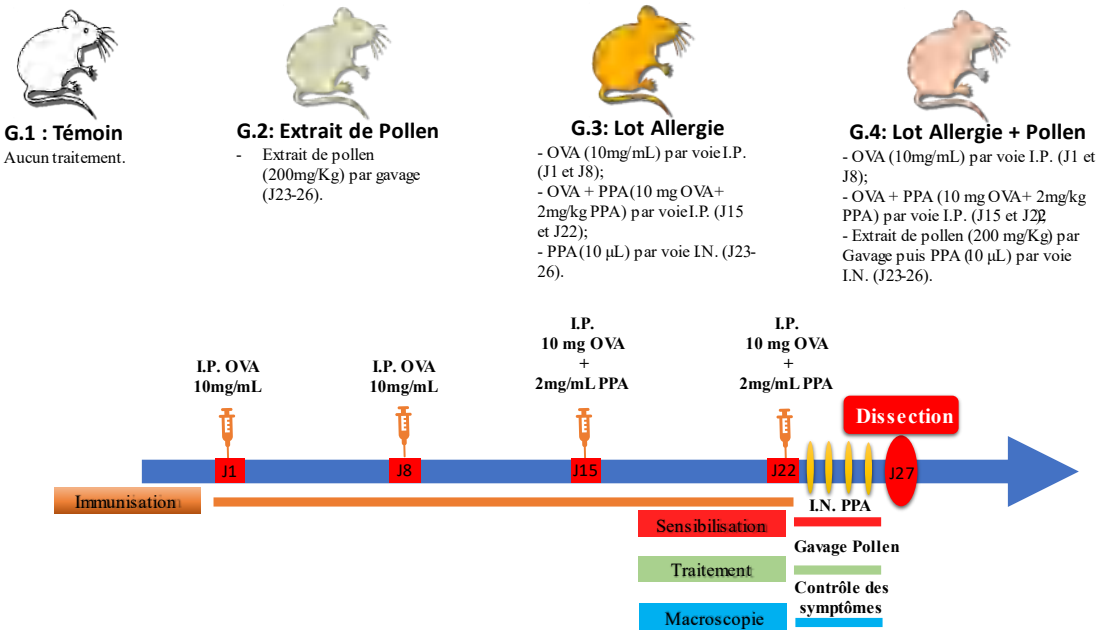


Figure 11. Protocole expérimental de l'activité anti-allergique *in vivo*.

I.P. : Intrapéritonéal, I.N. : Intranasale,OVA : Ovalbumine, PPA : Protéines du Pollen d'Abeille

7.5.1. Contrôle des symptômes

Une observation macroscopique des symptômes d'allergie respiratoire a été réalisée chez les rattes des lots 3, 4 après chaque sensibilisation, par les protéines du pollen d'abeille pour une durée d'une heure. Le score ou le stade d'allergie de chaque rat est attribué en fonction de l'échelle de symptômes suivante :

1) aucun symptôme ;
2) grattement autour du nez et de la tête ;
3) poches autour des yeux et de la bouche ;
4) <respiration difficile et/ou cyanose autour de la bouche et de la queue ;
5) aucune activité après ou tremblement et convulsion ;
6) décès.

7.5.2. Analyse de protéines totaux par électrophorèse capillaire

L'électrophorèse des protéines sériques a été réalisée à l'aide de l'électrophorèse capillaire SEBIA. Cette dernière sépare les protéines sériques principalement en 6 fractions (Figure 12) :

- l'albumine ;
- l'alpha1 globuline ;
- l'alpha 2 globuline ;
- la Bêta 1 globulin ;
- la Bêta 2 globuline ;
- la gammaglobuline.

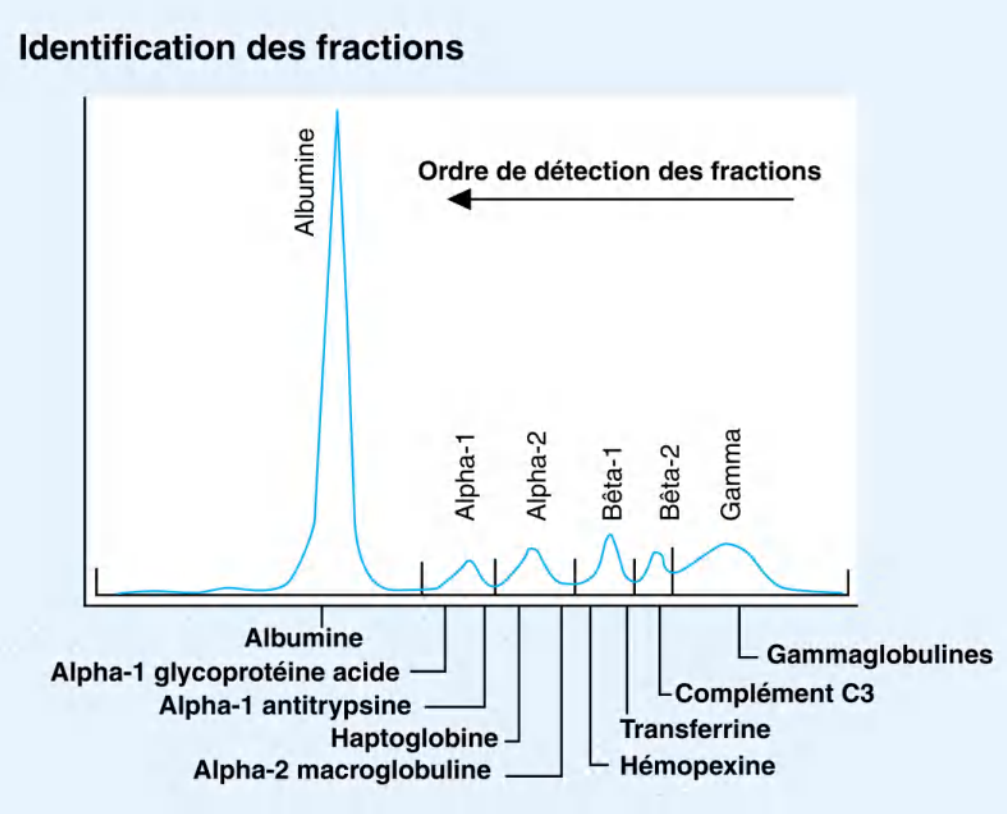


Figure 12. Profil d'électrophorèse des protéines sériques obtenu par électrophorèse capillaire (Szymanowicz et al., 2006)

Les proportions relatives des différentes fractions sont de bon indicateur dans le diagnostic et le pronostic de certaines pathologies inflammatoires, hépatiques ou hématologiques (Cellier et al., 2018).

7.6. Etude histologique

Les poumons des rats ont été explorés microscopiquement. La préparation des échantillons jusqu'à obtention de lames histologiques prêtes à observer sous microscope optique passe par les étapes suivantes :

a) **déshydratation :** cette étape vise à éliminer la totalité de l'eau des cellules. Les fragments de poumons coupés, fixés, mis en cassettes marquées ont été déshydratés suite à un passage dans 5 bains d'alcool d'une concentration croissante (éthanol 50 °, 60 °, 75 °, 90 ° et 100 °) pour une durée de 2 heures chacun ;
b) **imprégnation :** cette manipe à pour objectif de remplacer le liquide intracellulaire par le xylène, un solvant intermédiaire qui favorise l'élimination de l'éthanol d'une part et d'autre part la pénétration de la paraffine. Les échantillons déshydratés ont subi 3 bains de xylène pour une durée d'une heure chacun.

c) **inclusion :** cette étape permet d'introduire aux cellules une matière qui est à la fois rigide pour garder la structure cellulaire initiale et tendre pour permettre la réalisation de coupes fines. Les échantillons imprégnés de xylène ont été passés par 2 bains de paraffine fondue (à 55 C°) pour une durée de 3 heures chacun ;

d) **réalisation des coupes :** l'intérêt de cette phase est d'obtenir des rubans fins d'échantillon d'une épaisseur entre 2 et 5 µm. A la fin de l'inclusion, les échantillons ont été mis en bloc. Les échantillons ont été coulés sur le dos de la cassette par la paraffine liquide dans un moule en métal appelé « Barres de Leuckart ». Les blocs sont ensuite refroidis. Finalement, les blocs de paraffine dur ont été placés dans le microtome afin de confectionner des sections sous forme de ruban réguliers. Ces derniers sont récupérés et déposés sur des lames de microscopes en verre.

e) **déparaffinage :** cette étape assure l'élimination de la paraffine (hydrophobe) afin de préparer les lames à la coloration (par des colorants à base d'eau). Les lames ont été mises dans l'étuve overnight à 55 C° ;

f) **réhydratation :** le but de cette étape est d'hydrater les cellules. Les lames ont été placées dans un bain de xylène, puis dans des bains d'alcool à une concentration décroissante (éthanol 100 °, 90 °, 75 °, 60 ° et 50 °) et enfin dans l'eau distillée pendant 2 heures ;

g) **Coloration et montage :** l'objectif de cette phase est d'augmenter le contraste afin de permettre une différentiation idéale entre les différents constituants tissulaires. Une double coloration par l'hématoxyline et l'éosine (HR) a été choisie. Les lames ont été mises dans un bac d'hématoxyline pendant 5 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, les lames ont été placées dans un bac d'éosine pendant 3 minutes. Ensuite, les lames ont été rincées avec de l'eau distillé, puis, réintroduites dans deux bacs d'alcool d'une concentration croissante (éthanol 70 ° et 100 ° respectivement) pendant 5 minutes chacun, avant de passer dans un bac de xylène pendant 10 minutes.

   Les coupes histologiques colorées sont montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage EUKITT®.

h) **Observation**

   Les lames histologiques ont été observées par un microscope numérique (microscope optique équipé d'une caméra). L'observation a été réalisée avec les grossissement x40, x100 et x 400.

8. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en au moins trois répétions les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart type (Moy. ± E.T.).

L'analyse de la variance univariée par le test ANOVA à un facteur a été utilisée pour vérifier l'homogénéité des échantillons de pollen et entre les différents groupes expérimentaux. Le test des étendues de Tukey a été utilisé comme test de comparaisons multiples (post-hoc) pour déterminer les différences significatives entre les moyennes de groupes. Le seuil de signification est fixé à 5 % ($p < 0,05$).

L'analyse en composantes principales (ACP, *Principal Component Analysis* ou PCA) a été utilisée pour vérifier les relations entre les origines botaniques et les composants phénoliques et l'activité anti-inflammatoire de pollen d'abeille. L'ACP a été effectuée aussi pour déterminer la relation entre différents tests antioxydants utilisés.

Pour toutes les ACPs réalisées, l'analyse a été réalisée sur une matrice de covariance, la méthode de rotation d'analyse factorielle est déterminée par la méthode Varimex et le nombre de facteurs extraits est fixé à 2 composantes principales (CP1 et CP2).

La régression sur les composantes principales (RCP, *Principal Component Regression*) a été utilisée sur les deux composantes principales de l'ACP des tests antioxydants.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS Statistics 23.0 (IBM® SPSS Inc.).

Résultats

Résultats

1. Analyse palynologique

L'analyse palynologique révèle que tous les échantillons de pollen sont hétérofloraux. Au total, 40 types de pollen appartenant à 20 familles botaniques ont été identifiés et les plus représentées sont Asteraceae (8 types), Brassicaceae (4 types), Cistaceae, Fabaceae et Fagaceae (3 types respectivement) (Tableau 3 et annexe 4).

Le type omniprésent dans tous les échantillons est *Cistus* et les autres types comme *Bellis*, *Boraginaceae*, *Bryonia*, *Buxus*, *Centaurea*, *Cerinthe major*, *Convolvulus*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fraxinus*, *Galactites*, *Helianthemum*, *Juglans*, *Myrtus communis*, *Oxalis*, *Poaceae*, *Quercus suber*, *Raphanus*, *Rhamnus*, *Sonchus*, *Verbenaceae*, *Vicia* et *Vitex ne* sont détectés que dans un seul échantillon.

Pour l'échantillon de Constantine, 8 différents types de pollen sont identifiés, dont *Brassicaceae* et *Cistus* sont les plus fréquents. 12 types de pollen sont également constatés dans l'échantillon de Guelma sans aucun type fréquent. Le type *Pistacia lentiscus* est le plus représenté parmi un total de 10 différents types de pollen identifiés dans l'échantillon de Boumerdès.

Dans l'échantillon de Sétif, les types *Cistus* et *Quercus* sont les plus nombreux (parmi les 9 différents types de pollen enregistrés). Il a été constaté que le type *Quercus est le plus* fréquent dans l'échantillon de Jijel.

Le type *Brassica* est le plus fréquent dans les échantillons des Skikda et Khenchela sur un total de 14 et 7 types identifiés respectivement. L'échantillon de Tizi Ouzou est caractérisé par une prédominance de 3 types *Bryonia*, *Cistus* et *Quercus ilex*.

Même si la famille Asteraceae est la plus diversifiée, elle ne représente que 5.25% du total des types polliniques identifiés. Les familles les plus abondantes dans les huit échantillons sont :

- la famille *Brassicaceae*, avec ses quatre types de pollen, ne représente que 23.15% du total des types de pollen identifiés ;
- la famille *Anacardiaceae* représente 15.53% des types de pollen identifiés, elle est notée par la présence d'un seul type *Pistacia lentiscus* ;
- la famille Cistaceae avec ses trois types de pollen constitue 14.99% ;
- la famille Fagaceae avec ses trois types identifiés est de 14.10% du total des types de pollen identifiés.

Tableau 3. Les fréquences d'occurrence des différents types de pollen enregistrées dans les 8 échantillons de pollen d'abeille collectés du Nord Algérien.

(*F : Fréquent*, *P.F. : Peu Fréquent*, *R : Rare*)

Famille	Type de pollen	Echantillon (%)							
		Constantine	Guelma	Boumerdès	Sétif	Jijel	Skikda	Khenchela	Tizi Ouzou
Anacardiaceae	***Pistacia lentiscus*** type	-	R. 9.12%	F. 45.70%	-	-	P.F. 14.97%	F. 43.04%	P.F. 11.46%
Asteraceae	***Anthemis*** type	-	-	R. 0.17%	-	-	R. 0.66%	R. 0.72%	-
	Bellis type	-	-	-	-	-	-	-	R. 0.83%
	Carduus type	-	-	R. 0.33%	-	R. 0.18%	R. 0.49%	-	-
	Centaurea type	-	-	-	-	P.F. 19.85%	-	-	-
	Cichorium type	-	-	-	-	-	R. 0.33%	R. 0.36%	R. 0.66%
	Galactites type	P.F. 10.07%	-	-	-	-	-	-	-
	Picris type	-	R. 5.34%	-	R. 0.64%	R. 0.72%	-	-	-

	Sonchus type	R. 0.72%	-	-	-	-	-	-	-
Boraginaceae	***Boraginaceae*** type	-	-	-	-	-	-	-	R. 2.49%
	Cerinthe major type	-	-	P.F. 19.25%	-	-	-	-	-
Brassicaceae	***Brassica*** type	-	-	R. 4.51%	R. 5.14%	-	F. 30.60%	F. 41.96%	P.F. 13.95%
	Brassicaceae type	F. 39.76%	P.F. 10.53%	-	P.F. 12.05%	-	R. 3.95%	-	-
	Other Brassicaceae type	-	-	-	-	R. 3.43%	-	P.F. 12.11%	R. 3.99%
	Raphanus type	-	-	-	-	-	R. 3.29%	-	-
Buxaceae	***Buxus*** type	-	R. 7.07%	-	-	-	-	-	-
Cistaceae	***Cistus*** type	F. 21.40%	P.F. 16.20%	R. 1.64%	F. 24.30%	R. 3.97%	R. 9.55%	R. 0.36%	F. 20.10%
	Halimium type	-	R. 9.90%	-	-	R. 3.43%	R. 2.96%	-	-
	Helianthemum type	-	R. 5.97%	-	-	-	-	-	-

Convolvulaceae	***Convolvulus*** type	-	-	-	-	-	-	-	R. 5.81%
Cucurbitaceae	***Bryonia*** type	-	-	-	-	-	-	-	F. 20.61%
	Cucurbitaceae type	-	-	-	-	R. 3.79%	-	-	-
Ericaceae	***Erica arborea*** type	-	-	R. 6.03%	-	-	R. 4.28%	-	-
Euphorbiaceae	***Euphorbiaceae*** type	-	-	-	-	P.F. 19.68	-	-	-
Fabaceae	***Fabaceae*** type	-	P.F. 18.88%	R. 8.49%	P.F. 13.18%	-	-	R. 1.45%	-
	Lotus type	-	R. 5.19%	-	-	-	-	-	-
	Vicia type	-	-	-	-	R. 7.04%	-	-	-
Fagaceae	***Quercus ilex*** type	R. 1.08%	-	-	R. 8.84%	-	R. 5.26%	-	F. 20.10%
	Quercus suber type	-	R. 2.99%	-	-	-	-	-	-
	Quercus type	P.F. 10.07%	R. 4.25%	-	F. 20.74%	F. 22.92%	P.F. 16.43%	-	-

Juglandaceae	***Juglans*** type	-	-	-	R. 7.88%	-	-	-	-
Lamiaceae	***Vitex*** type	R. 5.57%	-	-	-	-	-	-	-
Myrtaceae	***Myrtus communis*** type	-	-	R. 2.78%	-	-	-	-	-
Oleaceae	***Fraxinus*** type	-	-	-	-	R. 2.17%	-	-	-
Oxalidaceae	***Oxalis*** type	-	-	-	R. 7.23%	-	-	-	-
Papaveraceae	***Papaver*** type	P.F. 11.33%	-	-	-	R. 2.53%	-	-	-
Poaceae	***Poaceae*** type	-	-	-	-	-	R. 3.78%	-	-
Rhamnaceae	***Rhamnus*** type	-	R. 4.56%	-	-	-	-	-	-

Rosaceae	***Rosaceae*** type	-	-	P.F. 11.10%	-	-	R. 3.45%	-	-
Verbenaceae	***Verbenaceae*** type	-	-	-	-	P.F. 10.29%	-	-	-
Nombre des types de pollen		8	12	10	9	13	14	7	10

2. Etude phytochimique des extraits de pollen d'abeille

2.1.Composants phénoliques

Le dosage des composés phénoliques des 8 extraits de pollen indique une différence statistiquement significative entre la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et flavonols totaux.

2.1.1. Teneurs en polyphénols totaux (TPT)

Les résultats montrent que les taux les plus élevés en polyphénols sont enregistrés dans l'extrait de Sétif, avec une valeur égale à 122.47 ± 1.03 µg EAG/mg, suivi par l'extrait de Khenchela (90.50 ± 1.79 µg EAG/mg), les extraits de Boumerdès et de Jijel (78.54 ± 1.30 et 75.41 ± 2.05 µg EAG/mg respectivement). Puis, les extraits de Skikda, Tizi Ouzou et Guelma (64.82 ± 1.55, 61.78 ± 1.45 et 59.13 ± 1.91 µg EAG/mg respectivement). Enfin, le taux le plus faible (7.52 ± 0.77 µg EAG/mg) est constaté dans l'extrait de Constantine (Tableau 4).

Tableau 4 . Teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille.

	Constantine	**Guelma**	**Boumerdès**	**Sétif**	**Jijel**	**Skikda**	**Khenchela**	**Tizi Ouzou**
TPT (µg EAG/mg)	7.52 ± 0.77 ^{e}	59.13 ± 1.91 ^{d}	78.54 ± 1.30 ^{c}	122.47 ± 1.03 ^{a}	75.41 ± 2.05 ^{c}	64.82 ± 1.55 ^{d}	90.50 ± 1.79 ^{b}	61.78 ± 1.45 ^{d}

** (n=3 ; a,b,c… sont significativement différentes (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)*

2.1.2. Teneurs en flavonoïdes totaux (TFT)

Le dosage des flavonoïdes révèle une différence entre les différents extraits de pollen d'abeille (Tableau 5). L'extrait de Sétif est le plus riche en flavonoïdes (85.06 ± 1.56 µg EQ/mg), suivi des extraits de Khenchela (60.76 ± 0.20 µg EQ/mg), de Boumerdès (52.01 ± 0.78 µg EQ/mg), de Skikda (49.65 ± 2.72 µg EQ/mg), de Jijel (48.47 ± 3.61 µg EQ/mg) et de Tizi Ouzou (43.47 ± 2.72 µg EQ/mg). Les extraits ayant une faible teneur en flavonoïdes sont ceux de Constantine et de Guelma : 26.94 ± 2.25 et 26.80 ± 0.12 µg EQ/mg respectivement.

Tableau 5. Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille.

	Constantine	**Guelma**	**Boumerdès**	**Sétif**	**Jijel**	**Skikda**	**Khenchela**	**Tizi Ouzou**
TFT (µg EQ/mg)	26.94 ± 2.25 ^{e}	26.80 ± 0.12 ^{e}	52.01 ± 0.78 ^{c}	85.06 ± 1.56 ^{a}	48.47 ± 3.61 ^{c,d}	49.65 ± 2.72 ^{c}	60.76 ± 0.20 ^{b}	43.47 ± 2.72 ^{d}

** (n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)*

2.1.3. Teneurs en flavonols totaux (TFlT)

Les extraits les plus abondants en flavonols sont ceux de Sétif (79.03 ± 0.24 µg EQ/mg), Tizi Ouzou (74.85 ± 5.44 µg EQ/mg), Jijel (74.06 ± 1.71 µg EQ/mg), Boumerdès (69.50 ± 3.17 µg EQ/mg) et Khenchela (62.08 ± 4.30 µg EQ/mg). Les extraits renfermant les taux les plus faibles sont ceux de Skikda (57.44 ± 5.04 µg EQ/mg), Constantine (50.58 ± 1.21 µg EQ/mg) et Guelma (49.78 ± 3.33 µg EQ/mg). (Tableau 6).

Tableau 6. Teneurs en flavonols totaux des extraits éthanoliques du pollen d'abeille.

	Constantine	**Guelma**	**Boumerdès**	**Sétif**	**Jijel**	**Skikda**	**Khenchela**	**Tizi Ouzou**
TFlT (µg EQ/mg)	50.58 ± 1.21 ^{d}	49.78 ± 3.33 ^{d}	69.50 ± 3.17 ^{a,b}	79.03 ± 0.24 ^{a}	74.06 ± 1.71 ^{a}	57.44 ± 5.04 ^{c,d}	62.08 ± 4.30 ^{b,c}	74.85 ± 5.44 ^{a}

** (n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)*

2.2. Profil phénolique du pollen d'abeille

L'analyse des extraits de pollen par LC-MS indique que les profils phénoliques des 8 extraits sont très variés sur les plans qualitatif et quantitatif (Tableau 7).

Parmi les 14 standards chimiques utilisés, 3 composés sont omniprésents dans tous les extraits : l'acide hydroxy benzoïque, l'acide caféique et la naringine. La vanilline et l'acide férulique sont détectés dans 7 échantillons. Alors que, la catéchine, la rutine et la coumarine sont présentes dans 6 extraits. L'acide cinnamique, l'acide gallique, la fisétine, la quercétine et la génistéine apparaissent dans quelques extraits. Cependant, la myricétine est absente dans tous les extraits.

Dans l'extrait de Constantine, 8 composés sont retrouvés parmi les 14 polyphénols étudiés, dont la quercétine (2.24 µg/mg) et la rutine (1.31 µg/mg) sont les composantes majoritaires.

Pour les extraits de Guelma, Tizi Ouzou et Skikda 7 composés sont détectés. La catéchine et l'acide hydroxy benzoïque représentent les composants abondants dans les deux premiers extraits. Alors que la rutine est riche dans l'extrait de Skikda avec une concentration de (4.12 µg/mg).

Dans l'extrait de Boumerdès, 8 composés sont identifiés. Les phénols majoritaires sont la fisétine (3.61 µg/mg) et la naringine (1.13 µg/mg).

Un profil phénolique identique est constaté entre les extraits de Sétif et de Jijel formé de 9 composés avec différentes proportions. La composante majoritaire dans ces extraits est la rutine (4.36 et 6.90 µg/mg pour les extraits de Sétif et Jijel respectivement)

Bien que, 11 composés sont repérés dans l'extrait de Khenchela, la rutine et l'acide hydroxy benzoïque sont les deux composants majoritaires (4.98 et 1.38 µg/mg respectivement).

Tableau 7. Profile phénolique des extraits de pollen d'abeille.

(*TR. Temps de Rétention ; MM. Masse Molaire; M/z. Masse / nombre de charge; ND. Non-détecté*)

Composants	**TR** (min)	**MM** (m/z)	**[M–H]⁻** (m/z)	**[M+ H]⁺** (m/z)	**Constantine** (µg/mg)	**Guelma** (µg/mg)	**Boumerdès** (µg/mg)	**Sétif** (µg/mg)	**Jijel** (µg/mg)	**Skikda** (µg/mg)	**Khenchela** (µg/mg)	**Tizi Ouzou** (µg/mg)
Acide gallique	4.377	170	171	169	0.497379	ND	ND	ND	ND	ND	0.060875	ND
Catéchine	5.672	290	291	289	ND	0.979382	0.070305	0.611247	0.566239	ND	0.344544	2.461093
Acide hydroxy benzoïque	7.072	138	139	ND	0.715307	0.933785	0.979433	0.725997	0.264892	1.008105	1.378979	1.108051
Acide caféique	7.547	180	181	179	0.127727	0.100354	0.113596	0.086489	0.112943	0.070938	0.071758	0.121806
Rutine	9.083	610	611	609	1.308557	ND	ND	4.360579	6.901408	4.121672	4.983713	3.346309
Vanilline	9.745	152	153	ND	0.084444	0.022234	0.650853	0.027245	0.198406	0.924832	0.106699	ND
Acide férulique	10.491	194	195	ND	0.397654	0.067072	ND	0.021757	0.017897	0.332210	0.011889	0.019962
Coumarine	10.499	146	147	ND	ND	ND	0.998520	0.051625	0.083174	0.306016	0.016671	0.109948

Composants	**TR** (min)	**MM** (m/z)	**[M–H]**$^-$ (m/z)	**[M+ H]**$^+$ (m/z)	**Constantine** (µg/mg)	**Guelma** (µg/mg)	**Boumerdès** (µg/mg)	**Sétif** (µg/mg)	**Jijel** (µg/mg)	**Skikda** (µg/mg)	**Khenchela** (µg/mg)	**Tizi Ouzou** (µg/mg)
Naringine	11.075	580	581	ND	0.172019	0.127713	1.132433	0.471956	0.719684	0.113400	0.030400	0.405485
Fisétine	12.921	286	287	285	ND	ND	3.606626	ND	ND	ND	0.965503	ND
Myricétine	14.699	318	319	317	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acide cinnamique	20.224	148	149	ND	ND	0.194514	0.022536	0.033566	0.039635	ND	ND	ND
Quercétine	20.531	302	303	ND	2.237531	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Génistéine	27.033	270	ND	269	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.039008	ND

2.3. Analyse de la relation entre l'origine botanique et la teneur en polyphénols

Afin de déterminer la relation entre l'origine botanique de pollen et la teneur en composants phénoliques, les résultats de l'identification palynologique et des dosages des composants phénoliques ont été analysés statistiquement par l'ACP. Sur un total de 43 variables analysées (types de pollen, TPT, TFT et TFlT), l'ACP indique que les deux premières composantes principales (CP1 et CP2) représentent 73.50 % de la variance totale.

La première composante principale (CP1) est de 53.48 % et représente les coefficients de corrélation positives les plus élevés avec les composants phénoliques (TPT : 0.989, TFT : 0.913 et TFlT : 0.707).

La CP2 (20.02 % de la variance totale) a montré des coefficients de corrélations positives avec quelques types de pollen (*Quercus* Type : 0.757, *Cistus* Type : 0.682, *Juglans* Type : 0.624 et *Oxalis* Type : 0.624). Les variables ayant des coefficients de corrélations forts apparaissent ensemble sur le biplot (Figure 16).

En se focalisant sur la CP1 et suite à la forte corrélation statistique enregistrée entre ces types de pollen et les composants phénoliques (Juglans et Oxalis types ↔ TPT : 0.651, Juglans et Oxalis types ↔ TFT : 0.772 et Juglans et Oxalis types ↔ TFlT : 0.501), on constate que la présence des types de pollen *Juglans* et *Oxalis* est corrélée à une forte teneur en polyphénols dans un échantillon de pollen d'abeille.

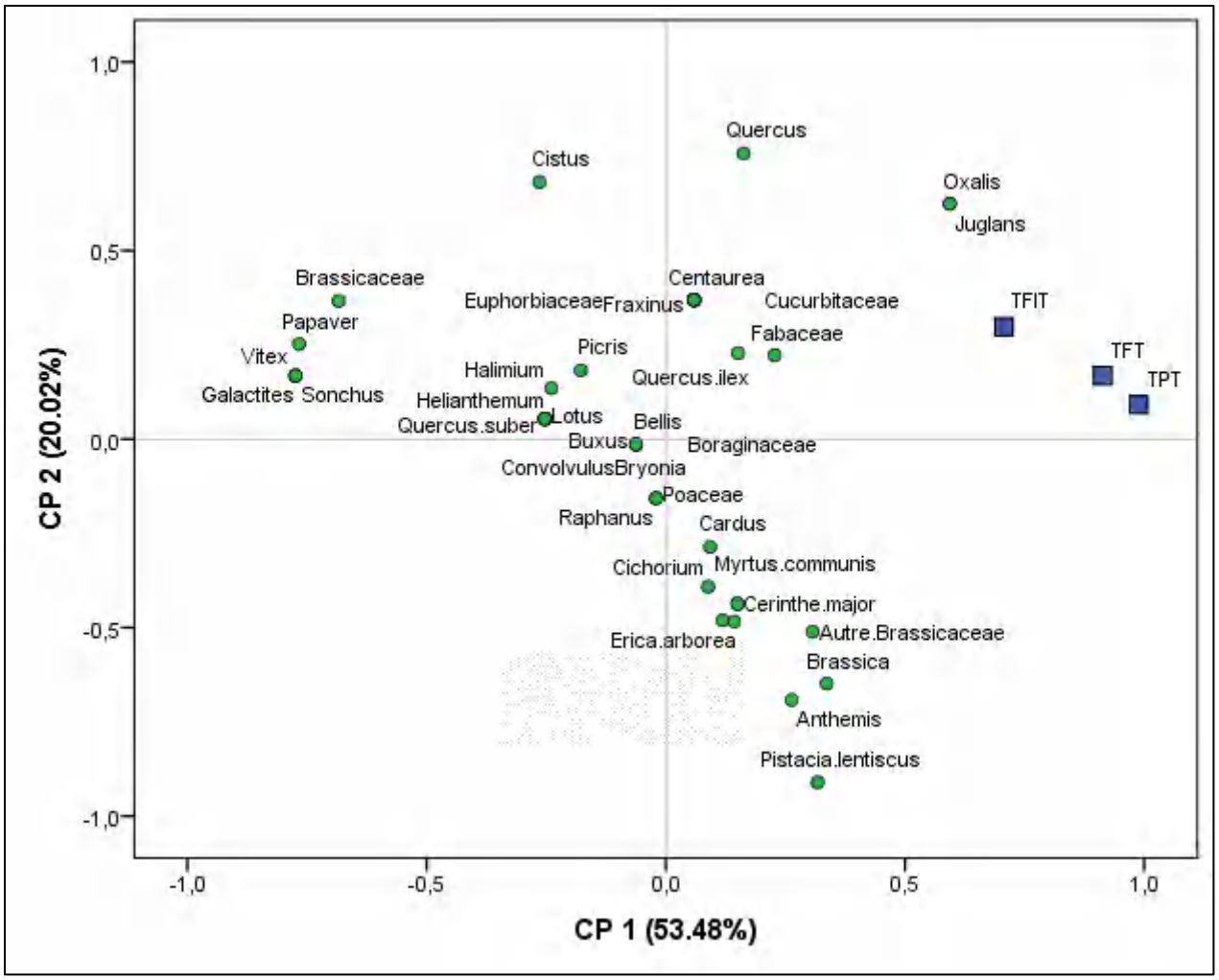


Figure 13. Projection des variables (Types de pollen et composants phénoliques) sur les composantes principales (CP1 et CP2).

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

En raison de la composition très variée des échantillons de pollen d'abeille et pour mieux estimer le pouvoir antioxydant des extraits, 8 méthodes complémentaires ont été utilisées.

3.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au DPPH

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits par la méthode DPPH montre, d'une part, la capacité du pollen d'abeille à réduire le radical DPPH°, et d'autre part la grande différence entre les pouvoir antioxydants des échantillons. La meilleure activité est notée avec l'extrait de Tizi Ouzou avec une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) égale à 62.77 ±1.08 µg/mL, suivi des extraits de Jijel (CI_{50} = 113.14 ±1.56 µg/mL), de Skikda (CI_{50} = 130.50 ±2.36 µg/mL), de Khenchela (CI_{50} = 159.84 ±1.42 µg/mL), de Boumerdès (CI_{50} = 194.85 ±1.25 µg/mL) et de Sétif (CI_{50} = 214.62 ±1.99 µg/mL). Les extraits ayant la plus faible activité antiradicalaire sont

ceux de Guelma (CI_{50} = 224.79 ±2.02 µg/mL) et de Constantine (CI_{50} = 382.92 ± 2.45 µg/mL). Cependant, les activités antiradicalaires des standards testés restent significativement supérieures à celles des extraits (Figure 14).

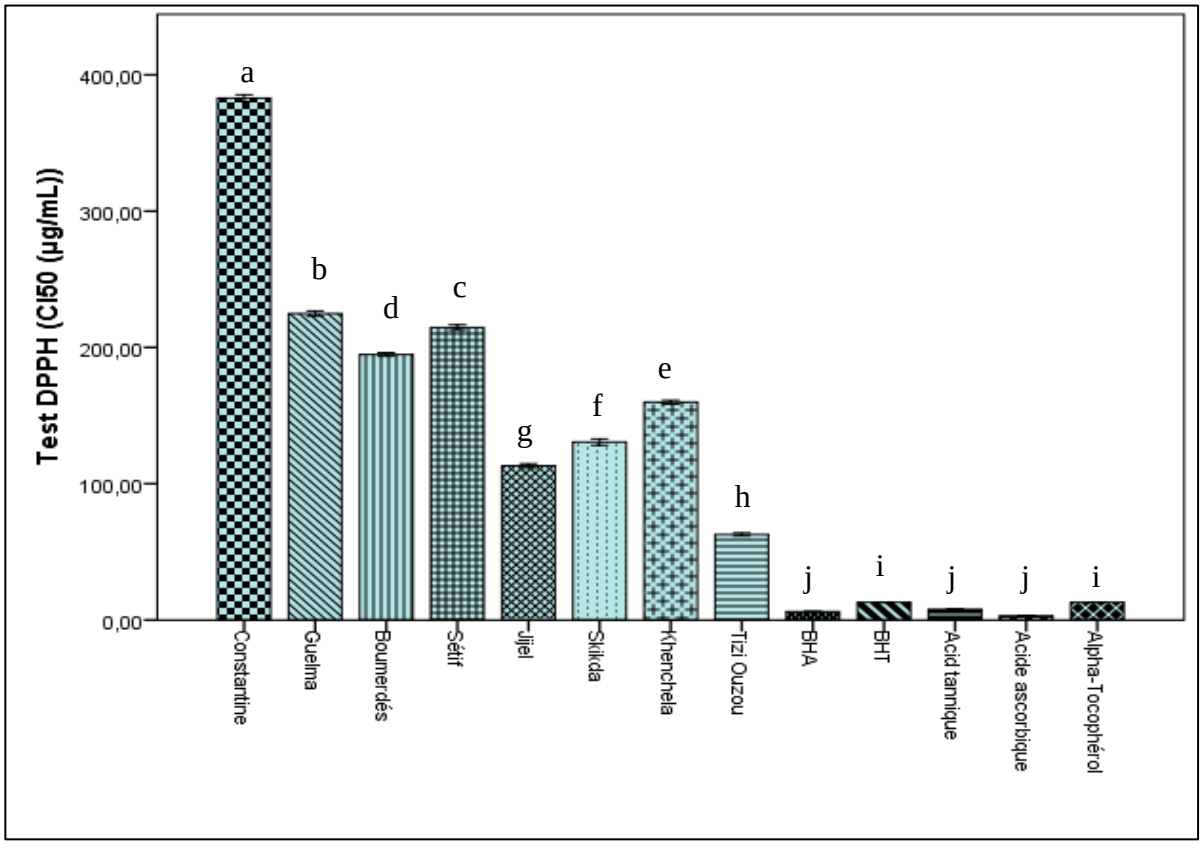


Figure 14. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test DPPH. (*n=3 ; a,b,c… sont significativement différentes (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à l'ABTS

La meilleure activité antioxydante selon la méthode à l'ABTS est obtenue avec l'extrait de Sétif avec une CI_{50} = 23.74 ± 0.47 µg/mL, suivie par celle des extraits de Constantine (CI_{50} = 31.66 ± 0.50 µg/mL) et de Guelma (CI_{50} = 42.93 ± 1.65 µg/mL). L'activité antioxydante la plus faible est constatée avec l'extrait de Jijel avec une CI_{50} = 92.74 ± 1.46 µg/mL (Figure 15). Toutefois, toutes les capacités de piégeage du radical $ABTS^{\circ+}$ des extraits testés restent très faibles comparativement aux capacités antioxydantes des standards utilisés.

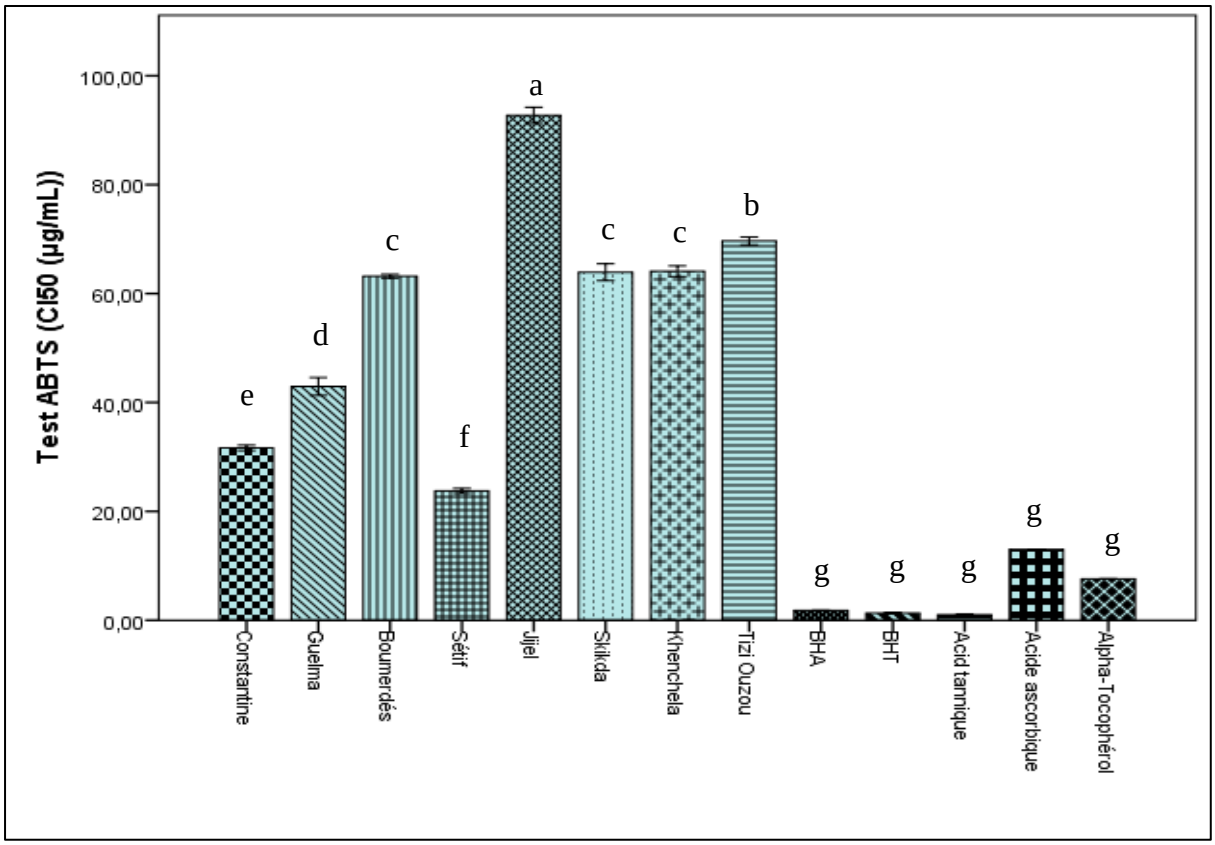


Figure 15. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test à l'ABTS.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05), Test ANOVA et Tukey*)

3.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test CUPRAC

La réduction du cuivre par le test CUPRAC révèle que l'extrait de Khenchela possède le meilleur pouvoir réducteur avec une absorbance médiane ($A_{0.5}$) égale à 42.30 ± 0.72 µg/mL, suivi par les extraits de Skikda et Guelma (avec des $A_{0.5}$ = 51.15 ± 1.16 et 55.07 ± 2.12 µg/mL respectivement), et les extraits de Sétif ($A_{0.5}$ = 51.15 ± 1.16 µg/mL), de Jijel ($A_{0.5}$ = 60.36 ± 1.31 µg/mL) et de Boumerdès ($A_{0.5}$ = 62.23 ± 0.47 µg/mL).

Les plus faibles capacités réductrices sont constatées avec les extraits de Constantine ($A_{0.5}$ = 74.51 ± 2.91 µg/mL) et de Tizi Ouzou ($A_{0.5}$ = 84.00 ± 2.65 µg/mL). Bien que, les activités antioxydantes des standards testés restent très fortes par rapport aux activités des extraits étudiés (Figure 16).

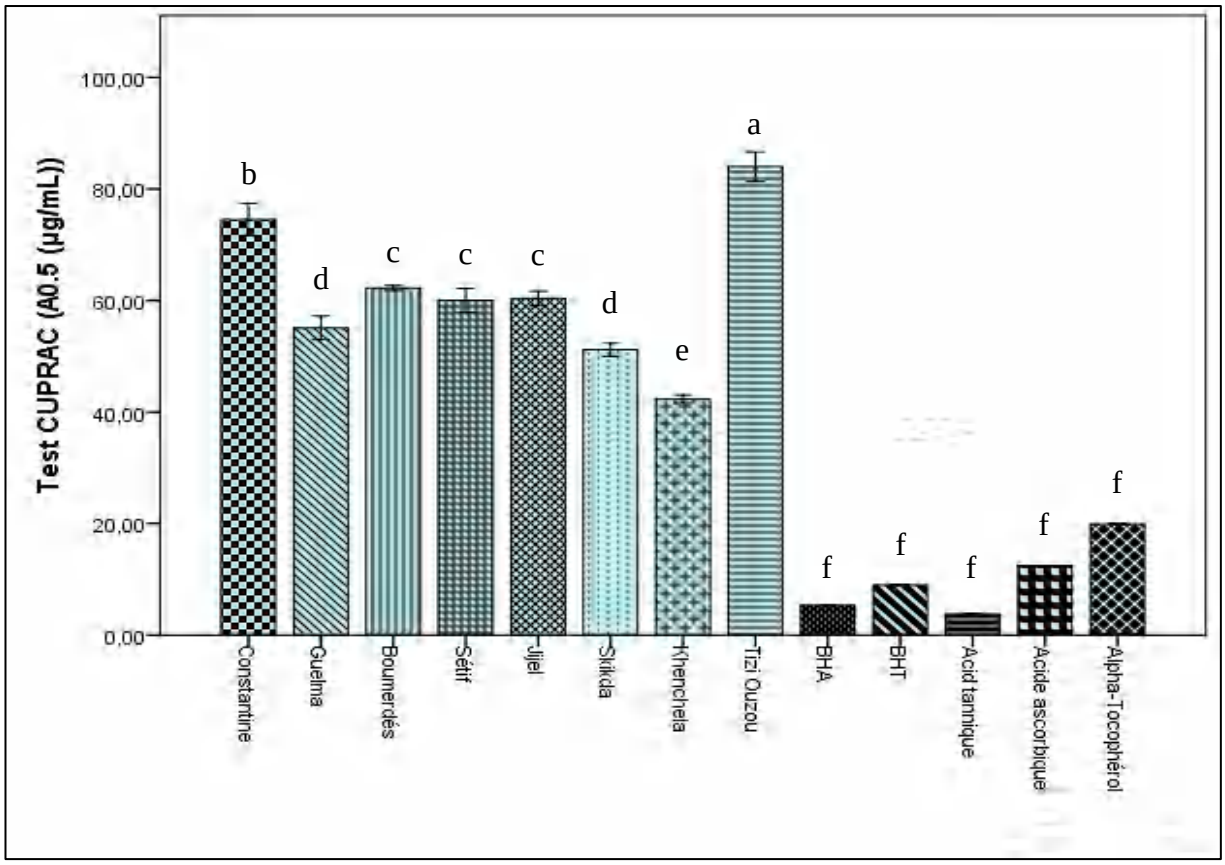


Figure 16. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test CUPRAC.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.4. Evaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchissement du β-carotène

Les résultats du test de blanchissement du β-carotène montrent que l'extrait possédant la meilleure activité neutralisante des radicaux libres est celui de Tizi Ouzou avec une CI_{50} = 98.59 ± 2.33 µg/mL. Une activité neutralisante modérée est obtenue avec l'extrait de Constantine avec une CI_{50} = 571.30±2.45 µg/mL. Cependant, tous les extraits restants ont donné une très faible activité (CI_{50} > 800 µg/mL) (Figure 17).

Une très forte activité antioxydante est enregistrée avec les antioxydants standards en comparaison aux extraits étudiés.

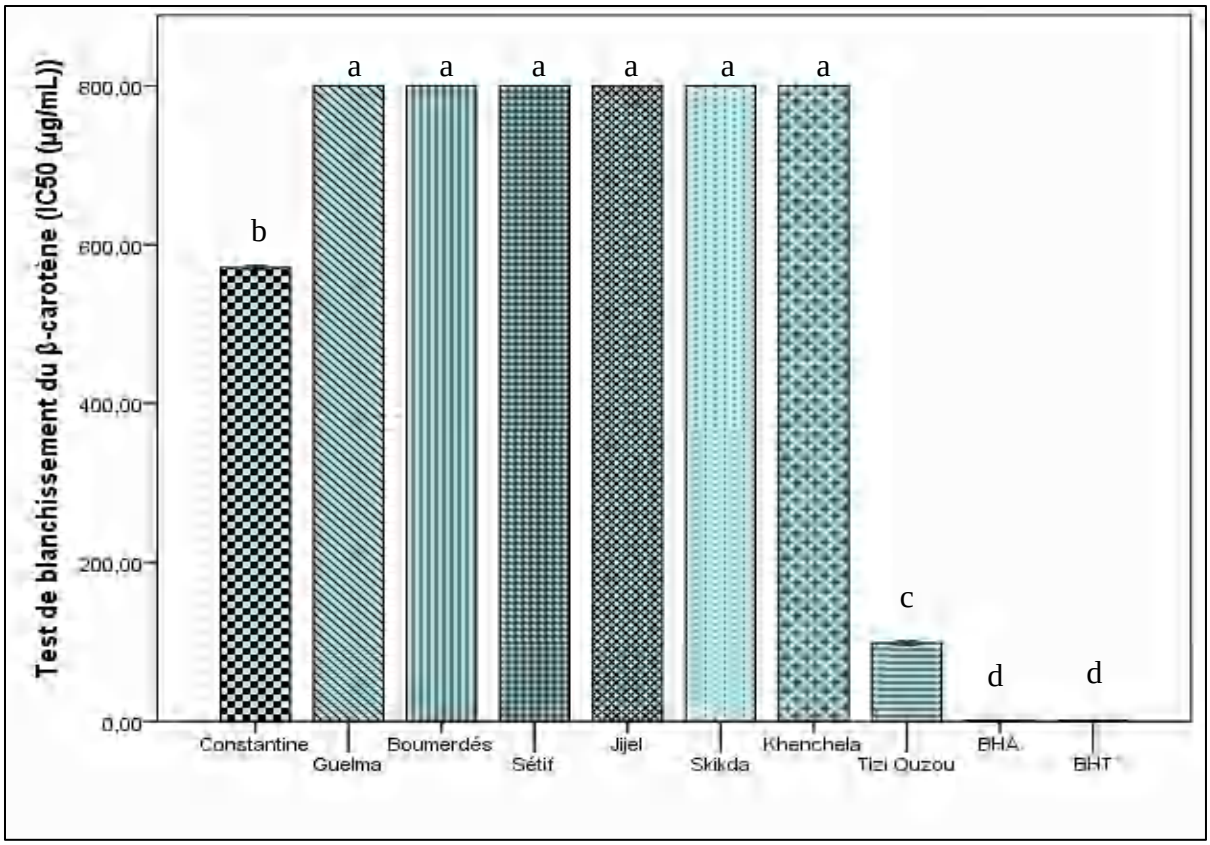


Figure 17. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test de blanchissement du β-carotène.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.5. Evaluation de l'activité antioxydante par le test FRAP

La figure 18 montre que les extraits de pollen possèdent une très faible capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). La meilleure activité réductrice est enregistrée avec l'extrait de Khenchela ($A_{0.5}$ = 143.10 ± 2.67 µg/mL), suivi par celle de l'extrait de Skikda ($A_{0.5}$ = 187.61 ±1.22 µg/mL). Néanmoins, tous les extraits restants ont une activité réductrice très faible ($A_{0.5}$ >200 µg/mL).

Les antioxydants standards ont toujours des activités antioxydantes meilleures par rapport aux échantillons étudiés.

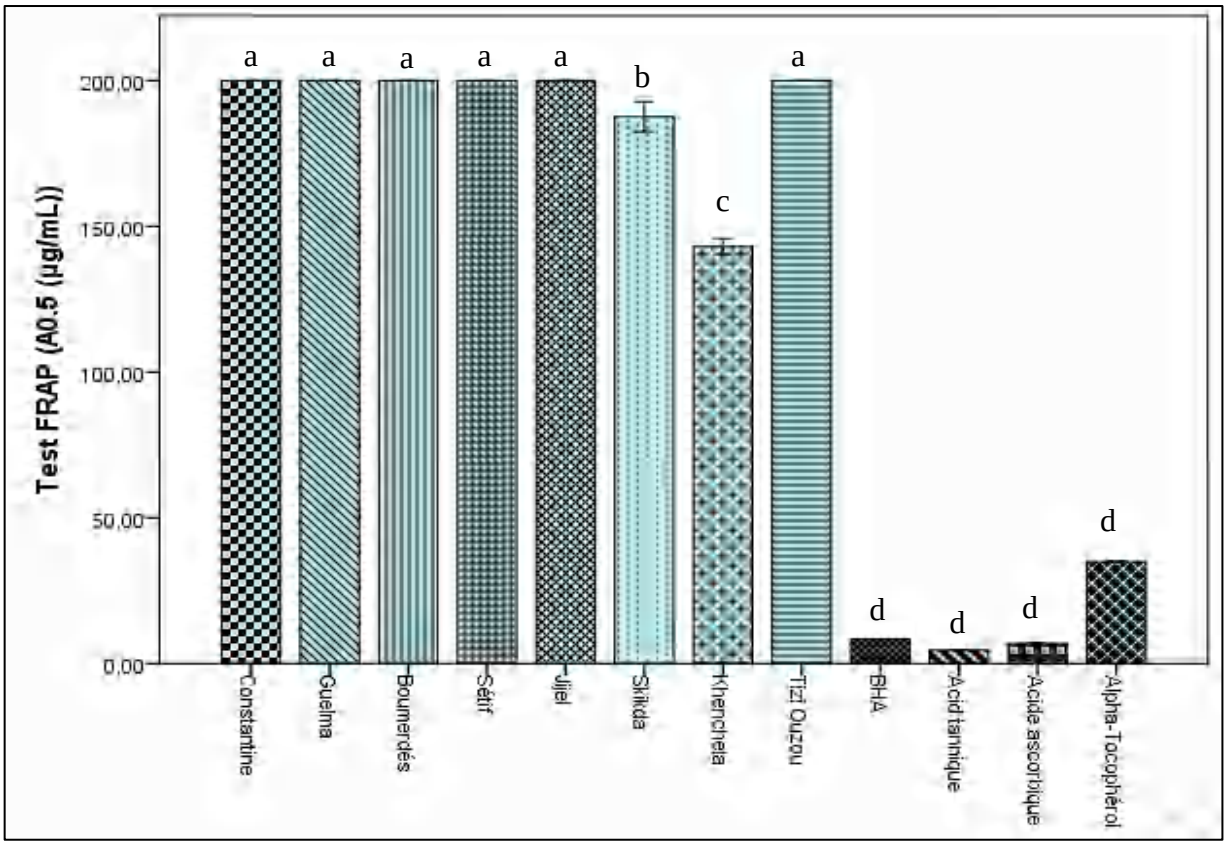


Figure 18. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test FRAP.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.6. Evaluation de l'activité antioxydante par le test au galvinoxyle (GOR)

La figure 19 indique que les extraits éthanoliques de pollen possèdent une forte activité antiradicalaire selon le test GOR. L'extrait ayant la meilleure activité antioxydante est celui de Tizi Ouzou (CI_{50} = 73.66 ± 0.89 µg/mL), suivi par ceux de Jijel (CI_{50} = 136.95 ± 1.61 µg/mL), de Skikda (CI_{50} = 152.35 ± 2.40 µg/mL), de Boumerdès (CI_{50} = 155.08 ± 1.34 µg/mL), de Sétif (CI_{50} = 157.80 ± 2.60 µg/mL) et de Khenchela (CI_{50} = 174.98±2.26 µg/mL). L'extrait de Constantine a montré la plus faible activité (CI_{50} = 295.6 ± 0.99 µg/mL).

Les capacités antiradicalaires des antioxydants standards testés sont significativement meilleures que celles de tous les échantillons étudiés.

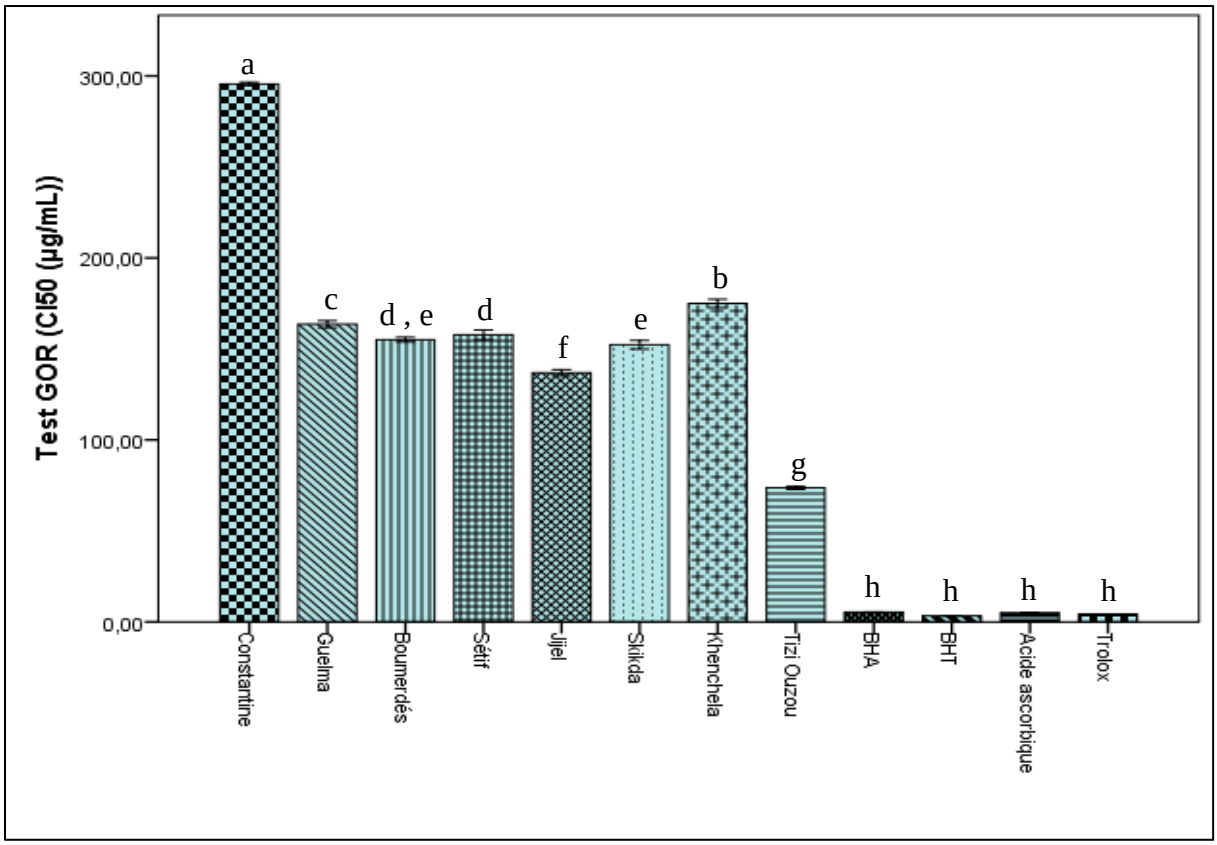


Figure 19. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test GOR.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.7. Evaluation de l'activité antioxydante par le test à la 1,10-Phénanthroline

La meilleure activité réductrice est constatée avec l'extrait de Boumerdès ($A_{0.5}$ = 38.85 ± 1.50 µg/mL), suivi par l'extrait de Jijel ($A_{0.5}$ = 39.03 ± 1.88 µg/mL), de Skikda ($A_{0.5}$ = 39.94 ± 1.02 µg/mL), de Sétif ($A_{0.5}$ = 41.87 ±0.86 µg/mL), de Guelma ($A_{0.5}$ = 43.37 ± 0.51 µg/mL), de Khenchela ($A_{0.5}$ = 56.88 ± 1.39 µg/mL) et de Tizi Ouzou ($A_{0.5}$ = 73.97 ± 2.27 µg/mL). L'activité réductrice la plus faible est notée avec l'extrait de Constantine avec une $A_{0.5}$ = 99.63 ± 2.96 µg/mL (Figure 20).

Toutefois, toutes les capacités réductrices des extraits étudiés restent très faibles comparativement à ceux des antioxydants standards utilisés.

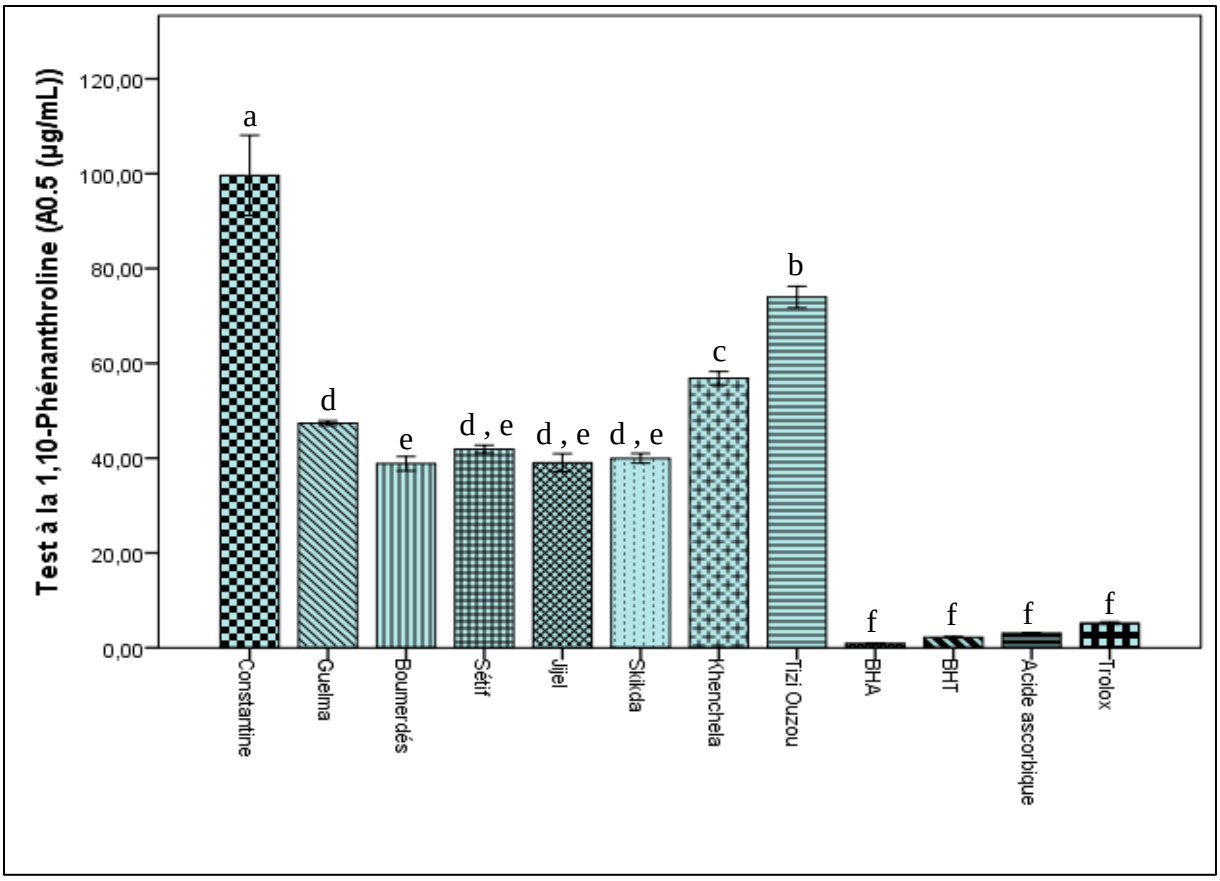


Figure 20. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test à la 1,10-Phénanthroline.

(*n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

3.8. Evaluation de l'activité antioxydante par le test SNP

La figure 21 démontre une différence entre les activités métal chélate des extraits de pollen d'abeille évaluées selon la méthode SNP. L'extrait de Boumerdès possède la meilleure activité réductrice de l'ion Ag^+ ($A_{0.5}$ = 779.33 ± 1.59 µg/mL), suivi par les extraits de Khenchela ($A_{0.5}$ = 826.67 ± 3.54 µg/mL), de Skikda ($A_{0.5}$ = 877.44 ± 3.06 µg/mL) et de Sétif ($A_{0.5}$ = 899.44 ± 0.96 µg/mL). Les extraits restants ne montrent aucune activité réductrice ($A_{0.5}$ >1000 µg/mL).

En outre, les activités enregistrées avec les deux antioxydants standards (l'acide ascorbique et le trolox) sont largement meilleures que les activités des échantillons étudiés.

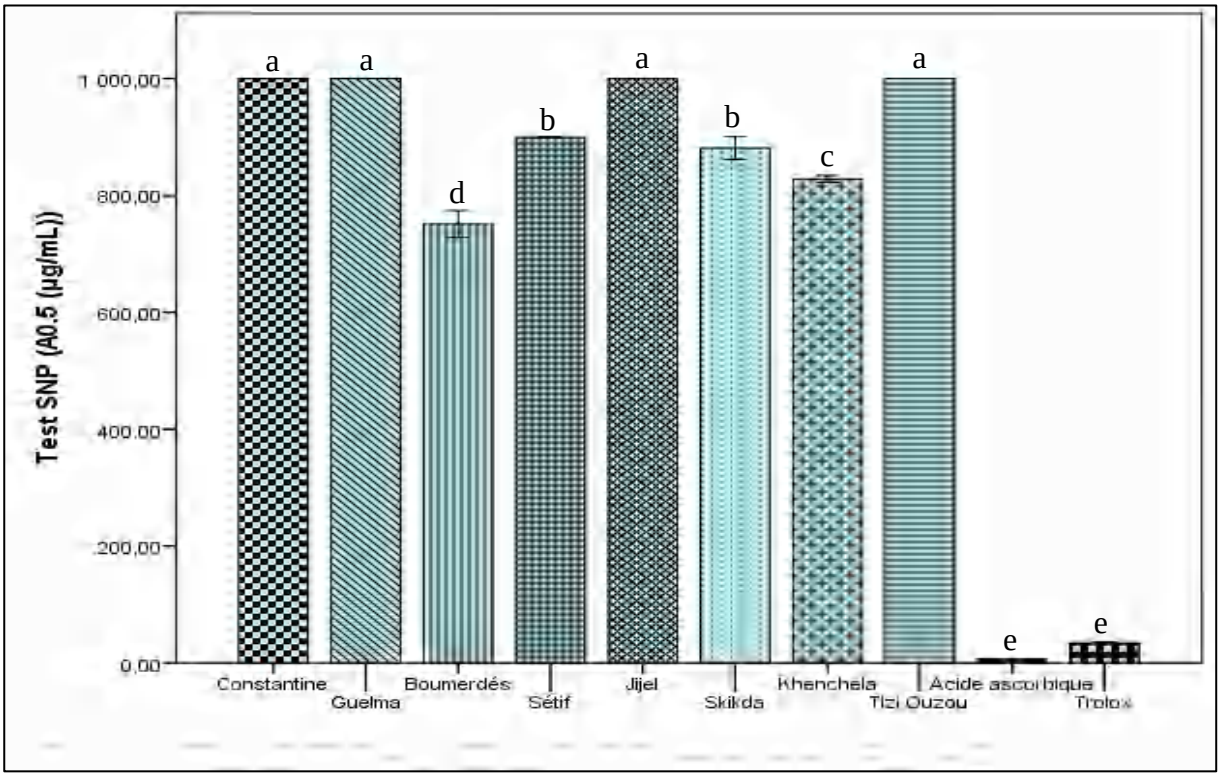


Figure 21. L'activité antioxydante des extraits éthanoliques du pollen d'abeille par le test SNP.

(n=3 ; a,b et c sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)

3.9. Analyse du pouvoir antioxydant des extraits

Pour pouvoir distinguer les différents extraits de pollen étudiés en fonction de leur pouvoir antioxydant par rapport à l'ensemble des tests effectués, les deux composantes principales de l'ACP (annexe 5) ont été utilisées pour réaliser une analyse de régression sur composantes principales (RCP).

La figure 22 montre que les extraits de Jijel, Khenchela, Boumerdès et Skikda ont des scores de régressions très proches sur les deux axes. Ce groupement indique que ces extraits ont une activité antioxydante très similaire par rapport à l'ensemble des tests antioxydants réalisés.

Des scores de régressions très rapprochés sont constatés entre les extraits de Sétif et de Guelma. Cependant, des scores très divergents sont notés avec les extraits de Tizi Ouzou et de Constantine qui apparaissent totalement isolés entre eux et par rapport aux autres extraits.

Etant donné que l'activité antioxydante est exprimée en CI_{50} ou en $A_{0.5}$ et qu'un potentiel antioxydant fort correspond à des valeurs faibles de CI_{50} ou d'$A_{0.5}$, les extraits ayant la meilleure

activité antioxydante par rapport à l'axe du pouvoir réducteur (Axe de la CP1) sont les extraits de Sétif, de Khenchela et de Jijel avec les scores de régression les plus proches du 0 (CP1 = 0.273674, – 0.278952 et – 0.28952 respectivement).

Par rapport à l'axe du pouvoir piégeur (Axe de la CP2), l'extrait de Guelma révèle le score de régression le plus proche du 0 (CP2 = – 0.19391).

Les extraits ayant montrés la meilleur activité antioxydante par rapport aux deux axes sont ceux de Sétif et de Jijel ((CP1 ; CP2) = (– 0.422022 ; 0.273674) et (– 0.51817 ; – 0.289542) respectivement). Les activités antioxydantes les plus faibles ont été enregistrées avec les extraits de Tizi Ouzou et de Constantine ((CP1 ; CP2) = (2.020982 ; – 1.631838) et (1.28499 ; 2.050238) respectivement.

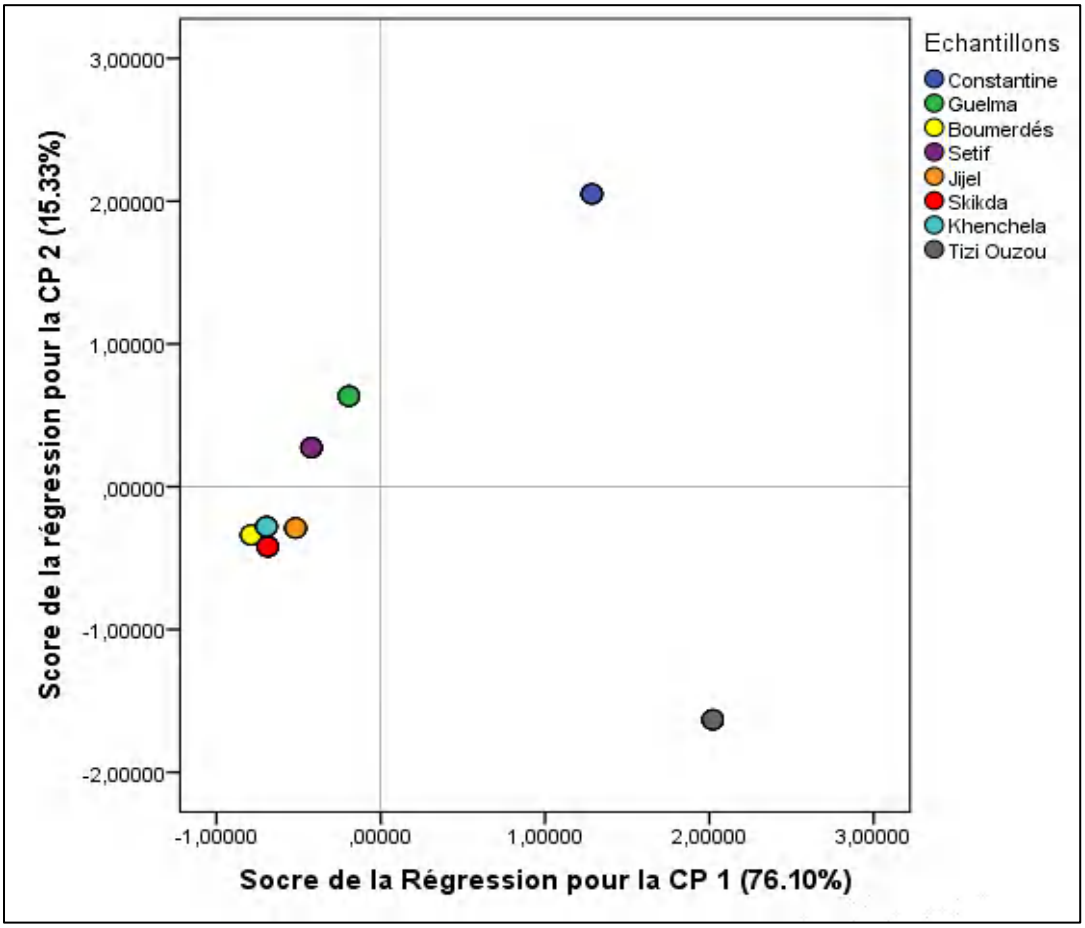


Figure 22. Biplot de la régression sur composantes principales (RCP) réalisée sur les deux composantes principales de l'ACP des tests antioxydants.

4. Analyse des protéines du pollen d'abeille

4.1.Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales montre une grande similarité entre les 8 échantillons de pollen d'abeille étudiés (Figure 23). Les taux des protéines totales les plus élevés sont enregistrés dans les échantillons de Guelma (19.13 ± .01 mg/g), Khenchela (18.98 ± 1.14 mg/g), Constantine (18.93 ± 0.45 mg/g), Tizi Ouzou (18.65 ± 1.62 mg/g), Skikda (17.81 ± 1.30 mg/g), Sétif (16.96 ± 0.83 mg/g) et Boumerdès (16.54 ± 0,75 mg/g). Tandis que le taux des protéines le moins faible est enregistré dans la solution protéique de Jijel (14.03 ± 0.43 mg/g).

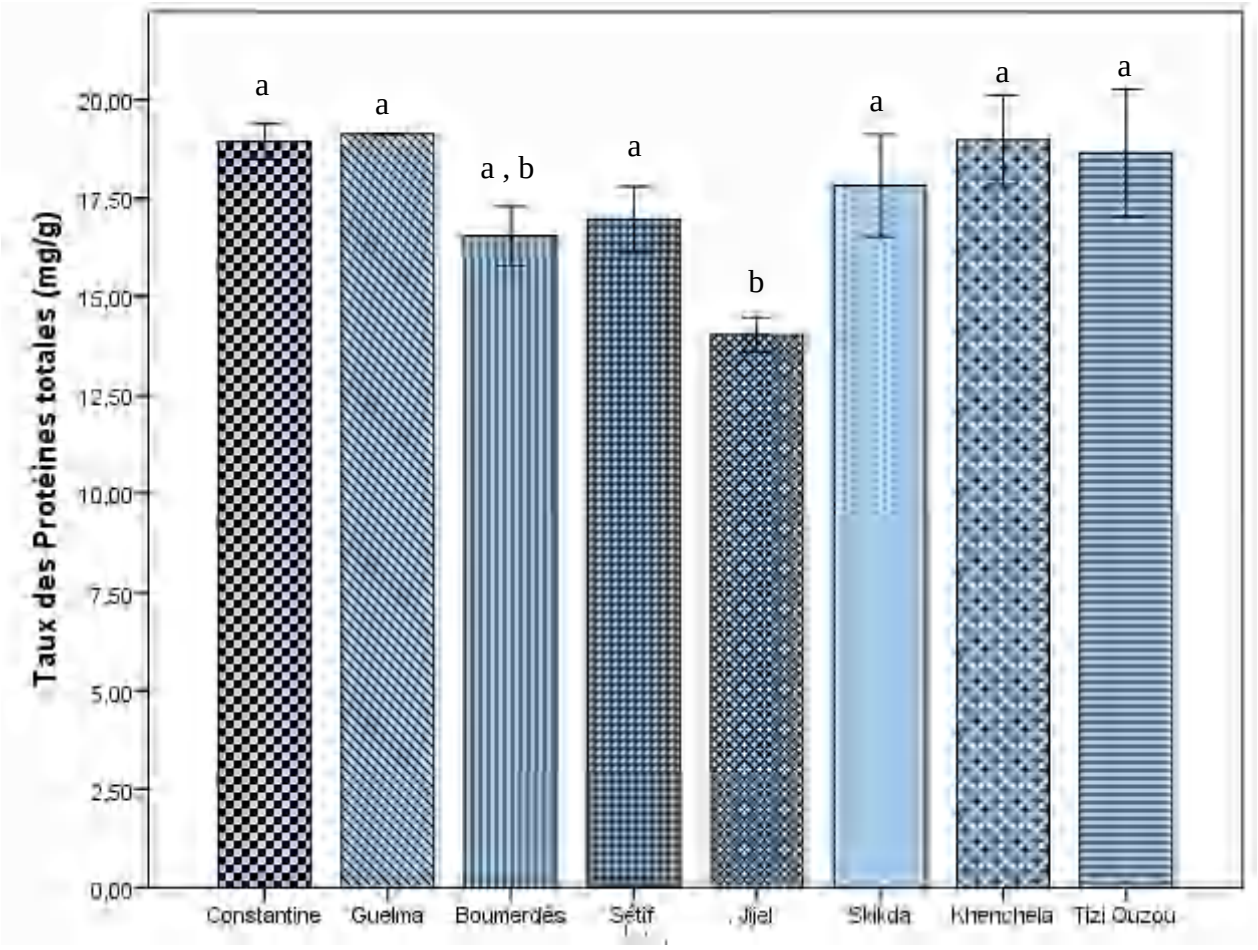


Figure 23. Taux des protéines totales dans les différentes solutions protéiques du pollen d'abeille.

(n=3 ; a et b sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)

4.2.Profils Electrophorétiques des protéines

Le profil électrophorétique des protéines des 8 échantillons révèlent la présence de plusieurs bandes protéiques (Figure 24). Le poids moléculaire de la majorité des bandes détectées est compris entre 65.5 et 78.5 KDa (Tableau 8).

Les extraits protéiques de Constantine, Guelma et Sétif présentent 6 bandes chacun, suivi par l'extrait protéique de Tizi Ouzou 5 bandes, des extraits protéiques de Jijel, Skikda et Khenchela 4 bandes chacun et l'extrait protéique de Boumerdès 3 bandes.

La bande protéique la plus fréquente est celle ayant un poids moléculaire de 72 KDa avec un pourcentage de présence égal à 62.5 %, suivi par les bandes dont le poids moléculaire est de 65.5 et 68 KDa avec un pourcentage de présence égal à 50 %. Les bandes protéiques 95, 76.8 et 74.5 KDa sont des bandes protéiques uniques (présente dans un seul échantillon) avec le pourcentage de présence le plus faible (12.5%).

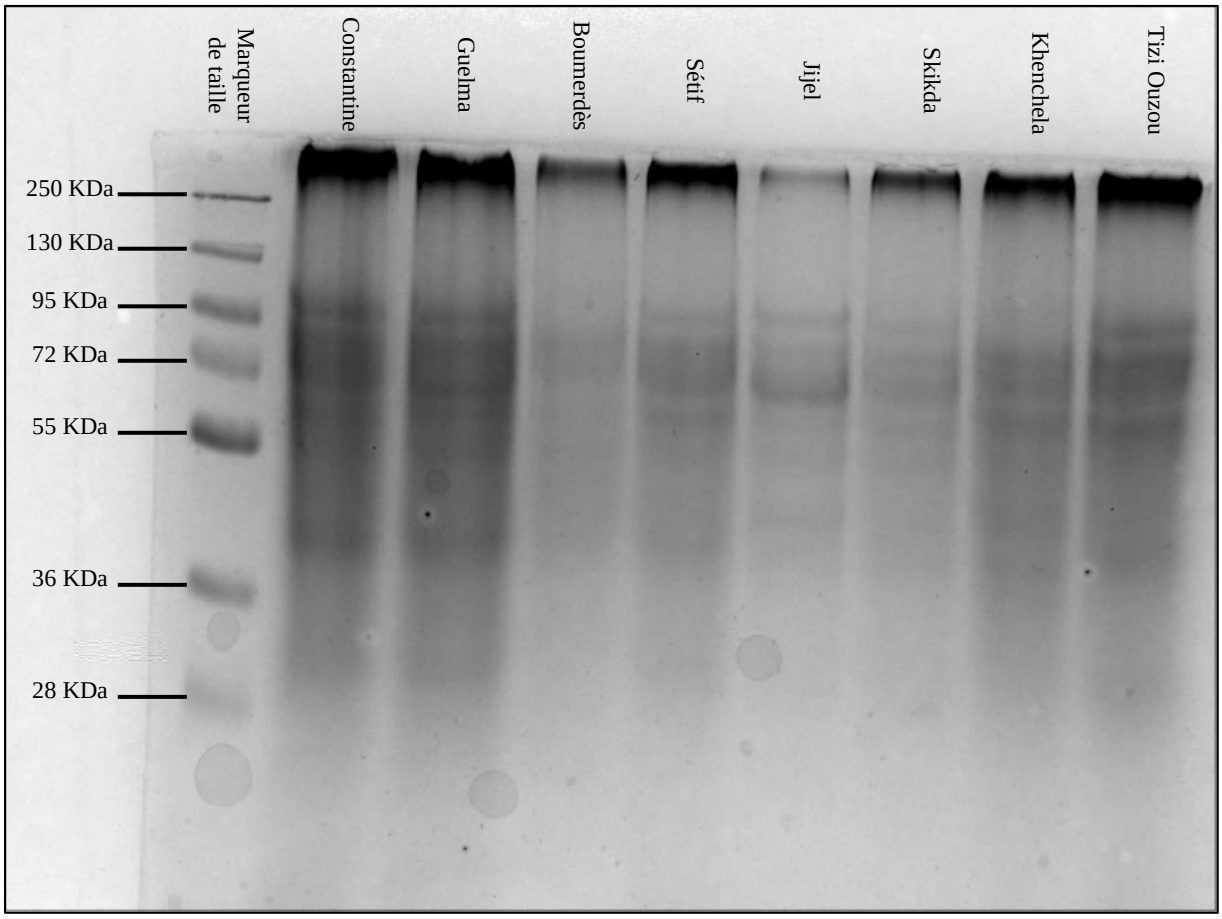


Figure 24. Gel SDS-Page (12 %) des 8 échantillons de pollen d'abeille.

Tableau 8. Diagramme Présence / Absence (1/0) et fréquences des bandes protéiques des échantillons du pollen d'abeille.

Poids moléculaire (KDa)	Constantine	Guelma	Boumerdès	Sétif	Jijel	Skikda	Khenchela	Tizi Ouzou	Somme	Pourcentage (%)
250	1	1	1	1	1	1	1	1	8	**100**
95	1	0	0	0	0	0	0	0	1	**12.5**
90.5	0	1	0	1	1	0	0	0	3	**37.5**
85	0	0	0	0	0	1	0	1	2	**25**
78.5	1	0	1	1	0	0	0	0	3	**37.5**
76.8	0	1	0	0	0	0	0	0	1	**12.5**
74.5	0	0	0	0	1	0	0	0	1	**12.5**
72	1	0	1	0	0	1	1	1	5	**62.5**
68	1	0	0	1	0	0	1	1	4	**50**
65.5	0	1	0	1	1	1	0	0	4	**50**
60	0	1	0	1	0	0	0	0	2	**25**
56.5	0	0	0	0	0	0	1	1	2	**25**
42	1	1	0	0	0	0	0	0	2	**25**
Nombre Total des bandes	**6**	**6**	**3**	**6**	**4**	**4**	**4**	**5**	**38**	**100**

Les échantillons présentant le taux de polymorphisme le plus important sont ceux de Constantine, Guelma (83.33 % avec une bande unique) et Sétif (83.33 %, pas de bandes uniques) et dont l'échantillon de Boumerdès est le moins polymorphe (33.33 %) (Tableau 9).

Tableau 9. Taux de polymorphisme protéique entre les échantillons de pollen d'abeille.

Echantillon	Bandes monomorphes	Bandes Polymorphes		Total	Polymorphisme (%)
		Uniques	Non-uniques		
Constantine	1	1	4	6	83.33
Guelma	1	1	4	6	83.33
Boumerdès	1	0	2	3	33.33
Sétif	1	0	5	6	83.33
Jijel	1	1	2	4	75
Skikda	1	0	3	4	75
Khenchela	1	0	3	4	75
Tizi Ouzou	1	0	4	5	80

5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* montrent une grande variabilité entre les potentiels anti-inflammatoires des 8 extraits de pollen d'abeille étudiés (Figure 25).

La variation de l'œdème, au cours de l'expérimentation, est appréciée respectivement après 30, 60, 120, 180 et 240 min.

Pour le lot des témoins œdémateux, suite à l'induction de la réaction inflammatoire le pourcentage moyen de gonflement évolue de 26.61 ± 2.90 % après 30 min jusqu'à 63.99 ± 2.98 % après 240 min.

En présence du diclofénac, les pourcentages moyens d'augmentation de l'œdème sont significativement moins importants que ceux des témoins œdémateux avec un pourcentage moyen de gonflement qui passe de 8.74 ± 1.17 % après 30 min à 22.49 ± 1.94 % après 240 min.

Pour les lots traités par les 8 différents extraits, le pourcentage moyen de gonflement le moins important a été enregistré avec l'extrait de Jijel (de 3.89 ± 0.66 % après 30 min à 10.17 ± 2.31 % après 240 min) qui est significativement inférieur durant toute l'expérimentation à tous les pourcentages moyens de gonflement enregistrés avec les autres extraits, les témoins œdémateux et même à ceux des rats traités par le diclofénac. En ce qui concerne l'extrait de Skikda le pourcentage moyen de gonflement est statistiquement comparable à celui du diclofénac à 30 min. Pour, les extraits de Constantine, Khenchela, de Sétif et de Tizi Ouzou les pourcentages moyens de gonflement sont statistiquement inférieurs par rapport à celui des témoins œdémateux et supérieurs à celui des traités au diclofénac.

Des taux statistiquement comparables à celui des témoins œdémateux ont été enregistrés avec les extraits de Guelma et de Boumerdès.

A cet égard, l'extrait de Jijel (à la dose de 200 mg/ Kg) a montré une meilleure activité anti-inflammatoire qui était plus forte que celle du diclofénac (à 20 mg/ Kg). Une bonne activité anti-inflammatoire a été enregistrée avec les extraits de Skikda, Constantine, Khenchela, Sétif et Tizi Ouzou mais qui reste cependant significativement inférieure à celle du diclofénac. Les extraits de Guelma et Boumerdès n'ont montré aucune activité anti-inflammatoire.

6. Analyse de la relation entre l'activité anti-inflammatoire, l'origine botanique et la composition phénolique

Dans le but de relever les liens existants entre l'activité anti-inflammatoire, les origines botaniques et la composition phénolique, un total de 48 variables standardisées (les pourcentages moyens de gonflement, types de pollen et les composants phénoliques) ont été analysées par ACP.

Le résultat de cette analyse multivariées montre que les deux premières composantes principales extraites reconstituent 71.16 % de la covariance totale (Figure 26).

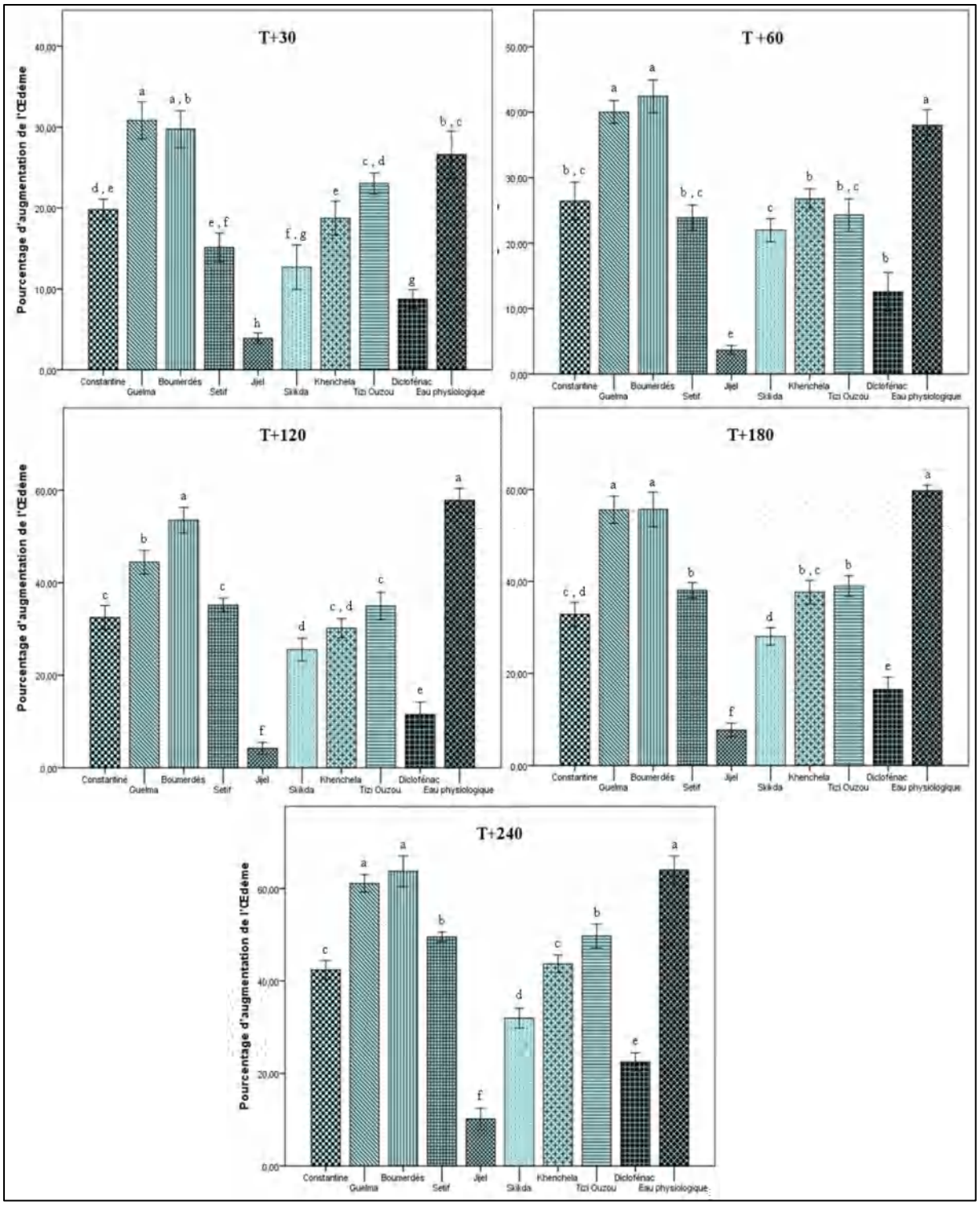


Figure 25. L'activité anti-inflammatoire des extraits de pollen d'abeille exprimée en pourcentage d'augmentation de l'œdème.

(n=3 ; a,b,c… sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey)

La CP1 représente 40.42 % et possède les coefficients de corrélations les plus élevés avec les pourcentages moyens de gonflement (0.975 à 30 min, 0.972 à 60 min, 0.964 à 120 min, 0.960 à 180 min et 0.947 à 240 min).

Cet CP1 peut être considérée comme l'axe de l'activité anti-inflammatoire qui démontre quatre types de pollen (*Centaurea*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae* et *Fraxinus*) avec un coefficient de corrélation négative (– 0.796) par rapport aux pourcentages moyens de gonflement, ce qui signifie que ces types de pollen sont corrélés à une forte activité anti-inflammatoire.

Concernant la CP2 (30.74 % de la covariance), les coefficients de corrélations les plus élevés sont constatés avec les composants phénoliques (TPT : 0.985, TFT : 0.908 et TFlT: 0.689). Donc CP2 est qualifiée comme l'axe des composants phénoliques et indique que les types *Oxalis* and *Juglans* sont corrélés positivement avec les composants phénoliques (TPT, TFT et TFlT). Par conséquent la présence de ces types de pollen dans un échantillon correspond à des taux élevés des composants phénoliques.

D'autre part aucune corrélation n'a été détectée entre les pourcentages moyens de gonflement et les taux des composants phénoliques. Cela montre que l'activité anti-inflammatoire d'extrait n'est pas affectée par le taux des polyphénols, flavonoïdes et/ou flavonols totaux.

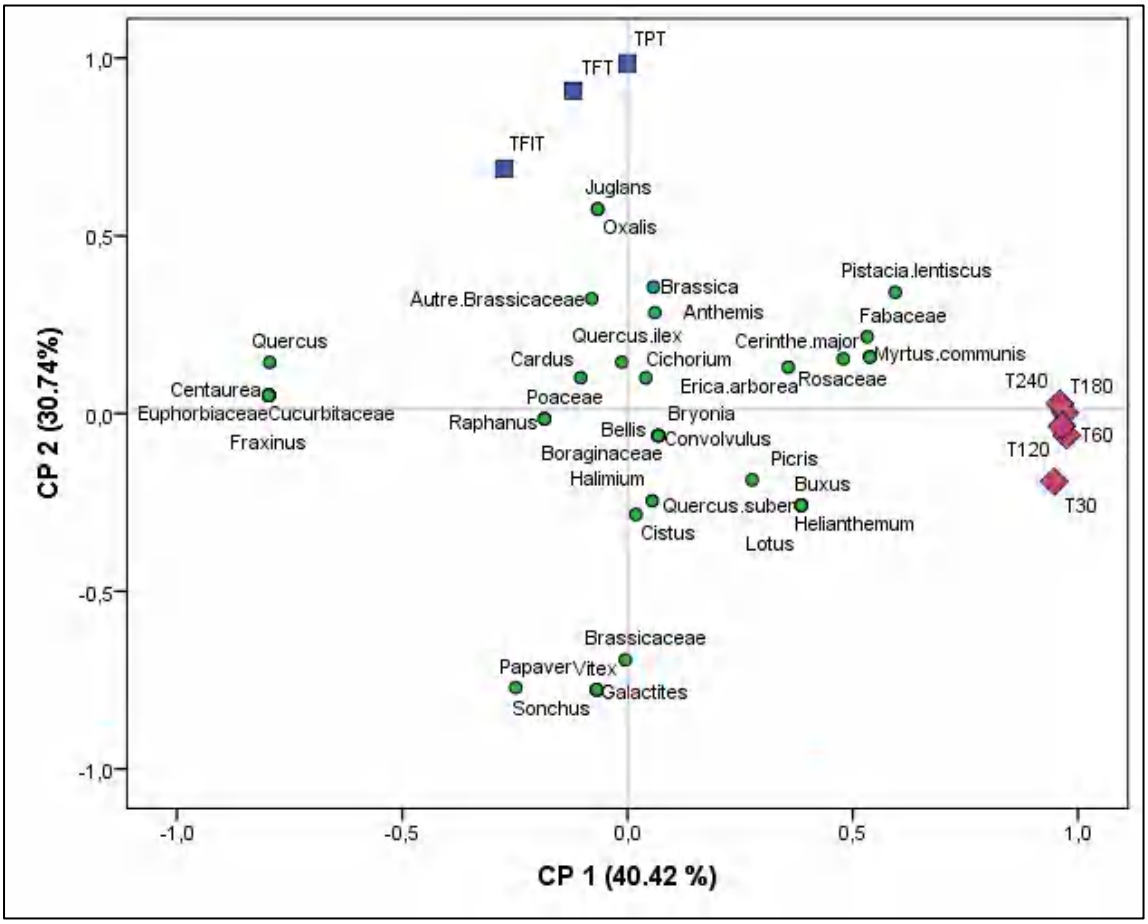


Figure 26. Projection des résultats de l'activité anti-inflammatoire, l'analyse palynologique et des dosages des composants phénoliques sur les deux premières composantes principales.

7. Evaluation de l'activité anti-allergique *in vivo*

Afin d'évaluer l'activité anti-allergique du pollen d'abeille *in vivo*, l'extrait de Jijel a été choisi vue qu'il a montré la meilleure activité anti-inflammatoire et antioxydante.

7.1. Effet de l'extrait sur la réponse allergique des rats

L'analyse du comportement des rats pendant 4 jours de sensibilisation par voie nasale au pollen, montre que durant les 60 minutes succédant la sensibilisation la totalité des rats (des lots Allergie et Allergie + Extrait de Pollen) se grattaient au tour du nez et de la tête, et présentaient des difficultés respiratoires finissant par une immobilisation. Ces symptômes indiquent que les rats sont arrivés au stade 5 de l'allergie.

Le traitement des rats allergiques (lot Allergie + Extrait de Pollen) avec l'extrait de pollen n'entraîne aucune amélioration dans le stade allergique durant les 3 premier jours. Néanmoins l'effet de l'extrait débute le 4ème jour par une observation d'une diminution des fréquences de symptômes. En effet, l'extrait de pollen réduit la fréquence des grattements avec un pourcentage de 24%, la difficulté respiratoire avec un pourcentage de 16.67% et améliore la capacité de mouvement de l'animal avec un pourcentage de 7,58% comparativement aux rats du lot Allergie (Figure 27).

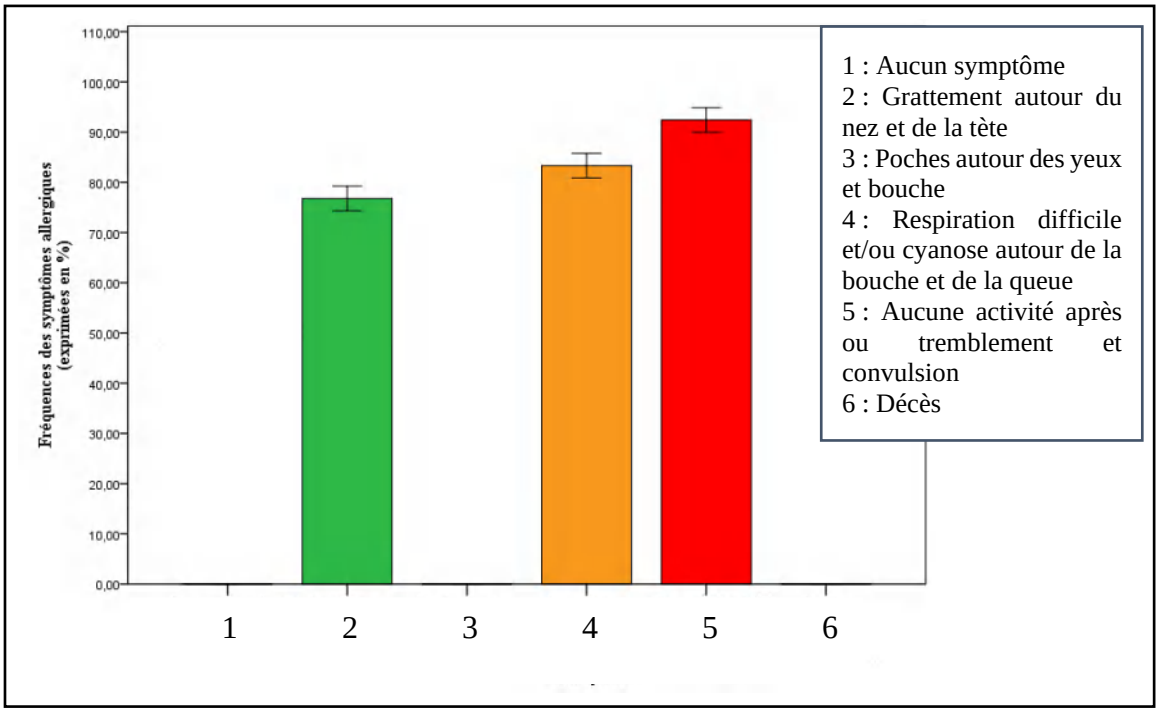


Figure 27. Fréquences des différents symptômes chez les rats allergiques traités avec l'extrait de pollen d'abeille (exprimées en pourcentages comparativement aux fréquences des rats allergiques).

7.2. Effet de l'extrait sur le profil des protéines sériques chez les rats allergiques

7.2.1. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines sériques totales

Les résultats montrent que l'extrait de pollen d'abeille ainsi que l'induction d'allergie n'ont aucun effet significatif ($p > 0.05$) sur le taux des protéines sériques totales (Figure 28).

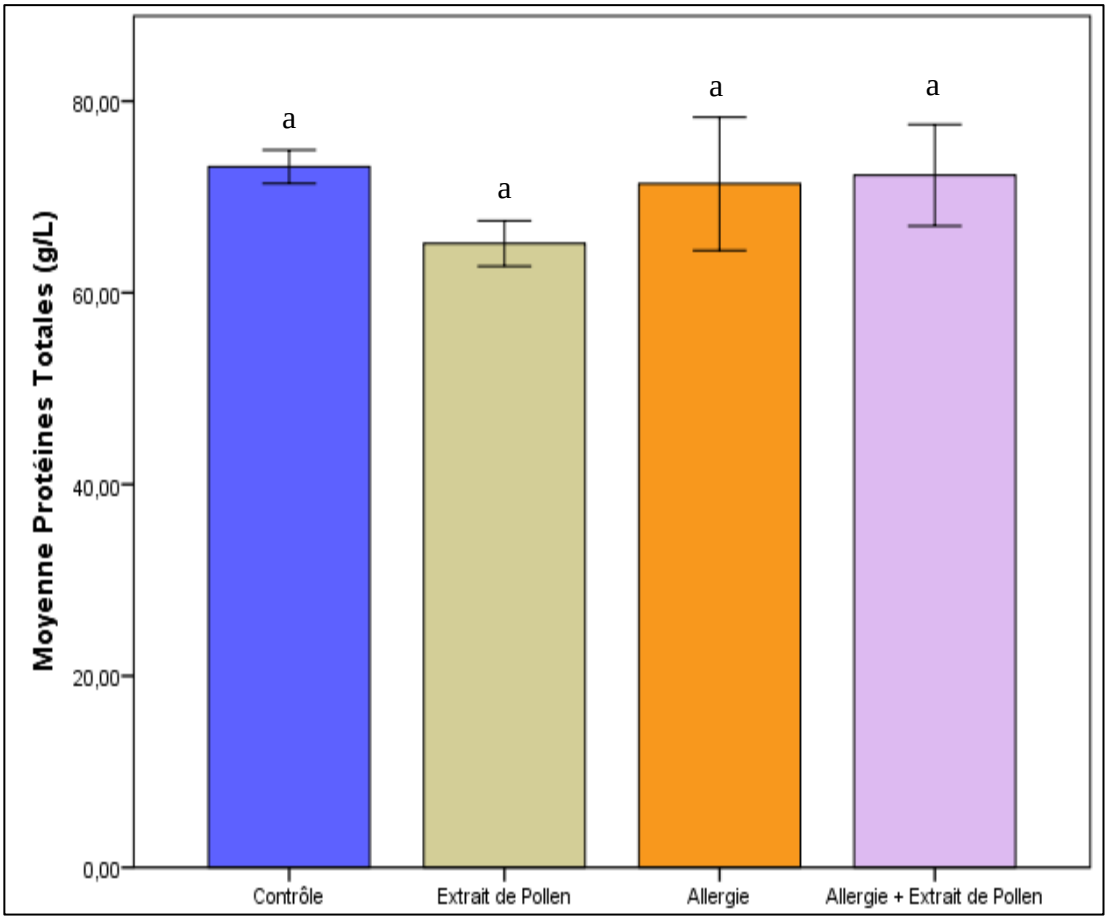


Figure 28. Effet des différents traitements sur le taux des protéines sériques totales.

(*n=3 ; a indique l'absence de différence significative (p > 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.2. Effet de l'extrait de pollen sur l'Albumine chez les rats allergiques

L'évaluation du taux de l'albumine sérique démontre une diminution significative, comparativement au lot Contrôle (30.07 ± 0.80 g/L), dans les lots Extrait de Pollen (25.30 ± 1.83 g/L), Allergie (27.27 ± 0.70 g/L) et Allergie + Extrait de Pollen (25.23 ± 0.5 g/L) (Figure 29). La différence notée entre ces derniers est non-significative ($p \geq 0.05$).

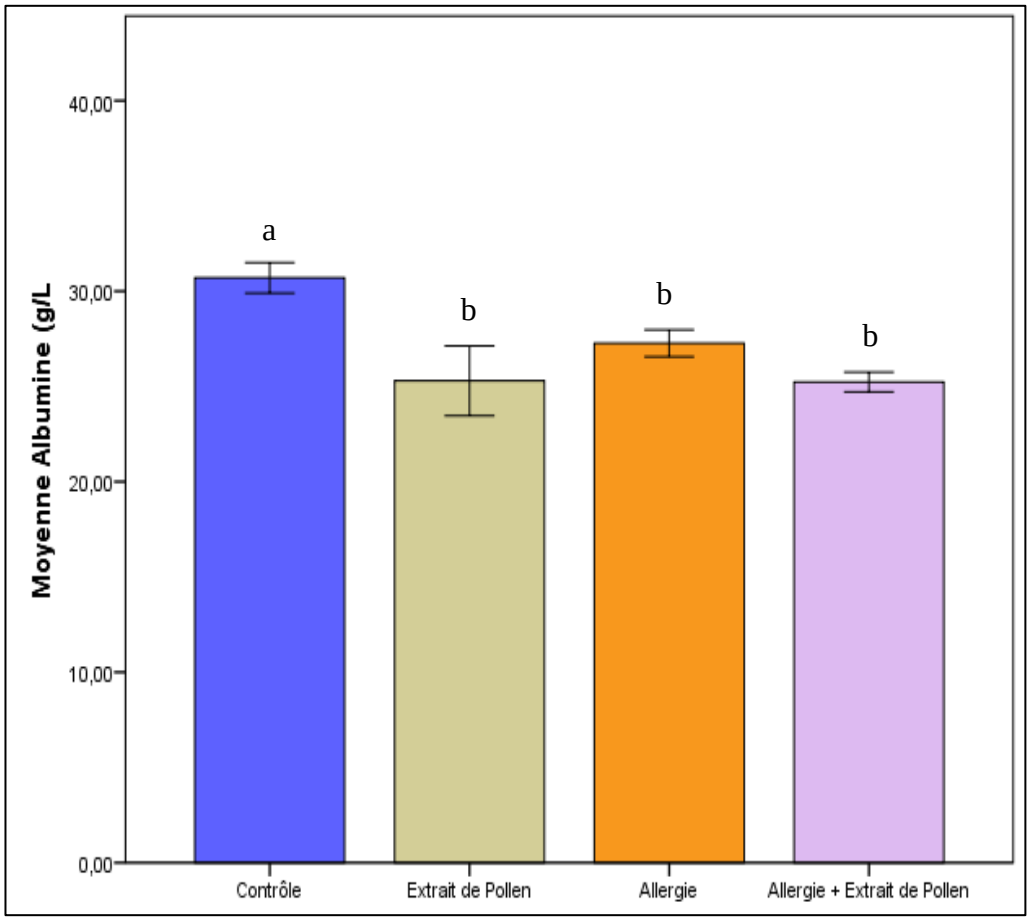


Figure 29. Effet des différents traitements sur le taux d'Albumine sérique.

(*n=3 ; a et b sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.3. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines Alpha 1 chez les rats allergiques

La figure 30 montre que le taux des protéines Alpha 1 du lot Contrôle (14.25 ± 0.35 g/L) est supérieur à ceux des lots Extrait de Pollen (12.57 ± 0.80 g/L) et Allergie (11.90 ± 1.51 g/L). Tandis que le taux des Alpha 1 dans le lot Allergie + Extrait de Pollen (12.13 ± 0.25 g/L) est supérieur à celui du lot Allergie. Bien que la seule différence significative ($p \geq 0.05$) soit notée entre les lots Contrôle et Allergie.

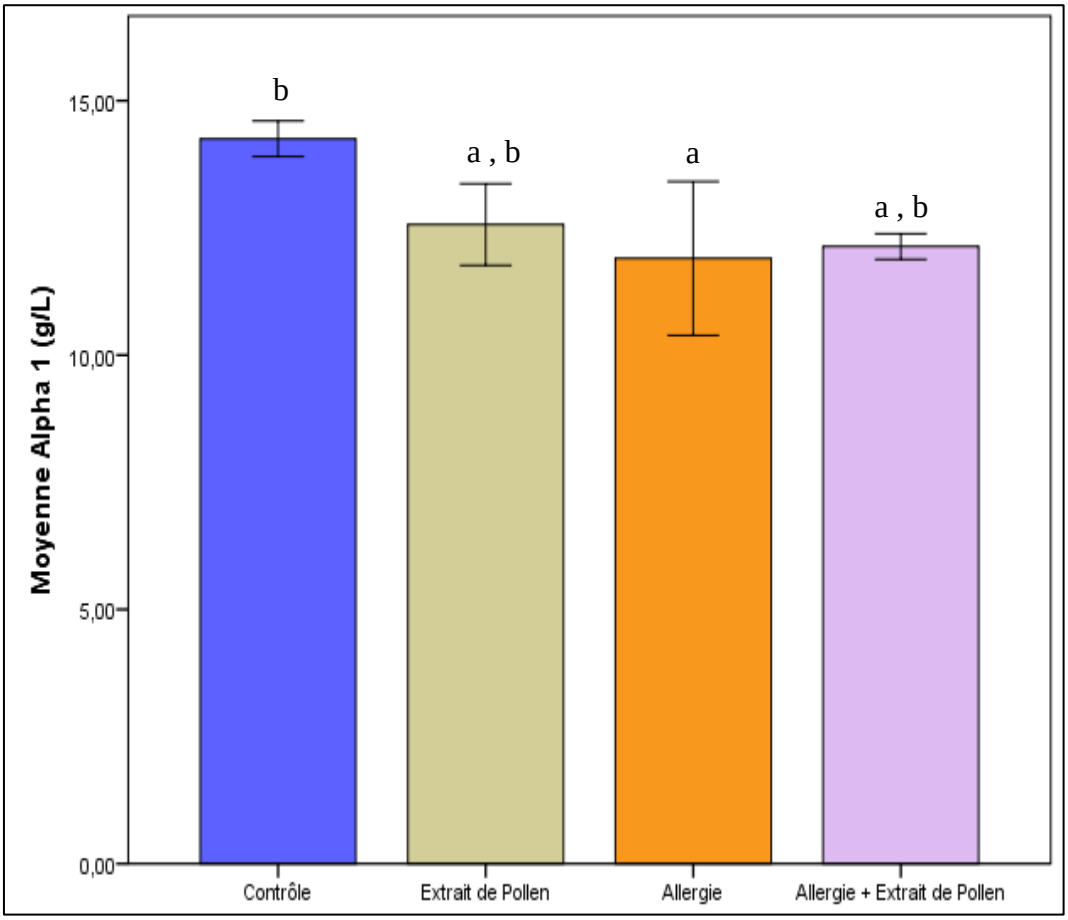


Figure 30. Effet des différents traitements sur le Taux des protéines Alpha 1.

(*n=3 ; a et b sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.4. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines Alpha 2 chez les rats allergiques

La figure 31 indique que l'extrait de pollen ainsi que l'induction d'allergie n'ont pas d'effet significatif sur le taux des protéines Alpha 2 ($p > 0.05$).

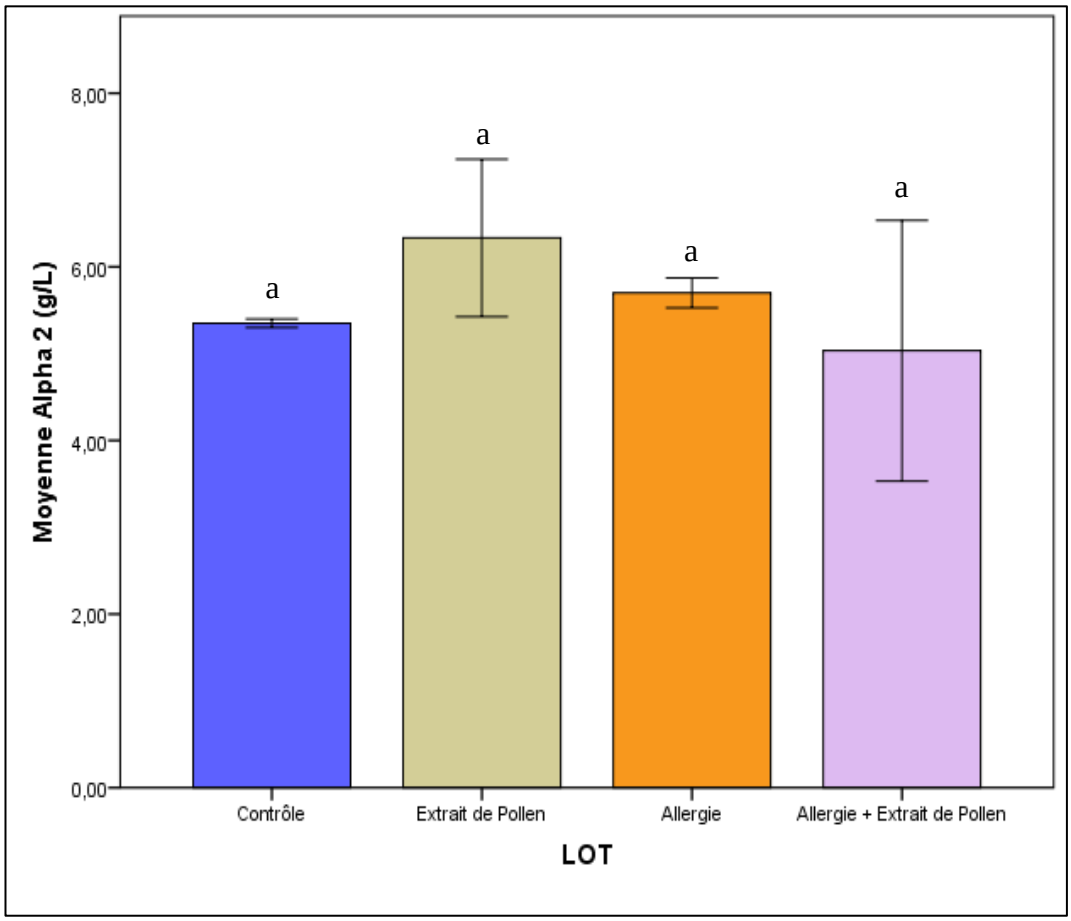


Figure 31. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Alpha 2.

(*n=3 ; a indique l'absence de différence significative (p > 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.5. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines Bêta 1 chez les rats allergiques

La figure 32 démontre que l'extrait de pollen d'abeille ainsi que l'induction d'allergie n'ont aucun effet significatif sur le taux des protéines Bêta 1 ($p > 0.05$).

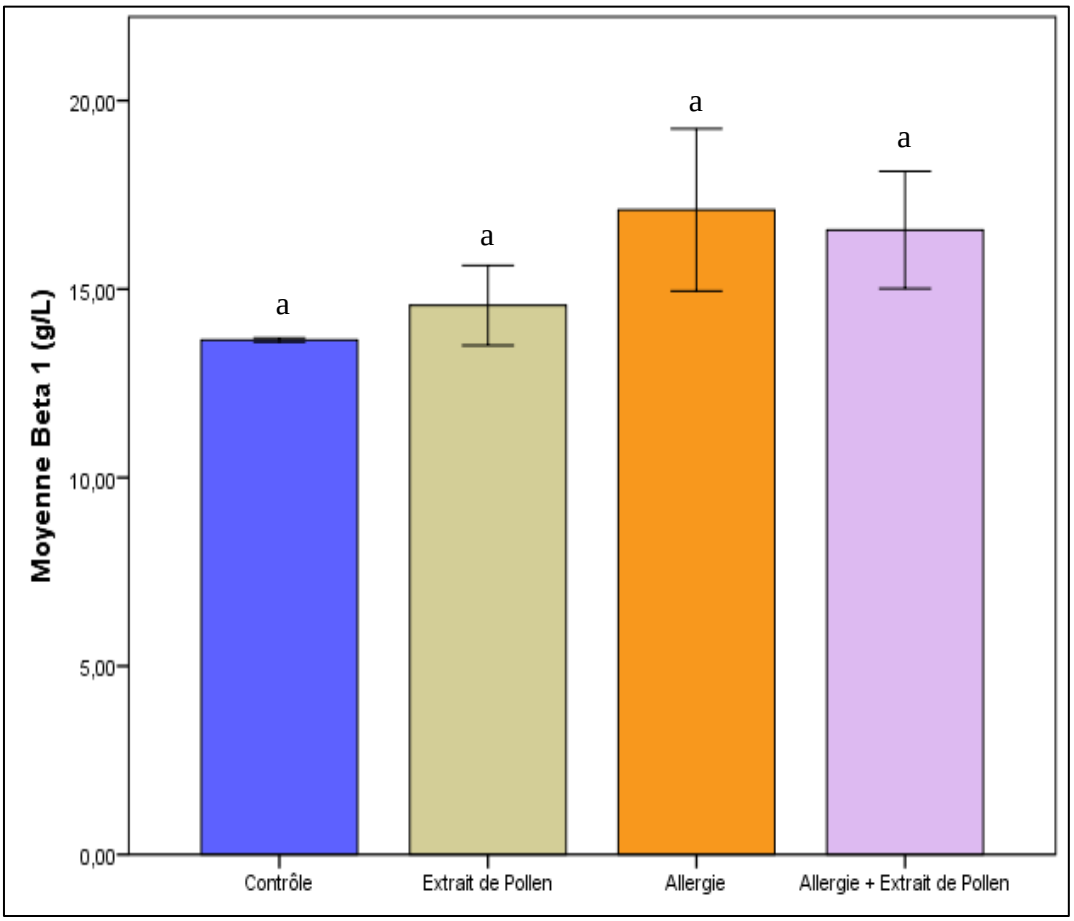


Figure 32. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Bêta 1.

(*n=3 ; a indique l'absence de différence significative (p > 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.6. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines Bêta 2 chez les rats allergiques

La figure 33 rapporte que le taux le plus élevé des protéines Bêta 2 est noté avec le lot Contrôle (6.95 ± 0.05 g/L). En outre, le taux des Bêta 2 du lot Allergie + Extrait de Pollen (2.87 ± 4.96 g/L) est significativement supérieur à celui du lot Allergie. On note aussi une absence des fractions protéiques Bêta 2 du sérum des lots Extrait de Pollen et Allergie.

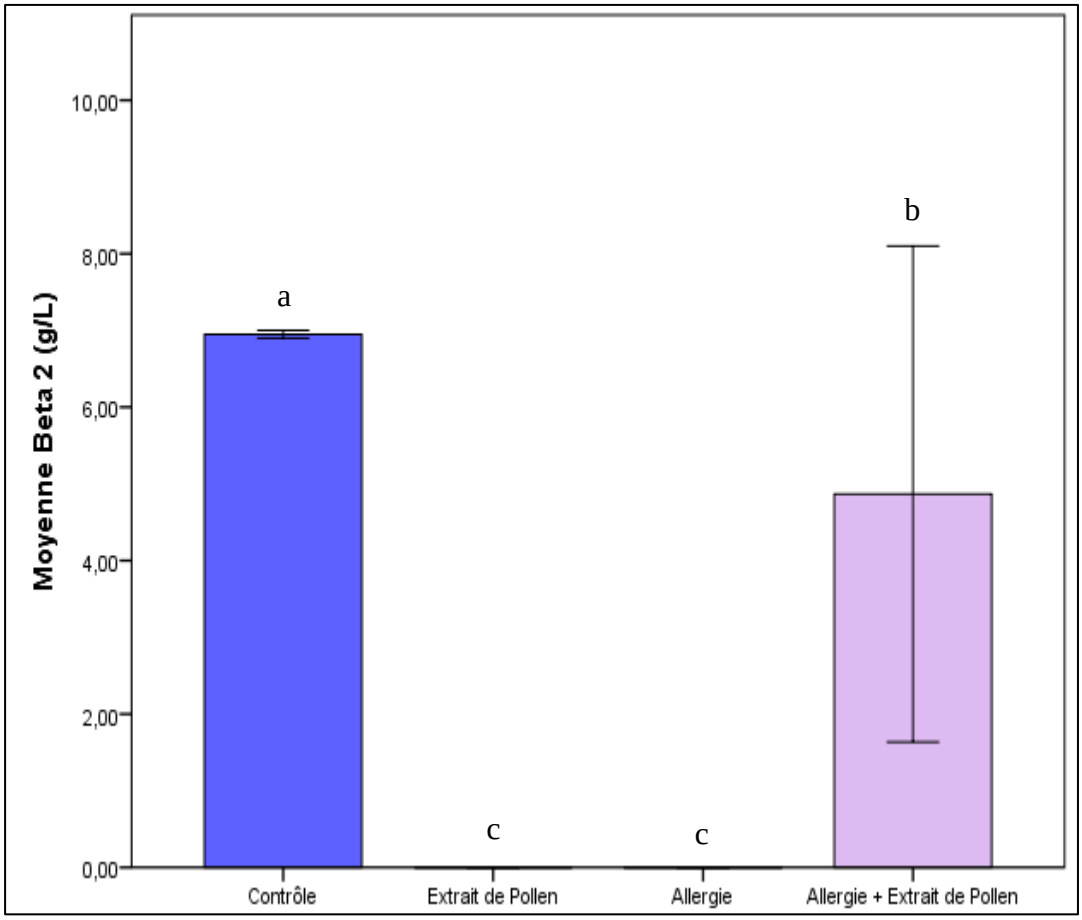


Figure 33. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Beta 2.

(*n=3 ; a,b et c sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.2.7. Effet de l'extrait de pollen sur les protéines Gamma chez les rats allergiques

La figure 34 indique que le taux des protéines Gamma dans le lot Contrôle (0.20 ± 0.1 g/L) est significativement inférieur à ceux des lots Extrait de Pollen (8.80 ± 0.36 g/L) et Allergie (12.20 ± 1.31 g/L). Le taux des Gammaglobuline dans le lot Extrait de Pollen est inférieur à celui du lot Allergie. Aucune différence significative n'a été constaté entre les taux du lot Allergie + Extrait de Pollen (10.70 ± 0.81 g/L) et les lots Allergies et Extrait de Pollen.

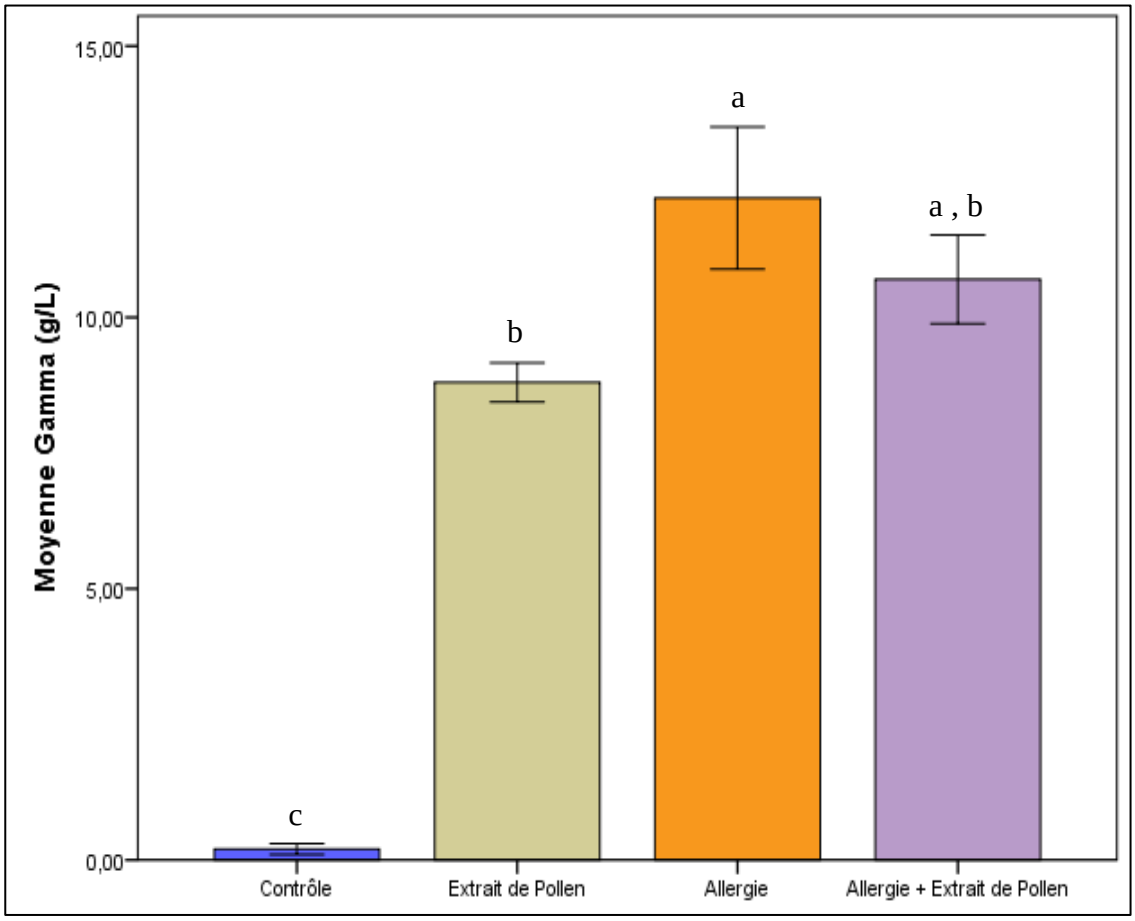


Figure 34. Effet des différents traitements sur le taux des protéines Gamma.

(*n=3 ; a, b et c sont significativement différents (p < 0.05) ; Test ANOVA et Tukey*)

7.3. Etude histologique

L'observation des coupes histologiques des poumons des rats du lot contrôle montre une structure normale bien organisée du tissu pulmonaire (figure 35).

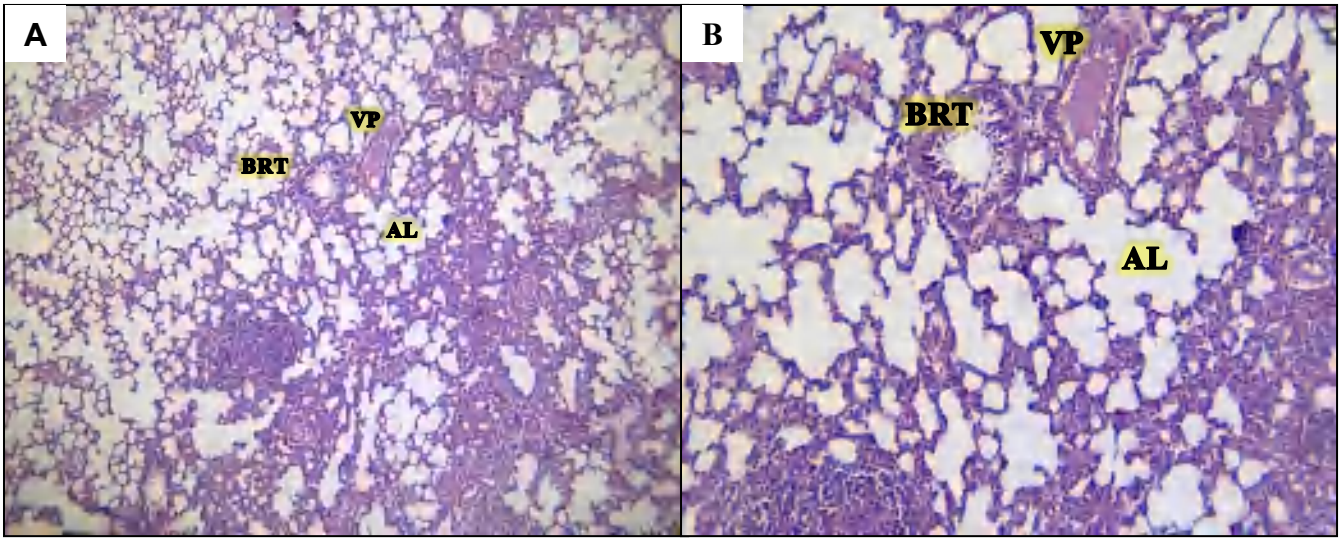


Figure 35. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine des rats contrôles. (A): GX40, (B) : GX100. *AL: alvéoles, BRT : bronchiole pulmonaire terminale, VP : veine pulmonaire*

Le traitement des rats avec l'extrait de pollen seul n'a pas d'effet sur la structure histologique du poumon. Néanmoins, on enregistre la présence d'alvéoles de forme irrégulière (Figure 36).

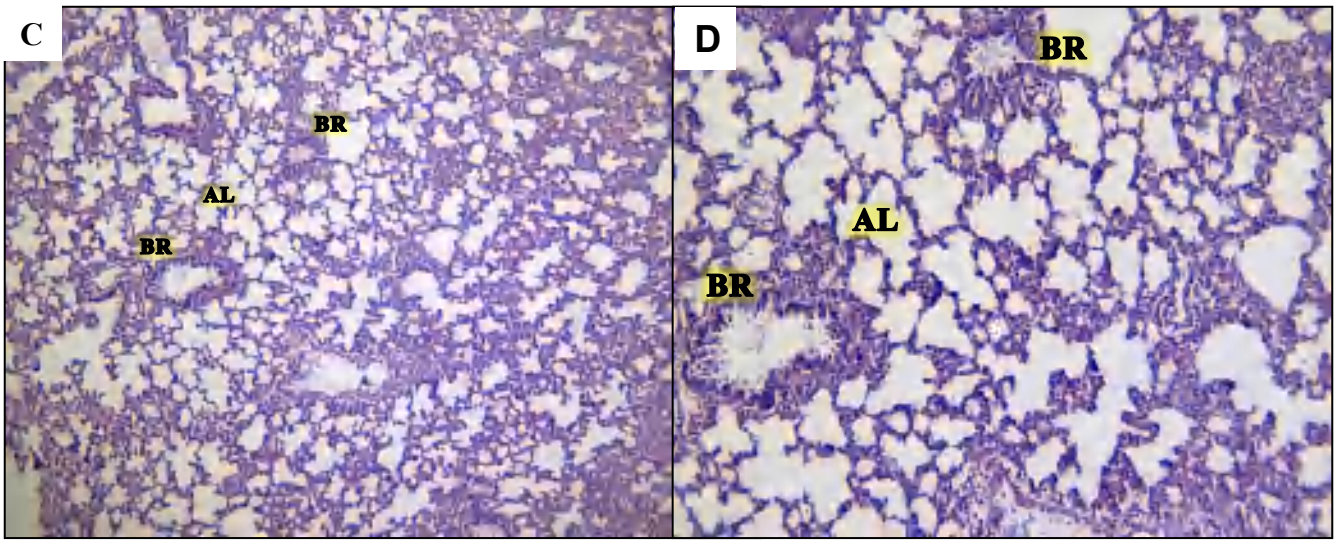


Figure 36. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine des rats traités avec l'extrait de pollen.
(C): GX40, (D) : GX100. *AL: alvéoles, BR: bronchiole pulmonaire*

La coupe histologique du poumon des rats allergiques illustre un parenchyme pulmonaire altéré, avec un spasme de muscles lisses induisant un rétrécissement des bronchioles et une muqueuse plus frangée que les bronches entrainant une broncho-constriction (Figure 40).

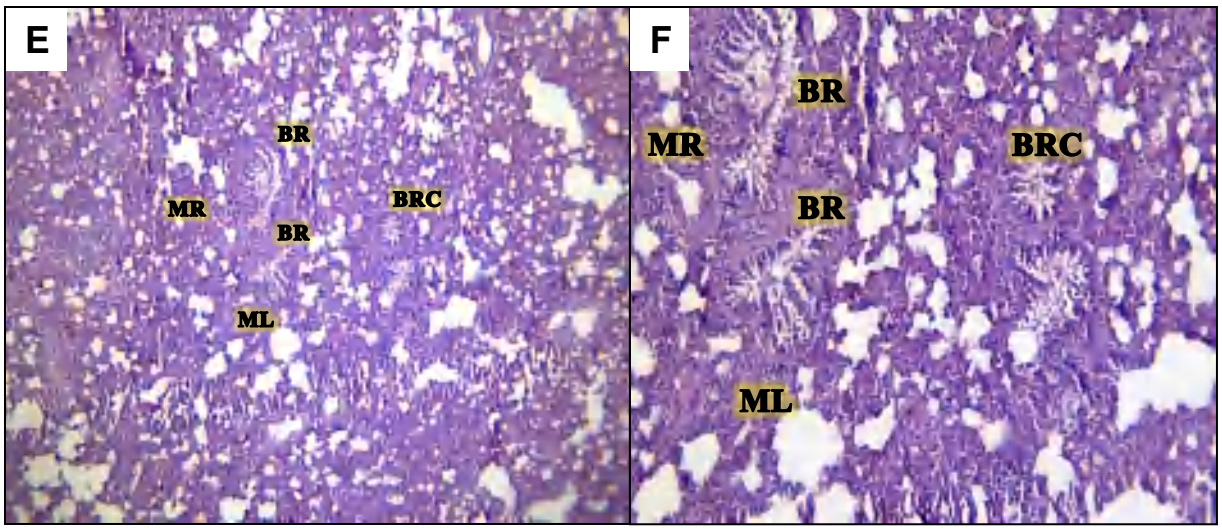


Figure 37. Coupe histologique du tissu pulmonaire, colorée par l'hématoxyline- éosine des rats allergiques.

(E): GX40, (F) : GX100. *BR: bronchiole pulmonaire. MR : Muscle de Reissessen, BRC : Broncho-Constriction, ML : Muscle lisse*

On observe chez rats allergiques traités avec l'extrait éthanolique de pollen (Figure 41), une structure pulmonaire intacte semblable à celle du contrôle, on note une dilatation des muscles lisses dégageant les bronchioles (dilatation des alvéoles).

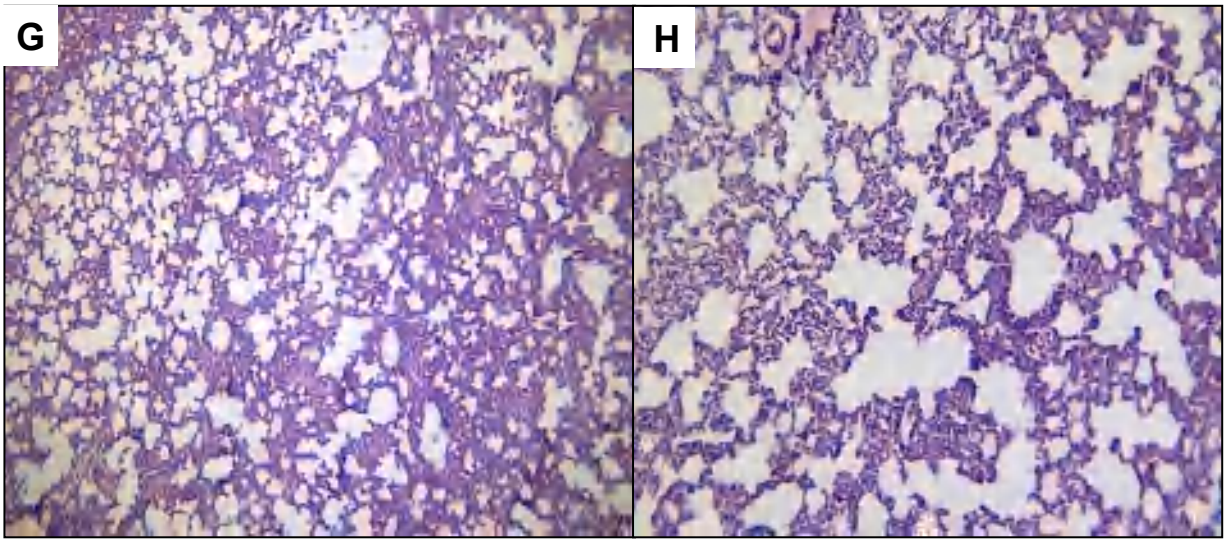


Figure 38. Coupe histologique du tissu pulmonaire colorée par l'hématoxyline- éosine chez les rats allergiques traités avec l'extrait éthanolique de pollen (G): GX40, (H) : GX100.

Discussion

Discussion

Un grand nombre de chercheurs à travers le monde se sont intéressés aux produits de la ruches dont le pollen, vu que ce dernier est considéré comme de superaliment très riche en protéines, glucides, lipides, minéraux et vitamines…etc. C'est également une excellente source de molécules bioactives à différentes vertus thérapeutiques connues et utilisées depuis l'antiquité (Khalifa et al., 2021; Komosinska-Vassev et al., 2015; Nogueira et al., 2012; Tutun et al., 2021).

1. Analyse palynologique

L'origine botanique du pollen peut varier selon la région et la végétation disponible pour les abeilles au moment de la collecte (Mărgăoan et al., 2021). L'identification botanique a montré que les 8 échantillons étudiés sont hétérofloraux avec une identification de 40 types de pollen appartenant à 20 familles botaniques. Le résultat reflète la grande biodiversité florale caractérisant l'Algérie et particulièrement sa région Nord. Selon l'index synonymique de la flore d'Afrique du nord, l'Algérie compte près de 4000 taxons indigènes et environ 4500 autres entre taxons introduits à différents degrés : cultivés, adventices et naturalisés (Alain Dobignard et al., 2013).

Les familles botaniques les plus fréquentes dans les échantillons étudiés sont *Anacardiaceae, Brassicaceae* et Cistaceae, où le type *Cistus* a été omniprésent et les familles *Myrtaceae et* Oleaceae sont les moins fréquentes. Les résultats corroborent plusieurs études démontrant que les plantes les plus visitées par les abeilles pour récolter le pollen sont des membres de la famille des Cistaceae et des *Boraginaceae*, bien que les plantes les moins visitées sont des membres de la famille des Myrtaceae (Feás et al., 2012; Sawicki et al., 2022).

La majorité des familles identifiées dans les échantillons proviennent d'espèces spontanées très connues pour leur potentiel mellifère élevé « flores pollinifères ». Cette observation appuie les résultats des travaux algérien de Ghorab et al., 2021; Tamali and Özkırım, 2019; Zerrouk et al., 2014). Une autre étude réalisée dans la région de El Taref révèle l'existence d'une relation étroite entre les abeilles butineuses et les plantes mellifères (Boutabia et al., 2016).

Les familles Brassicaceae et Asteraceae (la plupart de ses espèces) sont considérées comme des plantes nectarifères. Toutefois, les membres de la famille des *Fabacées* (6,68% des types de pollen identifiés) sont connus par un fort pouvoir nectarifère et pollinifère à la fois (Ghorab, Rodríguez-Flores, et al., 2021). La diversité d'un échantillon de pollen est liée à la colonie

d’abeilles dans son milieu naturel : type de plantes (mellifère et/ou pollinifère) et force de la colonie (Chefrour et al., 2009).

2. Etude phytochimique des extraits de pollen d’abeille

De nombreuses études ont été menées dans de nombreux pays sur les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux du pollen d'abeille ainsi que l’identification du profil phénolique. Pour les échantillons étudiés, les teneurs en polyphénols totaux des 8 extraits de pollen varient de 7.52 ± 0.77 à 122.47 ± 1.03 µg EAG/mg, les teneurs en flavonoïdes varient entre 26.80 ± 0.12 et 85.06 ± 1.56 µg EQ/mg, alors que les teneurs en flavonols sont dans l’intervalle de 49.78 ± 3.33 et 79.03 ± 0.24 µg EQ/mg.

Bien que différentes méthodes d’extraction et de dosage ont été utilisées, les taux de polyphénols sont comparables à ceux rapportés dans différentes études réalisées sur le pollen d’abeille du Brésil (Araújo et al., 2017; De-Melo et al., 2018a, 2018b; Soares de Arruda et al., 2021), d’Espagne, du Portugal (Pascoal et al., 2014), d’Etat Unis d’Amérique (LeBlanc et al., 2009), de la Grèce (Graikou et al., 2011), du Maroc (Asmae et al., 2021), de la Pologne (Sawicki et al., 2022), de la Turquie (Mărgăoan et al., 2021; Şahin et al., 2019; Saral et al., 2016; Yıldız et al., 2013) et du Vietnam (Quoc, 2021) (Tableau 10).

Des teneurs en polyphénols totaux inférieurs à celles notées dans cette investigation comparativement à celles rapportées dans d’autres publications réalisés sur le pollen d’abeille du Brésil (Lopes et al., 2019), de la Lettonie (Straumite et al., 2022), de la Serbie (Žilić et al., 2014), de la Slovaquie (Fatrcová-Šramková et al., 2013, 2016), de la Tunisie (Daoud et al., 2019) et de la Turquie (Okatan et al., 2021; Saral et al., 2022).

Cependant, des taux de polyphénols largement supérieurs aux résultats sont constatés dans un échantillon tunisien de pollen monofloral (cultivar de Tozeur) (Daoud et al., 2019) et un échantillon Turc hétérofloral (Gercek et al., 2021).

La majorité des études publiées indiquent des taux de flavonoïdes et flavonols très faibles comparativement à ce travail (Araújo et al., 2017; Asmae et al., 2021; Daoud et al., 2019; De-Melo et al., 2018a, 2018b; Lopes et al., 2020; Mărgăoan et al., 2021; Okatan et al., 2021; Pascoal et al., 2014; Saral et al., 2016; Sawicki et al., 2022; Soares de Arruda et al., 2021; Straumite et al., 2022; Yıldız et al., 2013; Žilić et al., 2014).

Des teneurs en flavonoïdes comparables à ceux de nos résultats sont constatés avec l'extrait du pollen Tunisien de cultivar de Tozeur et d'un autre échantillon de pollen Turc hétérofloral (Daoud et al., 2019; Gercek et al., 2021).

Cette variation est courante et peut être attribuée aux origines géographiques et aux conditions édaphoclimatiques différentes (Araújo et al., 2017; Nogueira et al., 2012). Cependant, le facteur le plus influent reste l'origine botanique (Bogdanov, 2004; Daoud et al., 2019; Estevinho et al., 2012).

D'autre part, l'ACP, effectuée sur les données de l'identification palynologique et les teneurs en composés phénoliques de nos extraits, montre une forte corrélation entre les taux des composés phénoliques avec les types de pollen *Oxalis* et *Juglans* (TPT : 0.651, TFT : 0.772 et TFlT : 0.501 respectivement) ; ce résultat corrobore avec l'étude réalisée sur 16 échantillons de pollen d'abeille collectés du Chili où les chercheurs ont constaté que le taux de polyphénols le plus élevé est dans l'échantillon de pollen contenant le type *Oxalis* (l'échantillon ayant l'*Oxalis* sp. avec une fréquence d'occurrence de 12.5% montre une teneur en polyphénols totales égale à 52.99 µg EAG/ mg). Dans cette même étude, il a été reporté un coefficient de corrélation (0.790) entre le type *Oxalis* et le taux de polyphénols comparable à celui enregistré (Velásquez et al., 2017).

Les profils phénoliques ont été déterminés par rapport à 14 standards chimiques appartenant aux différentes classes et sous-classes des polyphénols :

- 5 acides phénoliques dont 2 acides hydroxy benzoïques (l'acide gallique et l'acide hydroxybenzoïque) et 3 acides hydroxy cinnamiques (l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide cinnamique) ;
- 7 flavonoïdes dont 4 flavonols (la quercétine, la rutine, la fisétine et la myricétine), 1 flavanol (la catéchine), 1 flavanone (naringine) et 1 isoflavone (la génistéine) ;
- 1 de la sous-famille des coumarines (la coumarine) ;
- 1 aldéhyde phénolique, composé phénolique dérivé, (la vanilline).

Tableau 10. Synthèse bibliographique des travaux rapportant les teneurs des extraits de pollen en polyphénols, flavonoïdes et flavonols totaux. (*EAG : Equivalent à l'Acide Gallique, EAPC :Equivalent à l'acide protocatéchique, ECA :Equivalent à la Catéchine et EQ : Equivalent à la Quercétine)*

Pays d'origine	**Nombre d'échantillon**	**Nature de l'échantillon**	**Type d'extrait**	**TPT (**µg EAG/mg)	**TFT** (µg EQ/mg)	**TFlT** (µg EQ/mg)	**Référence**
Brésil	**4**	Mono/ et hétérofloraux	Ethanolique	Entre 33.73 et 75.60	Entre 1.42 et 9.05	-	(Araújo et al., 2017)
	56	Mono/ et hétérofloraux	Ethanolique et Méthanolique	Entre 6.7 ± 0.1 et 29.2 ± 0.3	Entre 0.3 ± 0.0 et 17.5 ± 0.1	-	(De-Melo et al., 2018a)
	8	Monofloraux	Ethanolique et Méthanolique	Entre 5.6 et 29.7	Entre 0.3 et 19.0	-	(De-Melo et al., 2018b)
	8	Hétérofloraux	Ethanoliques	Entre 6.10 ± 0.31 et 11.4 ± 0.31	Entre 0.30 ± 0.02 et 2.09 ± 0.02	-	(Lopes et al., 2019)
	62	Hétérofloraux	Ethanolique	Entre 19.28 ± 4.42 et 36.94 ± 1.57	Entre 4.60 ± 0.61 et 9.95 ± 1.10	-	(Soares de Arruda et al., 2021)
Espagne et Portugal	**8**	Hétérofloraux	Méthanolique	Entre 18.55 ± 0.95 et 32.15 ± 2.12	Entre 3.92 ± 0.68 et 10.14 ± 1.57 µg ECA/mg	-	(Pascoal et al., 2014)

Etats Unis d'Amérique	**6**	Hétérofloraux	Méthanolique	Entre 15.91 ± 0.05 et 34.85 ± 0.08	-	2.66 ± 0.07 à 5.48 ± 0.09	(LeBlanc et al., 2009)
Grèce	**1**	Hétérofloral	Méthanolique	10.49 ± 0.30	-	-	(Graikou et al., 2011)
Lettonie	**13**	Mono/hétérofloraux	Ethanoliques	Entre 4.71 ± 0.19 et 32.13 ± 1.26	-	-	(Straumite et al., 2022)
Maroc	**8**	Hétérofloraux	Ethanolique	Entre 8.07 ± 1.03 et 32.39 ± 0.15	-	0.20 ± 0.04 et 6.303±0.37	(Asmae et al., 2021)
Pologne	**1**	Hétérofloral	Méthanolique	32.52 ± 2.19	11.77 ± 0.15	-	(Sawicki et al., 2022)
Serbie	**7**	Hétéroloraux	Hydro-acétoniques	Entre 7.77 ± 0.21 et 9.93 ± 0.85	8.92 ± 0.12 et 15.00 ± 0.91	-	(Žilić et al., 2014)
Slovaquie	**1**	Monofloral	Ethanolique	0.96 ± 0.32	-	-	(Fatrcová-Šramková et al., 2013, 2016).

Tunisie	**2**	Monofloraux	Ethanolique	Entre 5.40 ± 0.87 et 237.11 ± 9.58	Entre 3.79 ± 0.26 et 75.10 ± 4.37	-	(Daoud et al., 2019)
Turquie	**1**	Hétérofloral	Ethanolique	173.52 ± 1.87 µg EAPC/mg	79.21 ± 5.89	-	(Gercek et al., 2021)
	18	Mono/hétérofloraux	Méthanoliques	Entre 16.40 et 41.17	7.72 et 2.39	-	(Mărgăoan et al., 2021)
	10	Monofloraux	Méthanoliques	Entre 5.05 ± 0.01 et 11.03 ± 0.01	Entre 1.53 ± 0.10 et 2.00 ± 0.01		(Okatan et al., 2021)
	1	Monofloral	Méthanolique	13.78 ± 0.34	1.64 ± 0.11	-	(Saral et al., 2016)
	20	Hétérofloraux	Méthanoliques	Entre 9.01 ± 0.05 et 13.08 ± 0.02	-	-	(Saral et al., 2022)
	1	Monofloral	Ethanolique	32.18 ± 0.25	-	-	(Şahin and Karkar, 2019)
	1	Hétérofloral	Méthanolique	28.87 ± 2.48	8.07 ± 0.83	-	(Yıldız et al., 2013)
Vietnam	**1**	Monofloral	Aqueux	10.62 ± 0.18	-	-	(Quoc, 2021)

Les résultats de l'analyse LC-MS ont révélé des profils phénoliques dissemblables sur les plans qualitatif et surtout quantitatif entre les 8 extraits étudies. Les extraits de Jijel et de Sétif ont deux profils apparentés avec une présence des mêmes molécules à différentes proportions.

La rutine est la composante majoritaire pour les extraits de Jijel, Khenchela, Sétif, Skikda et Tizi Ouzou. La naringine est omniprésente dans tous nos extraits. Bien que la myricétine est la seule composante qui n'a pas été détectée dans aucun échantillon.

Un résultat similaire a été constaté dans un extrait éthanolique d'un échantillon de pollen hétérofloral collecté en Turquie, où le profil phénolique, réalisé à partir de 23 standards chimiques, dont 7 sont parmi les composants ciblés dans cette étude, a montré que la rutine est la composante la plus abondante (0.115 µg/mg). Cependant, la myricétine, à l'encontre de ces résultats, a été détectée à un taux égal à 2.220×10^{-3} µg/mg. Alors que la naringine, présente dans tous nos échantillons, n'a pas été détectée (Gercek et al., 2021).

Dans une autre étude réalisée sur un échantillon de pollen hétérofloral, le profil phénolique de l'extrait méthanolique, obtenu par rapport à 18 standards chimiques dont 6 étaient partagés avec nos profils, a marqué une absence de l'acide gallique et de l'acide caféique d'une part et d'autre part des taux très faible des composants détectés comparativement à ceux constatés dans notre étude (Saral et al., 2022).

Un profil phénolique d'un extrait éthanolique de pollen d'abeille, collecté en Turquie, réalisé par rapport à 23 composants phénoliques parmi lesquels 6 sont concerné par notre étude, a indiqué l'absence de la rutine, la vanilline et la catéchine. Les taux des composants détectés sont très proches à ceux constatés dans notre résultat (Kahraman et al., 2022).

Dans une autre étude réalisée au Brésil sur un total de 56 différents échantillons de pollen d'abeille mono- et hétérofloral, les profils phénoliques rapportés sont très hétérogènes. La rutine et la quercétine sont les deux composantes les plus fréquentes. La catéchine est répertoriée dans 14 échantillons, suivi par l'acide férulique et l'acide cinnamique dans 10 différents échantillons de pollen d'abeille, puis la naringine dans 9 échantillons. L'acide caféique et l'acide gallique ont été retrouvé dans seulement 3 et 2 échantillons respectivement. Les quantités constatées sont très faibles comparativement à nos échantillons (De-Melo et al., 2018a).

Le profil phénolique d'un extrait éthanolique de pollen d'abeille hétérofloral, collecté au Brésil, et réalisé à partir de 18 composants phénoliques dont 8 composants partagés avec cette étude,

a montré que les quantités détectées sont très faible comparativement à celles enregistrées (De-Melo et al., 2018b).

La rutine (0.70 µg/mg) est une des composants détectés dans l'analyses du pollen d'abeille du Maroc (El Ghouizi et al., 2020). Dans 7 échantillons de pollen d'abeille de maïs collectés de la Serbie, la rutine (0.13×10^{-3} à 1.86×10^{-3} µg/mg) et la quercétine (1.00×10^{-3} à 10.05×10^{-3} µg/mg) et ses dérivées glycosylées ont été détectées (Žilić et al., 2014).

Toutes ces constatations confirment la grande muabilité de la composition phénolique des pollen d'abeille en fonction de l'origine botanique, la provenance, les conditions édaphoclimatiques et l'activité apicole (Araújo et al., 2017; Bogdanov, 2004; Daoud et al., 2019; Estevinho et al., 2012; Mărgăoan et al., 2021; Nogueira et al., 2012).

3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

Nos résultats montrent que les CI_{50} obtenues par les tests au DPPH, à l'ABTS et de blanchissement du β-carotène sont dans l'intervalle compris entre 62.77 ±1.08 et 382.92 ± 2.45 ; 23.74 ± 0.47 et 92.74 ± 1.46 et de 98.59 ± 2.33 à > 800 µg/mL respectivement. De plus, les $A_{0.5}$ obtenues par les tests FRAP et CUPRAC varient de 143.10 ± 2.67 à >200 et de 42.30 ± 0.72 à 84.00 ± 2.65 µg/mL respectivement.

Différentes études ayant comme but d'évaluer le pouvoir antioxydant du pollen d'abeille ont été menées (Tableau 11). Des activités antioxydantes, constatées par l'utilisation d'un ou d'une combinaison de tests antioxydants DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC et β-carotène, proches à celles de cette investigation sont rapportées dans différentes études (Daoud et al., 2019; De-Melo et al., 2018a, 2018b; Gercek et al., 2021; Lopes et al., 2019; Straumite et al., 2022).

Des activités antioxydantes très faibles comparativement aux extraits étudiés sont notées dans de nombreuses études : Araújo et al., 2017 ; Soares de Arruda et al., 2021 au Brésil, Pascoal et al., 2014 à l'Espagne et au Portugal, Graikou et al., 2011 à la Grèce, Asmae et al., 2021 au Maroc, Fatrcová-Šramková et al., 2016, 2013 au Slovaquie et Okatan et al., 2021; Yıldız et al., 2013 au Turquie.

De très fortes activités antioxydantes comparativement aux notre ont été reportées sur des extraits de pollen Américain (LeBlanc et al., 2009) et Turque (Şahin et al., 2019; Saral et al., 2016, 2022)

Les tests GOR, à la 1,10-Phénanthroline et SNP viennent de confirmer l'activité antioxydante des extraits et d'appuyer les résultats obtenus avec les tests au DPPH, à l'ABTS, FRAP, CUPRAC et de blanchissement du β-carotène.

Les résultats de la RCP a permis de combiner toutes les méthodes antioxydantes utilisées et à projeter les extraits ayant la meilleure activité antioxydante. Les extraits de Skikda et de Jijel ont la meilleure activité antioxydante. Ce résultat peut être expliqué par le fait d'avoir deux profils phénoliques apparentés avec une présence des mêmes molécules à différentes proportions dont la rutine est la composante majoritaire. Cette dernière appartient aux flavonoïdes du sous-groupe des flavonols connus par leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires puissants (Panche et al., 2016; Rzepecka-Stojko et al., 2015).

La rutine, appelée également vitamine P ou quercetine-3-O-rutinoside, est un dérivé de la quercétine glycosylée. Divers mécanismes se sont révélés responsables de ses activités antioxydantes dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Choi et al., 2021; J. Yang et al., 2008). Sa structure chimique peut directement piéger les ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Enogieru et al., 2018). Elle augmente la production du glutathion (GSH) et régule positivement les systèmes de défense oxydatifs par une expression accrue de nombreuses enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) (Al-Enazi, 2014; Kandemir et al., 2015; Mahgoub et al., 2009). La rutine inhibe aussi la xanthine oxydase qui est impliquée dans la génération de ROS (Kostić et al., 2015).

En conséquence, la rutine est utile dans le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire et peut donc être efficace contre les complications secondaires liées au stress oxydatif (S. Singh et al., 2019).

Tableau 11. Synthèse bibliographique des travaux rapportant les activités antioxydants des extraits de pollen.
(*P.I. : Pourcentage d'Inhibition*)

Pays d'origine	**Nombre d'échantillon**	**Nature de l'échantillon**	**Nature de l'extrait**	**DPPH CI_{50} (µg/mL)**	**ABTS CI_{50} (µg/mL)**	**FRAP $A_{0.5}$ (µg/mL)**	**CUPRAC $A_{0.5}$ (µg/mL)**	**β-carotène CI_{50} (µg/mL)**	**Référence**
Brésil	4	Mono/ et hétérofloraux	Ethanolique	> 800	> 800	> 800	-	> 800	(Araújo et al., 2017)
	56	Mono/ et hétérofloraux	Ethanolique et Méthanolique	Entre 10 ± 0.2 et 155 ± 5	-	-	-	-	(De-Melo et al., 2018a)
	8	Monofloraux	Ethanolique et Méthanolique	Entre 36 ± 0.2 et 95 ± 1	-	-	-	-	(De-Melo et al., 2018b)
	8	Hétérofloraux	Ethanoliques	Entre 178.91 ± 1.09 et 597.93 ± 0.96	Entre 34.30 ± 0.22 et 235.19 ± 0.19	Entre 46.35 ± 0.44 et 305.90 ± 4.66	-	-	(Lopes et al., 2019)
	62	Hétérofloraux	Ethanolique	> 800	-	-	-	P.I. : 81.94 ± 11.34 % pour des doses de 40 mg/mL	(Soares de Arruda et al., 2021)
Espagne et Portugal	8	Hétérofloraux	Méthanolique	> 800	-	-	-	-	(Pascoal et al., 2014)
Etats Unis d'Amérique	6	Hétérofloraux	Méthanolique	Entre 11.35 ± 3.46 et 75.90 ± 1.19	-	Entre 240.31 ± 20.0 et 3220 ± 170	-	-	(LeBlanc et al., 2009)
Grèce	1	Hétérofloral	Méthanolique	181.4 ± 1.7	-	-	-	-	(Graikou et al., 2011)
Lettonie	13	Mono/ hétérofloraux	Ethanoliques	Entre 33.6 ± 0.8 et 126.4 ± 2.4	Entre 32 ± 1.6 et 176.8 ± 5.6	-	-	-	(Straumite et al., 2022)

Maroc	8	Hétérofloraux	Ethanolique	Entre 245 ± 0.9 et 832 ± 6.9	Entre 190 ± 0.5 et 896 ± 5.1	Entre 133 ± 3.6 et 790 ± 17.5	-	-	(Asmae et al., 2021)
Pologne	**1**	Hétérofloral	Méthanolique	61.09 ± 4.28	97.68 ± 0.91	192.35 ± 4.28	-	-	(Sawicki et al., 2022)
Slovaquie	1	Monofloral	Ethanolique	> 800	-	> 800	-	-	(Fatrcová-Šramková et al., 2013, 2016).
Tunisie	2	Monofloraux	Ethanolique	144.86 ± 0.54	-	-	-	> 800	(Daoud et al., 2019)
Turquie	1	Hétérofloral	Ethanolique	-	-	-	85.59 ± 5.95	-	(Gercek et al., 2021)
	10	Monofloraux	Méthanoliques	> 800	-	-	-	-	(Okatan et al., 2021)
	1	Monofloral	Méthanolique	490 ± 2.60	-	48,7 ± 1.00	-	-	(Saral et al., 2016)
	20	Hétérofloraux	Méthanoliques	-	-	Entre 35.64 ± 0.34 et 74.86 ± 0.08 µmol équivalent à $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	(Saral et al., 2022)
	1	Monofloral	Ethanolique	-	146.18 ± 2.14	6.12 ± 0.22	-	-	(Şahin and Karkar, 2019)
	1	Hétérofloral	Méthanolique	620.00 ± 1.0	-	82.31 ± 2.41	-	-	(Yıldız et al., 2013)

4. Analyse des protéines du pollen d'abeille

Les protéines sont l'un des principaux composants du pollen d'abeille, leur teneur est très variable selon les espèces végétales (10 à 40% de poids sec) (Ares et al., 2018). Les taux des protéines totales étudiés sont compris entre 14.03 ± 0.43 et 19.13 ± .01 mg/g. Nos résultats sont différents à ceux rapportés dans une étude réalisée sur le pollen d'abeille de la Bulgarie 162.7 ± 0.2 mg/g (Marinova et al., 2010).

La SDS-Page montre que les profils électrophorétiques de nos protéines polliniques sont formés de 3 à 6 bandes protéiques dont le poids moléculaire est compris entre 42 et 95 KDa, et corrobore avec les résultats de plusieurs études qui ont rapporté que les poids moléculaires des protéines polliniques varient de 10 à 94 KDa (Matsumoto et al., 2019; Radauer et al., 2006; Sénéchal et al., 2015; Yagami et al., 2019).

L'analyse des protéines polliniques a confirmé la grande diversité du pollen d'abeille en métabolites primaires (exemple des protéines) et secondaires (polyphénols).

5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

L'activité anti-inflammatoire des extraits éthanoliques du pollen d'abeille a été déterminée par le test d'œdème de la patte induit par le formaldéhyde chez le rat. Ce test est couramment utilisé comme modèle pour l'évaluation des activités antinociceptives et anti-inflammatoires *in vivo*. Il est basé sur l'induction d'une réaction inflammatoire neurogène médiée par des neuropeptides tels que la substance P (Damas et al., 1999).

Dans cette étude le diclofénac sodique, choisi comme molécule de référence, est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) éprouvé aux propriétés antipyrétiques, anti-inflammatoires et analgésiques. Il exerce son action via l'inhibition équipotente des cyclooxygénases (COX-1 et 2). Des recherches approfondies indiquent que ses mécanismes d'action vont au-delà de l'inhibition de la COX et démontrent qu'il peut inhiber la substance P, les enzymes lipoxygénases, influencer la libération et l'absorption de l'acide arachidonique, activer la voie antinociceptive dépendante de l'oxyde nitrique (NO, *Nitric Oxide*) et de la Guanosine monophosphate cyclique (GMPc), ainsi que l'altération de production d'interleukine-6 (Figure 39) (Amanullah et al., 2022; Gan, 2010).

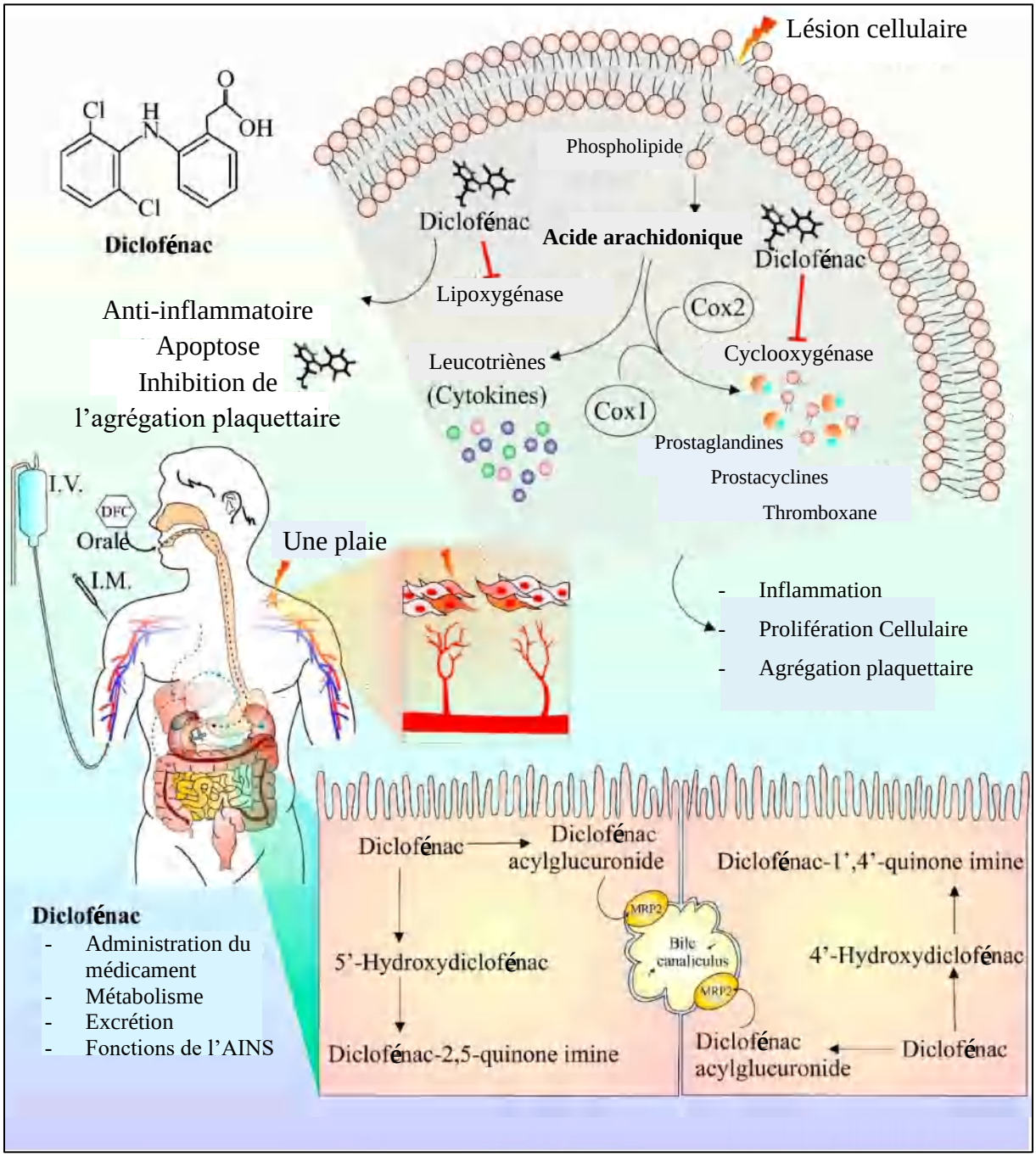


Figure 39. Structure chimique, mécanisme d'action, voie d'administration et métabolisme du diclofénac (Amanullah et al., 2022).

Il existe très peu d'études sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire du pollen d'abeille et particulièrement *in vivo*. La majorité de nos extraits de pollen ont inhibé la formation d'œdème de la patte. Un effet homologue a été constaté pour un extrait éthanolique de pollen d'abeille monofloral (*Cistus sp.*) collecté en Espagne à des doses similaires (100 et 300 mg/Kg) (Maruyama et al., 2010).

Dans deux travaux Brésiliens, les extraits hydro-éthanoliques du pollen d'abeille de l'abeille *M.fasciculata* (Lopes et al., 2019) et de l'abeille *S.aff.postica* (Lopes et al., 2020) ont montré une forte activité anti-inflammatoire à une dose comparable (250 mg/Kg) et ceux par une forte inhibition du développement de l'œdème dans les deux différents tests d'œdème de la patte induits par la carraghénane ou par le dextran.

Ces résultats peuvent renforcer l'hypothèse supposant que l'extrait de pollen d'abeille agit par l'inhibition de la COX-2 et probablement aussi par l'inhibition de la libération de l'oxyde nitrique (NO) ou/et comme antagoniste des récepteurs de l'histamine H1 (Lopes et al., 2019).

Dans le modèle d'œdème de patte induit par le formaldéhyde chez la souris, Choi, 2007 a noté que l'extrait éthanolique du pollen d'abeille de pin (*Pinus densiflora*), administré à une dose de 200 mg/Kg, possède une forte activité anti-inflammatoire. Cette activité est significativement meilleure que celle du médicament anti-inflammatoire l'indométacine (10 mg/kg). Ce résultat corrobore le résultat observé avec l'extrait de Jijel qui était significativement meilleure que le Diclofénac à 20mg/Kg.

Les résultats de l'ACP réalisées entre les différentes variables de l'analyse palynologique, composants phénoliques et l'activité anti-inflammatoire ont montré qu'il n'y a aucune corrélation entre les teneurs totales des composés phénoliques des échantillons avec l'activité anti-inflammatoire (0,057, -0,042 et -0,167, respectivement). Ainsi, la variation notée dans l'activité anti-inflammatoire entre les 8 extraits de pollen d'abeille ne peut pas être expliquer par les teneurs en composants phénoliques. Des taux égaux en composés phénoliques totaux entre deux échantillons n'impliquent pas une composition identique ni un même profil phénolique, d'autant plus que les origines botaniques de nos échantillons de pollen d'abeille sont différentes.

Les fortes activités anti-inflammatoires enregistrées avec les extraits de Jijel et de Skikda comparativement aux extraits restant est expliquée aussi par leurs richesses en rutine. Actuellement, plusieurs études ont démontré l'implication de ce bioflavonol dans la modulation de la réponse immunitaire et ont élucidé ses différents mécanismes d'action (Syahputra et al., 2022). Ce composé est impliqué dans l'inhibition de la sécrétion des TNF_{α}, l'oxyde nitrique, l'IFN_{γ}, IL-1_{β}, IL-6, le MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*, appelé aussi le CCL2), la MPO (myéloperoxydase) et la cyclooxygenase-2 (COX-2) (Chen et al., 2022). En plus, la rutine réduit l'expression du récepteur purinergique P2X7 des cellules immunitaires (récepteurs purinergiques sensibles à l'ATP) et de la NLRP3 (*Nod-Like Receptor family pyrin domain containing 3*) impliquée dans la formation de l'inflammasome (Pandey et al., 2021). La rutine

agit encore par la suppression de l'IKK$_{\alpha/\beta}$ (*Inhibitory Kappa B kinase*), I-κB$_{\alpha}$ et la NFκB, des molécules de signalisation cellulaire responsable du déclenchement de la réaction inflammatoire et de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Muvhulawa et al., 2022; Shen et al., 2022). La rutine est connue aussi par sa capacité à améliorer les niveaux des antioxydantes intracellulaires, tels que : le glutathion, le glutathion peroxydase, le glutathion S-transférase, le glutathion réductase, la superoxyde dismutase et la catalase (Ravi et al., 2018).

La très faible activité anti-inflammatoire constatée avec les extraits de Guelma et de Boumerdès peut être attribué à l'absence de la rutine de ces échantillons.

Les pouvoir anti-inflammatoires et antioxydants très différents entre les 8 extraits peuvent être expliquer par les profils phénoliques hétérogènes obtenus par LC-MS. Le fait d'avoir deux profils phénoliques qualitativement homologues entre les extraits de Jijel et de Sétif démontre pourquoi ces extraits ont révélé un comportement similaire traduit par la meilleure activité anti-inflammatoire et antioxydante.

6. Evaluation de l'activité anti-allergique *in vivo*

L'évaluation de l'activité anti-allergique du pollen *in vivo* a été réalisée sur un modèle animal d'allergie respiratoire. En effet, une allergie a été provoquée, chez les rats, induite par les protéines du pollen. La réussite de ce modèle est constatée macroscopiquement par l'observation de quelques manifestations symptomatiques chez les rats rendus allergiques et confirmée microscopiquement par les résultats de l'étude histologique.

Tous les rats du lot Allergie ont présenté des scores allergiques justifiant le stade 5 et ceux à partir du 1er jour de la sensibilisation jusqu'au 4ème jour. Les protéines du pollen de Jijel ont été utilisées comme allergènes pour immuniser et sensibiliser les rats. Les résultats de l'évaluation des symptômes ainsi que de l'étude histologique indique que cet échantillon de pollen dispose de protéines à fort pouvoir allergisant. Même si cet extrait est le moins riche en bandes protéiques dans la SDS-page (seulement 3 bandes ont été détectées : 65.5 ;74.5 et 90.5 KDa), il a permis d'installer une réaction allergique chez tous les rats des deux lots (Allergie et Allergie + Extrait de Pollen).

Ce potentiel allergisant peut être expliqué par rapport à l'origine botanique de cet échantillon dont le type *Quercus* est le plus fréquent (22.92%). Ce dernier appartient à la famille Fagaceae appartenant à l'ordre *Fagal* regroupant les arbres ayant le pollen le plus allergisant renfermant principalement les allergènes Bet v 1 (principale cause d'allergie respiratoire observée au début

du printemps), Bet v 2, Bet v 3, Bet v 4, Car b 1 et Que a 1 (Biedermann et al., 2019; Huerta-Ocampo et al., 2020; Loria et al., 1989; Wallner et al., 2009; Ziemianin et al., 2021). En outre, cet échantillon est formé à 20.75 % de pollen appartenant à la famille Asteraceae ayant de pollen très riche en allergènes de types Ama r 1 (membre de la famille des Ole e-1 like, très connue par son pouvoir allergène) et Art v 1 (Vakili Moghaddam et al., 2019). Tous les allergènes cités ci-dessus ont un poids moléculaire compris entre 9 et 18 KDa (sauf l'Art v 1 28 KDa) et donc ne font pas partie de la plage de séparation (20 à 200 KDa) du gel (12 % en acrylamide) utilisé dans notre électrophorèse SDS-Page, ce qui explique l'absence de ses bandes du notre profil électrophorétique. Pour l'Art v 1, la SDS-Page a confirmé son absence de nos échantillons suite à l'absence d'une bande équivalente à son poids moléculaire.

L'administration par voie orale de l'extrait éthanolique de Jijel, doté de la plus forte activité anti-oxydant et anti-inflammatoire, a permis de réduire l'intensité de la réaction allergique chez les rats du lot combiné (Allergie + Extrait de Pollen) comparativement à celle des rats non-traités par l'extrait. Cette diminution est constatée par une réduction des fréquences de grattements, des difficultés respiratoires avec un pourcentage de 24 % et 16.67 % respectivement, ainsi que l'amélioration de la capacité de mobilité avec un pourcentage de 7.58 %. Les résultats de l'étude histologique ont confirmé cet effet en notant une structure pulmonaire saine ressemblant à celle du contrôle.

L'électrophorèse des protéines sériques a révélé, chez les rats allergiques, une diminution des taux de l'albumine totale ainsi que celui des protéines Alpha 1, avec une apparition d'un bloc Bêta 2 – gamma accompagné d'une hypergammaglobulinémie. Ces résultats indiquent un état inflammatoire chronique (Emile, 2013). L'hypoalbuminémie est le résultat de l'hypercatabolisme due à l'inflammation. L'hyper α1-globulinémies est provoquée par la forte sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation, principalement l'alpha-1-glycoprotéin (connue aussi sous le nom « Orosomucoïde ») et l'alpha-1-antitrypsine. L'hypergammaglobulinémie est peut-être le résultat d'une libération massive des immunoglobulines de type IgE (Cellier et al., 2018; Szymanowicz et al., 2006).

Chez les rats allergiques traités par l'extrait éthanolique du pollen d'abeille, on remarque la disparition du bloc Bêta 2 – gamma avec une réapparition de la faction Bêta 2 et une diminution significative du taux des gammas globulines, comparativement aux rats allergiques non-traités par l'extrait de pollen. On note aussi un taux des protéines alpha 1 non-significativement différent à celui du lot contrôle. Ces constatations renforcent d'une part celles des résultats des

études comportementales et histologiques et d'autre part confirme l'effet anti-allergique de l'extrait éthanolique du pollen d'abeille de Jijel.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes d'action régissant l'effet anti-allergique du pollen d'abeille. Il a été démontré *in vitro* que le pollen d'abeille est capable d'inhiber la dégranulation des mastocytes quand il est ajouté au moment de la sensibilisation aux IgE. En inhibant la liaison des IgE aux mastocytes sans influencer l'expression de FcεRI (le récepteur de haute affinité pour la région Fc des IgE). Il inhibe, également les voies de transduction du signal dans les mastocytes dérivés de la moelle osseuse (BMMC : *Bone Marrow-derived Mast Cells*). Des doses faibles du pollen d'abeille (0.1–1 µg/mL) ont démontré une grande capacité à inhiber la production du TNFα par les mastocytes (Ishikawa et al., 2008; Khalifa et al., 2021).

In vivo sur un modèle murin d'allergie induite par l'OVA, l'extrait phénolique du pollen d'abeille a réduit la production des IgE et des IgG_1. Ces deux immunoglobulines se lient aux récepteurs FcεRI et FcεRIII respectivement, sur la surface des mastocytes et activent ces cellules pour libérer les médiateurs inflammatoires, y compris les cytokines pro-inflammatoires (Medeiros et al., 2008).

En outre, il a permis à la fois l'inhibition de la migration cellulaire vers les poumons et l'activation des éosinophiles (Jannesar et al., 2017).

Toutes ces observations peuvent être expliquées par la richesse du pollen d'abeille en flavonols, notamment la rutine pour l'extrait étudié. Cette molécule est dotée d'une forte activité anti-allergique par une inhibition de la sécrétion d'histamine, la production des IL-4 et 13 en plus de l'expression du ligand de CD40 par les mastocytes et les basophiles. Ce flavonol réduit la libération d'histamine par les mastocytes et les basophiles à travers la diminution du calcium intracellulaire, l'inhibition de la phosphorylation de la protéine kinase Cθ, l'AMP cyclique phosphodiestérase et l'ATPase dépendante du calcium (Figure 40) (Jannesar et al., 2017; Kawai et al., 2007).

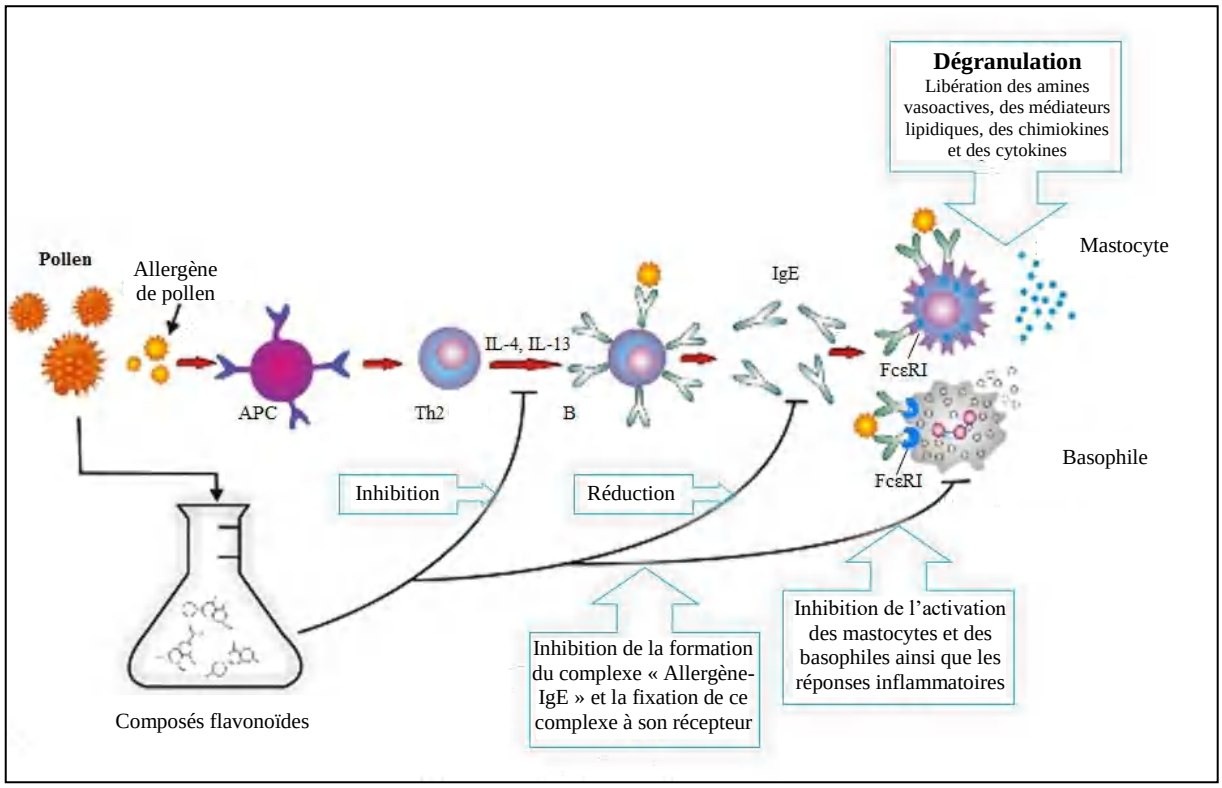


Figure 40. Illustration des mécanismes d'action du pollen et de ces composés flavonoïdes sur la réponse immunitaire (Jannesar et al., 2017).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'intérêt de ce travail est l'évaluation de la relation entre la constitution chimique et biochimique du pollen d'abeille et ses pouvoirs antioxydants, anti-inflammatoires et anti-allergiques.

Huit échantillons de pollen d'abeille collectés de diverses régions du Nord algérien sont analysés palynologiquement afin d'identifier les origines botaniques. A partir des extraits éthanoliques, les teneurs en composés phénoliques totaux sont déterminées ainsi que le profil phénolique qualitatif et quantitatif. L'activité antioxydante et anti-inflammatoires des extraits sont évaluées *in vitro* et *in vivo*, respectivement. Les protéines totales des huit échantillons sont mesurées spectroscopiquement et les profils électrophorétiques, obtenus par SDS-Page, sont ainsi comparés. L'extrait ayant montré la meilleure activité anti-inflammatoire est utilisé pour estimer le pouvoir anti-allergique *in vivo* sur un modèle animal d'allergie respiratoire au pollen. Le pouvoir anti-allergique est constaté par une étude comportementale des symptômes allergiques, une analyse des protéines sériques totales et a été confirmé par l'étude histologiques des poumons.

L'analyse palynologique révèle que tous les échantillons de pollen d'abeilles sont hétérofloraux. Au total, 40 types de pollen appartenant à 20 familles botaniques ont été identifiés. Le type *Cistus* est présent dans tous les échantillons, alors que la famille la plus abondante est Brassicaceae (23.15 % du total des types de pollen).

L'étude phytochimique indique que les extraits éthanoliques du pollen d'abeilles sont très riches en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et flavonols) et les profils phénoliques ont confirmé la présence d'une différence en molécules bioactives entre les différents extraits, ce qui affirme que la composition de pollen d'abeille est affectée par les facteurs de l'origine botanique et les conditions édaphoclimatiques.

Les 8 tests antioxydants soulignent que tous les extraits éthanoliques possèdent un fort pouvoir antioxydant. La RCP démontre que la meilleure activité antioxydante est celle des extraits de Jijel et de Skikda.

L'analyse des protéines totales du pollen d'abeilles ne montre aucune différence entre l'échantillons sur le plan quantitatif. Cependant, les profils électrophorétiques révèlent une différence significative sur le plan qualitatif entre les échantillons de pollen.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire note des effets controversés entre une forte activité anti-inflammatoire observée avec l'extrait de Jijel et de Skikda, une activité modérée enregistrée avec les extraits de Sétif, Khenchela, Tizi Ouzou et Constantine et une absence d'activité anti-inflammatoire avec les extraits de Guelma et Boumerdès. La forte activité anti-inflammatoire a été corrélée à la présence de la Rutine dans l'extrait étudié.

La réussite du modèle animal d'allergie au pollen est constatée chez tous les rats par une manifestation comportementale du stade allergique 5 et confirmée par l'étude histologique des poumons. Par conséquent, le pollen de Jijel dispose de protéines ayant un fort pouvoir allergisant.

L'évaluation de l'activité anti-allergique de l'extrait éthanolique de Jijel montre que ce dernier est doté d'une bonne activité anti-allergique.

Dans l'ensemble, le pollen d'abeille représente une bonne source de molécules bioactives possédant un fort potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-allergique. A cet égard, nous suggérons qu'il serait très intéressant de l'exploiter dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

Les données issues de ce travail restent préliminaires, il serait très intéressant de réaliser d'autres travaux complémentaires afin de pouvoir mieux identifier les molécules bioactives du pollen d'abeille d'une part et d'autre part de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces dernières.

En perspectives, il sera bénéfique d'investiguer l'effet du pollen d'abeille sur :

- l'infiltration et l'activation des leucocytes : mastocytes, neutrophiles et basophiles ;
- la production cytokinique, principalement ceux liées à la réponse Th2 et secrétées par les Treg ;
- ainsi que d'autres modèles animaux pour étudier les allergies respiratoires et l'inflammation.

Annexe

Annexe 1

Géolocalisation des ruchers :

Constantine

Hambeli, Ibn Badis

36.321639, 6.922083 (36°19'17.9"N 6°55'19.5"E)

Guelma

36.561298,7.439029 (36°33'40.7"N 7°26'20.5"E)

Setif

Krima, Draa Kebila

36.447605,4.962534 (36°26'51.4"N 4°57'45.1"E)

Tizi-Ouazou

Sidi Ali Bounab, Naciria

36.697250, 3.851361 (36°41'50.1"N 3°51'04.9"E)

Jijel

Bni Belaid (Kheïri Oued Adjoul)

36.877077,6.141700 (36°52'37.5"N 6°08'30.1"E)

Khenchla

Aïn Touila

35.446297, 7.338573 (35°26'46.7"N 7°20'18.9"E)

Skikda

Bissy, Azzaba

36.773440, 7.022945 (36°46'24.4"N 7°01'22.6"E)

Annexe 2

Paramètres de fonction de LC-MS :

L'instrument a été mis en fonction selon les paramètres suivants :

- mode d'ionisation : positive et négative ;
- tension capillaire : 4,0 kV ;
- température : 325°C ;
- débit du gaz de désolvatation : 12,0 L/min ;
- pression de nébulisation : 50 Psig.

Annexe 3

Electrophorèse SDS-Page

Préparation du gel de séparation

Pour préparer 10 mL d'une solution mère à 12 % d'acrylamide, 3.3 mL d'eau ultrapure sont mélangées dans l'ordre avec 4 mL du mix d'Acrylamide 30 %, 2.5 mL de 1.5 M Tris (pH 8.8), 0.1 mL de SDS 10%, 0.1 mL d'ammonium persulfate 10 % (APS 10 %) et 5 µl de TEMED (N,N,N',N'-Tétraméthyléthylène diamine). Le coulage du gel doit se faire immédiatement après l'ajout de l'APS et du TEMED, deux composés responsables de la polymérisation de la solution d'acrylamide en une matrice de gel.

Préparation du gel de concentration à 5 %

Pour préparer une solution de 5 mL, 3.4 mL d'eau ultrapure sont mélangées dont l'ordre avec 0.85 mL du mix d'Acrylamide 30 %, 0.5 mL de 1 M Tris (pH 6.8), 50 µL de SDS 10%, 50 µL de l'APS 10 % et 0.02 ml de TEMED.

Préparation du tampon de migration

4.5 grammes de Tris base (Trizma base®, Sigma-Aldrich) sont mélangés avec 21.6 grammes de glycine (Sigma-Aldrich) et 1.5 gramme de SDS (Sigma-Aldrich). Ensuite, l'eau ultrapure est ajoutée en quantité suffisante pour (q.s.p.) un volume final de 1.5 L. Le pH est ajusté à 8.

Préparation du tampon de charge

5 mL de glycérol sont mélangés avec 2 mL de SDS (10 %), 0.5 mL de β-mercaptoéthanol, 1 mL du bleu de Bromophénol (1%) et 0.9 mL d'eau ultrapure. Le tampon est conservé à 4°C.

Préparation de la solution de coloration

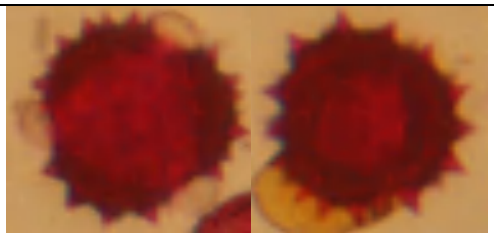
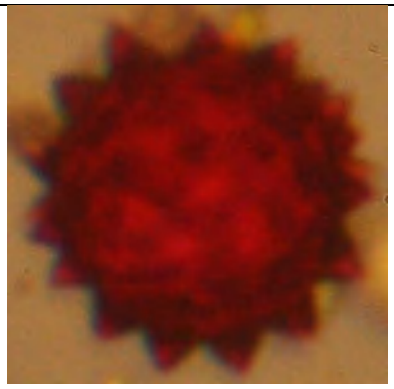
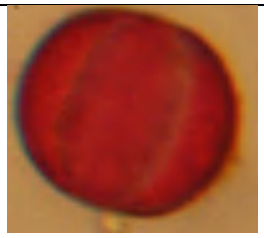
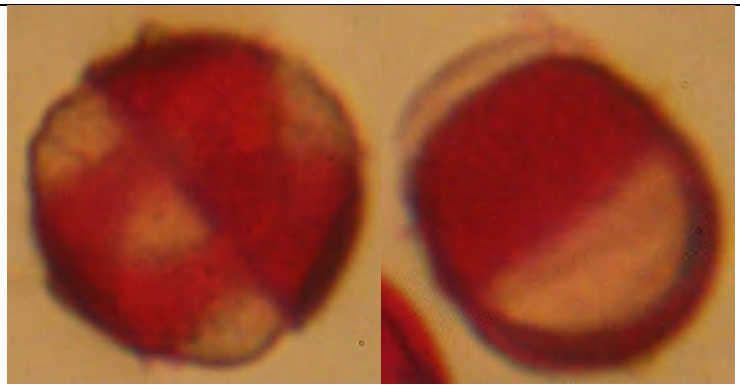
1.5 g de bleu de Coomassie G250 est ajouté à 455 mL d'éthanol pur. Après dissolution du colorant dans l'éthanol sous agitation, 300 mL d'eau distillée sont rajoutés, puis, 75 mL d'acide acétique pure. Finalement, une q.s.p. 1 L à l'eau distillée. La solution doit être filtré sur papier Whatman avant utilisation.

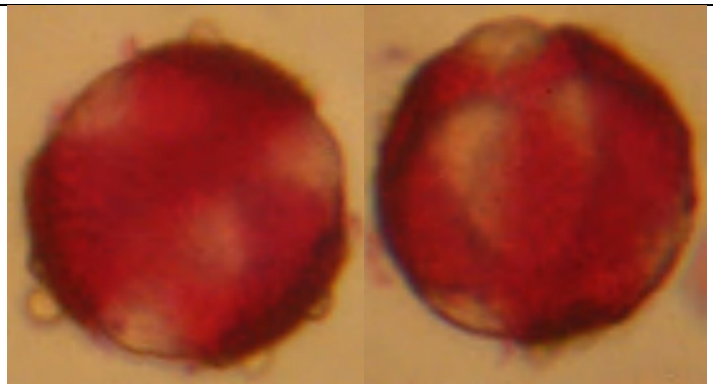
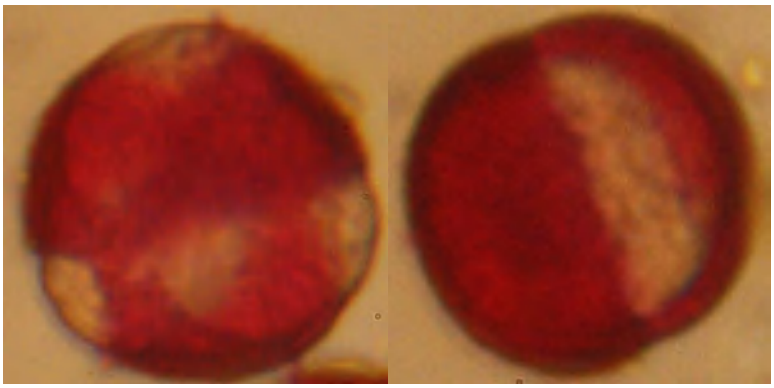
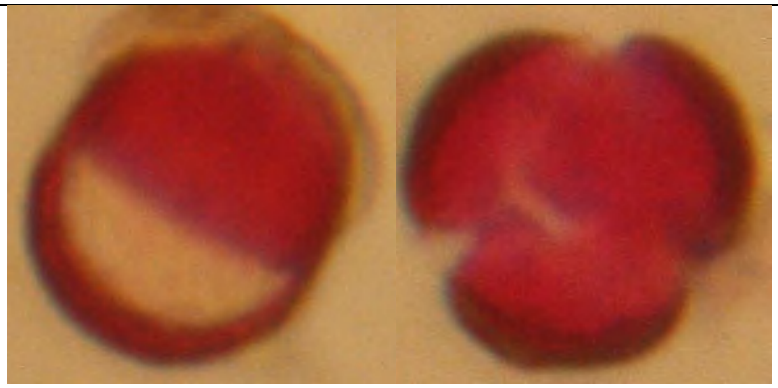
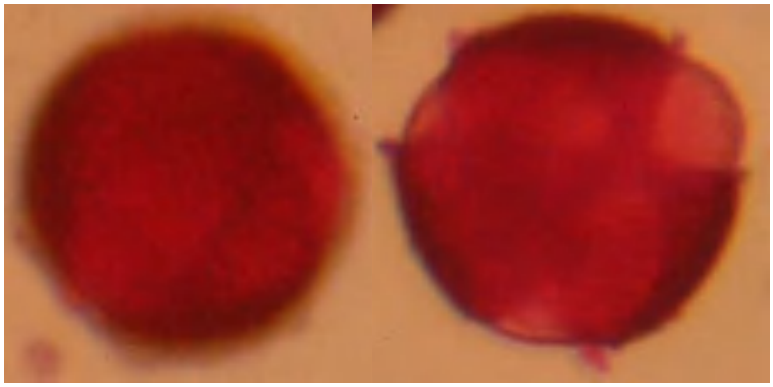
Paramètre du générateur lors de la migration

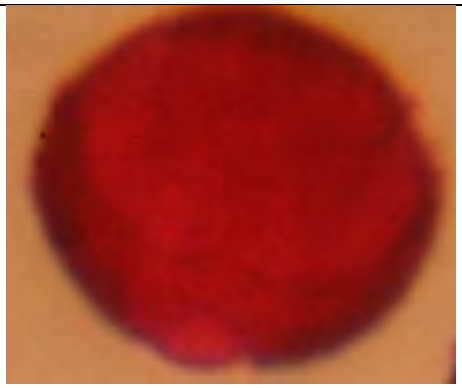
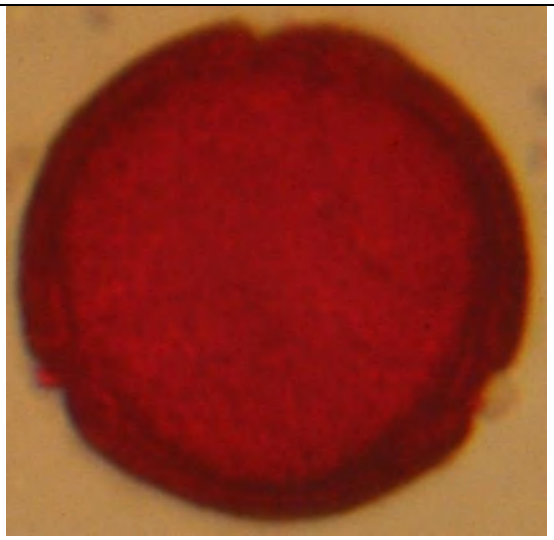
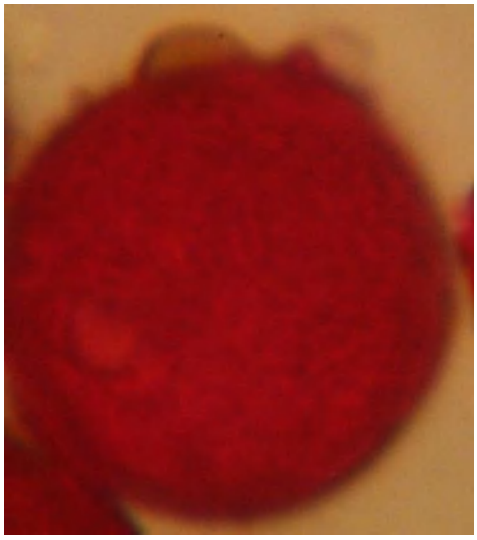
- tension : 300 V ;
- intensité : 150 mA ;
- durée : 2 Heures.

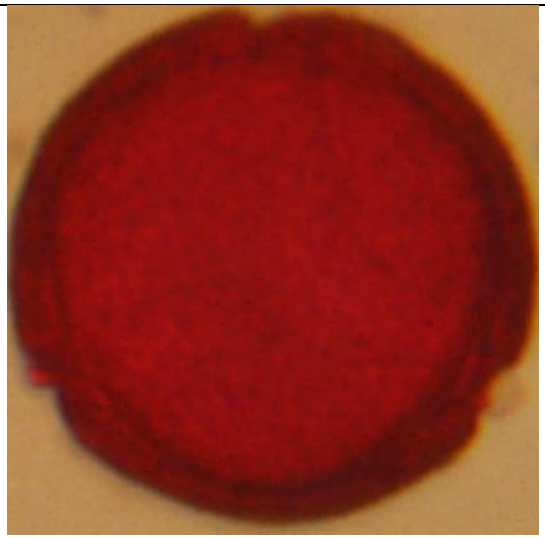
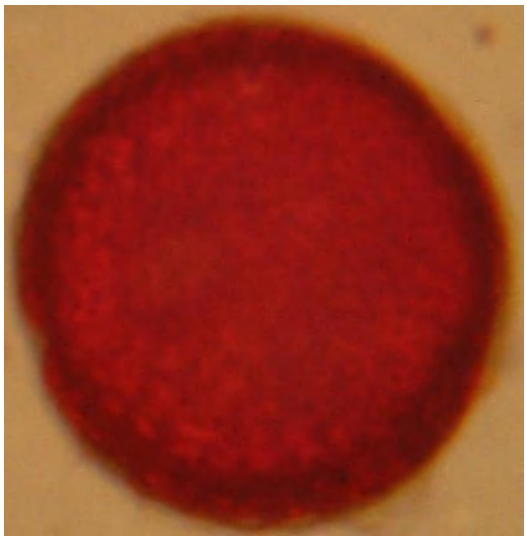
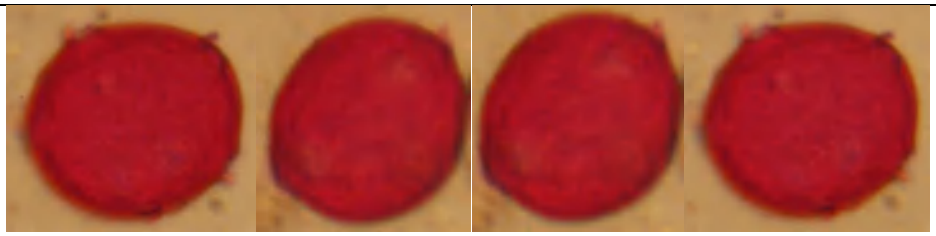
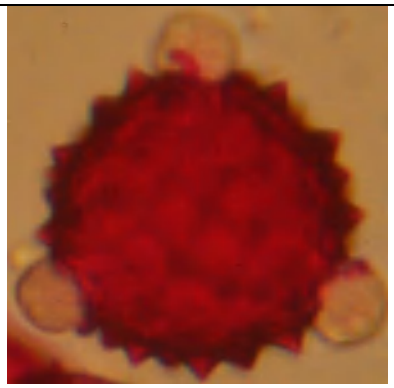
Annexe 4

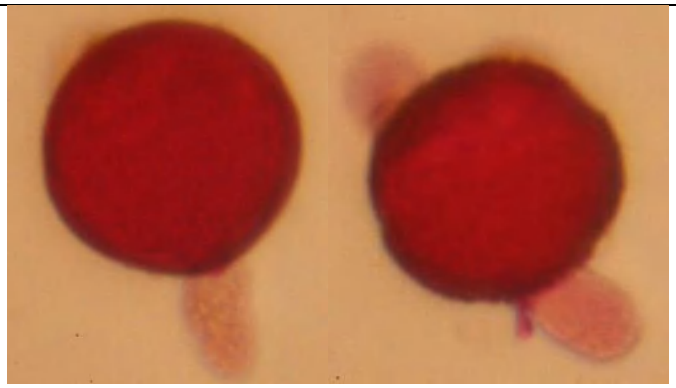
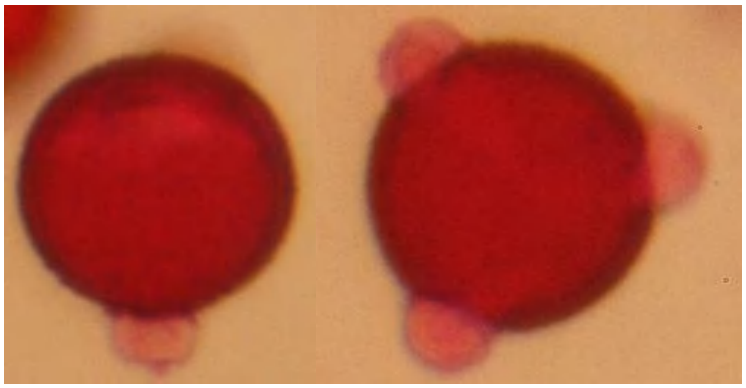
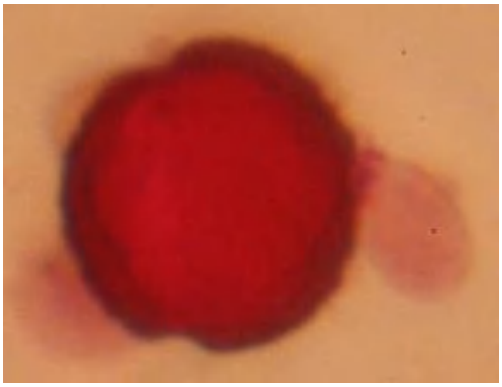
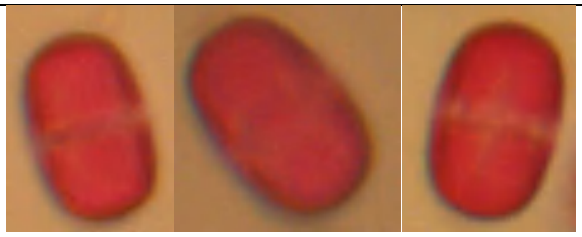
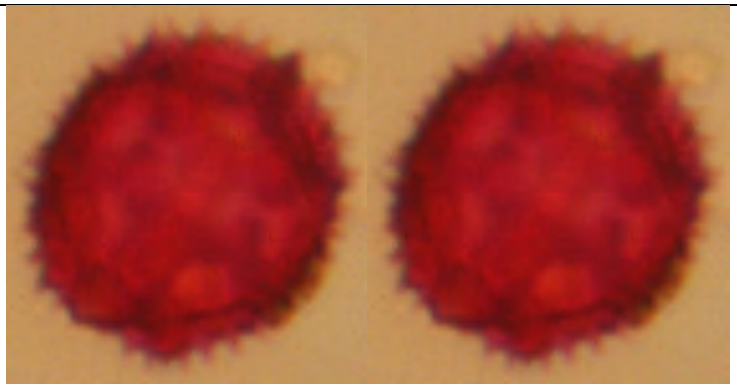
Type de pollen identifié

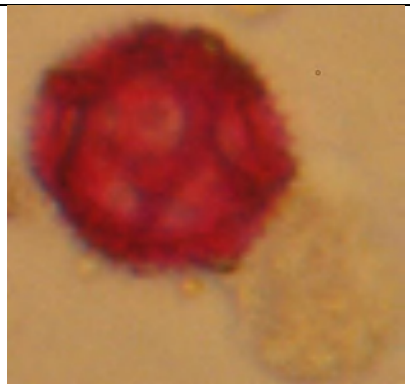
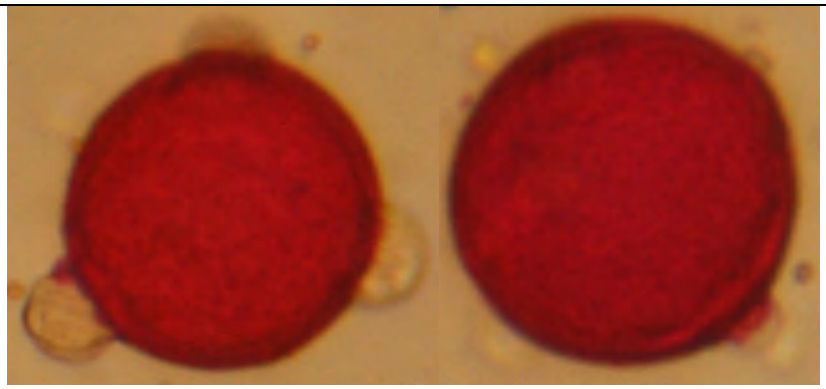
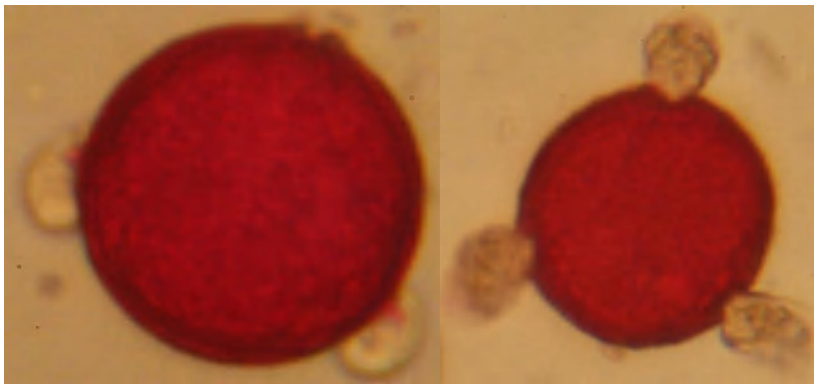
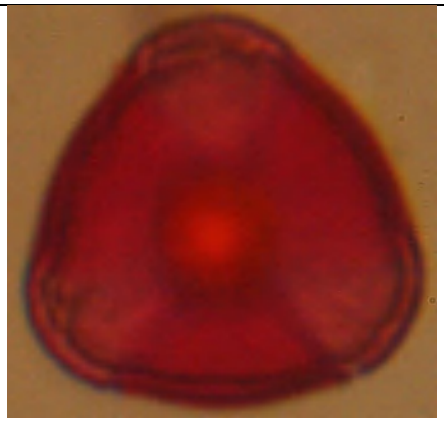
Type de pollen	Observation microscopique (G x..)
Anthemis Type	
Bellis Type	
Boraginaceae Type	
Brassica Type	

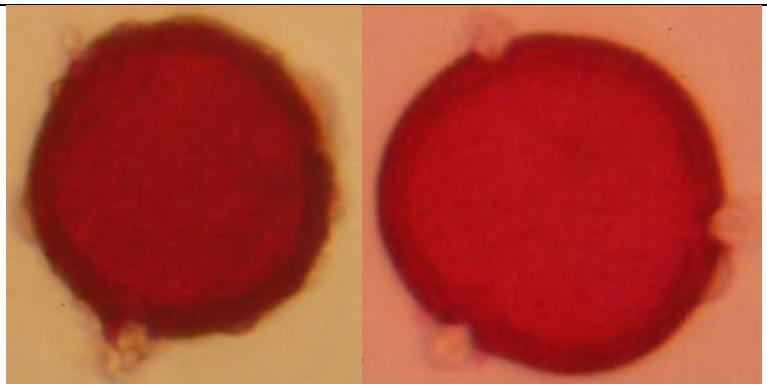
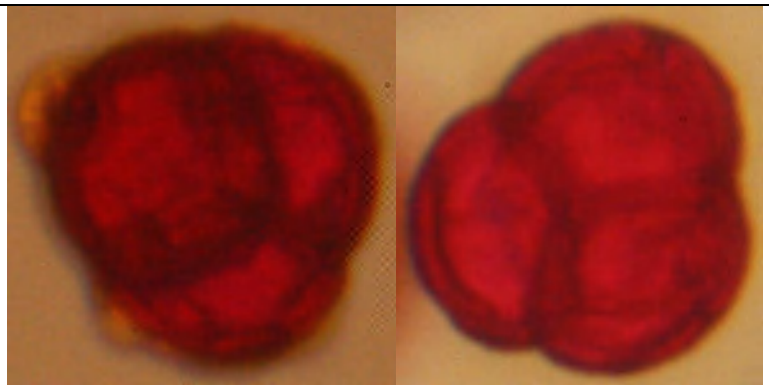
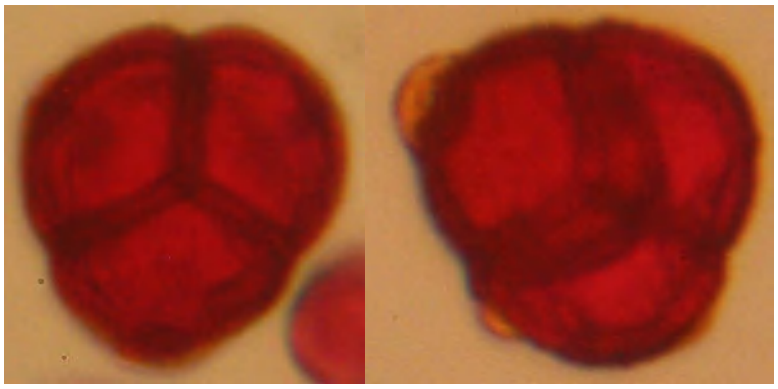
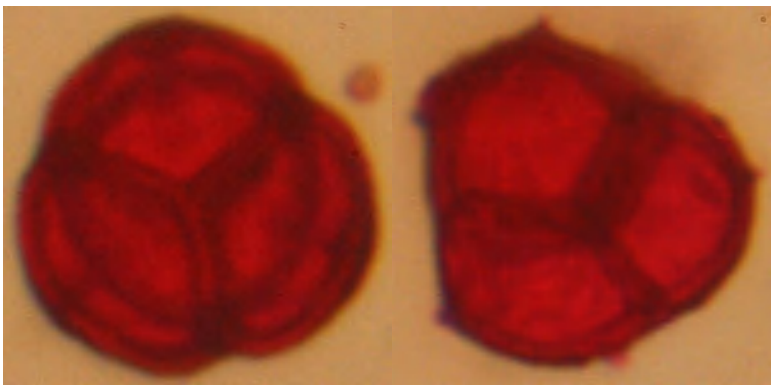
	 
Brassicaceae Type	 

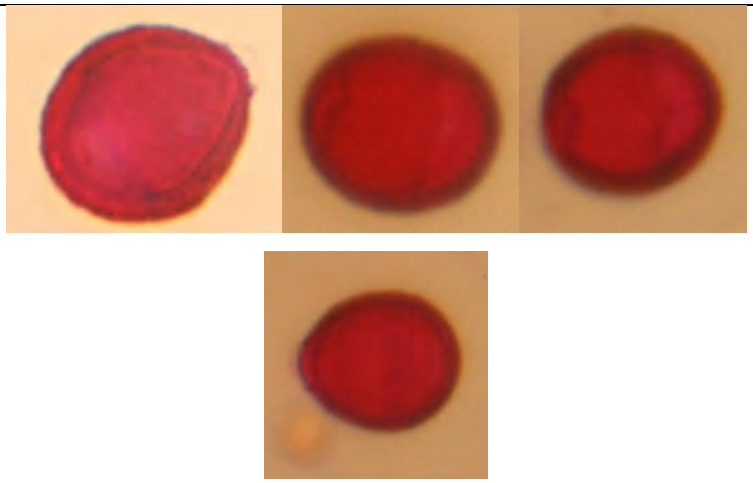
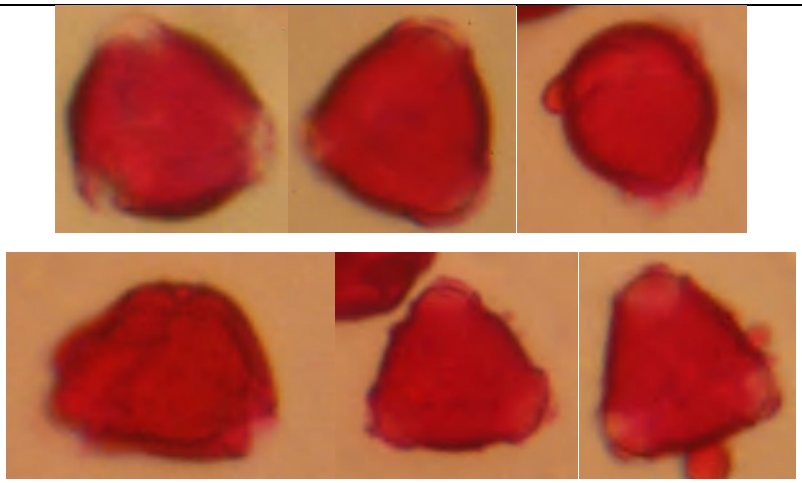
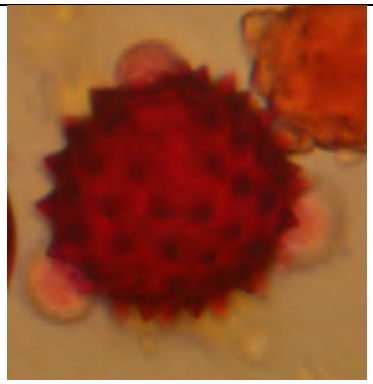
	
Bryonia type	 

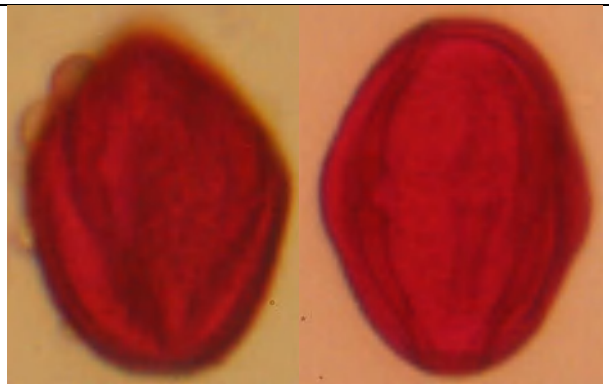
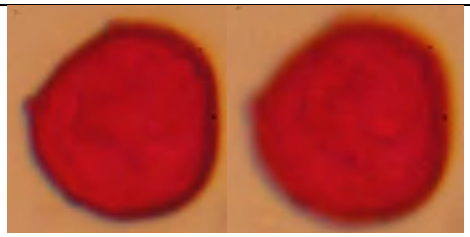
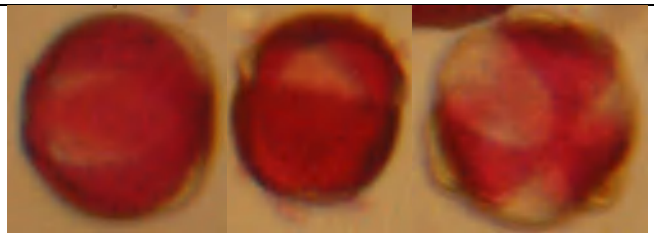
	 
Buxus Type	
Carduus Type	

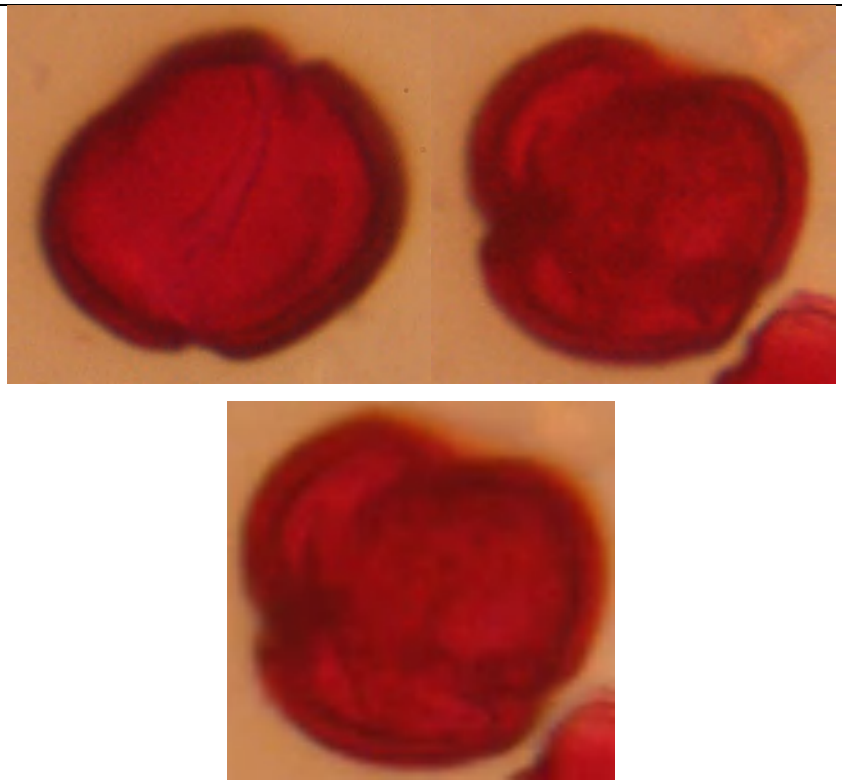
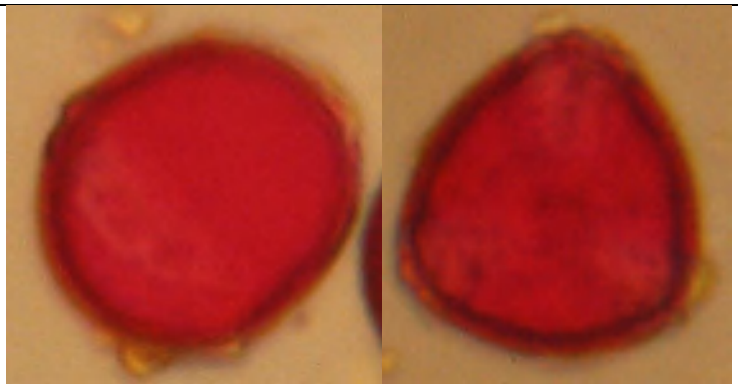
Centaurea Type	  
Cerinthe major Type	
Cichorium Type	

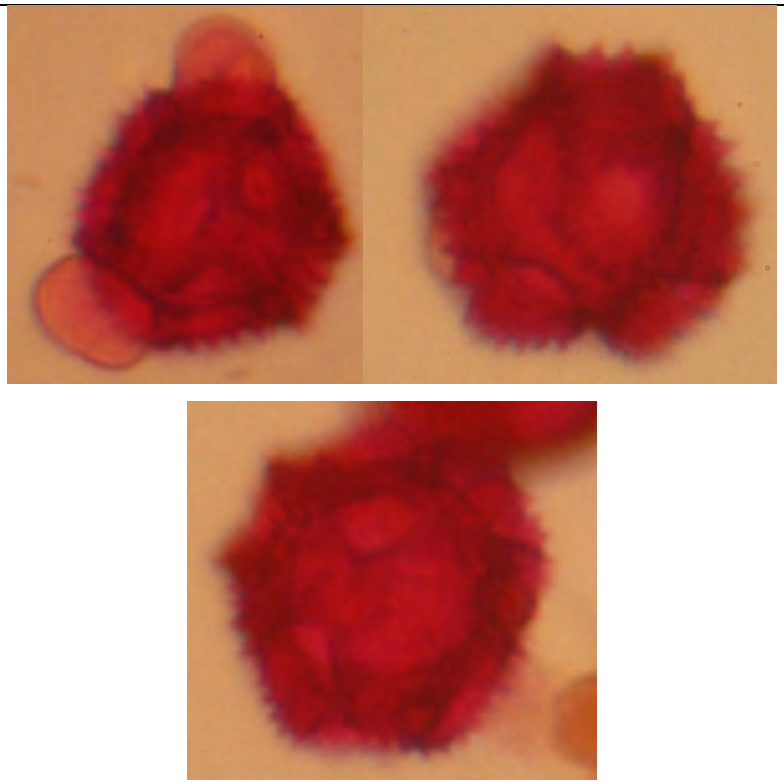
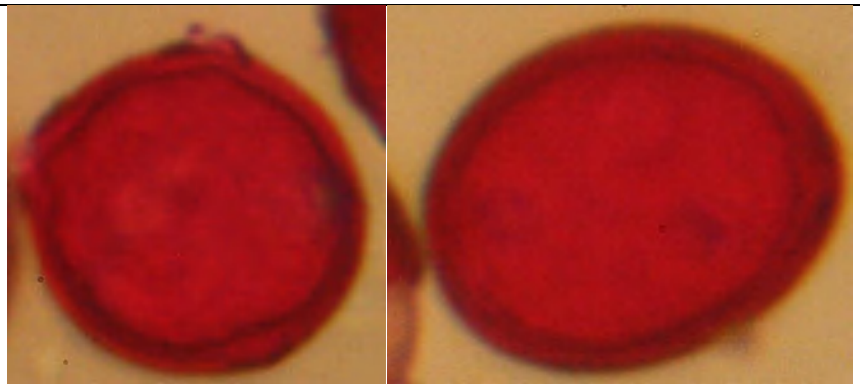
	
Cistus Type	 
Convolvulus Type	

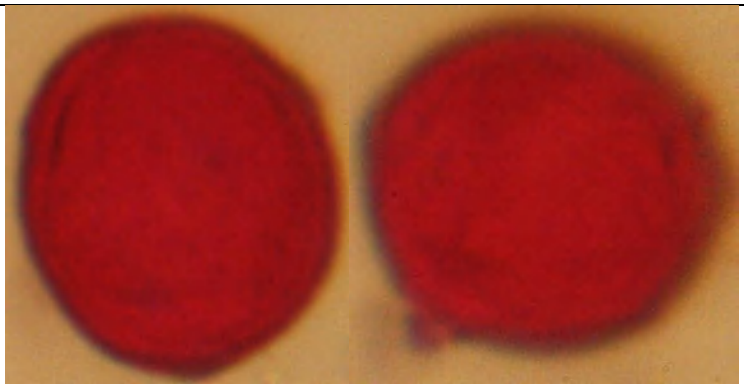
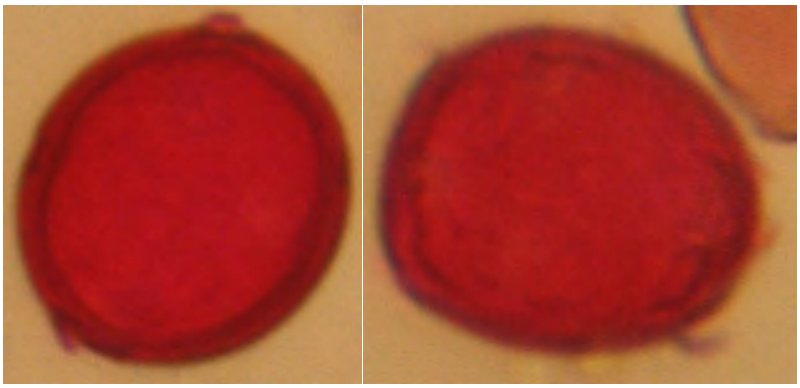
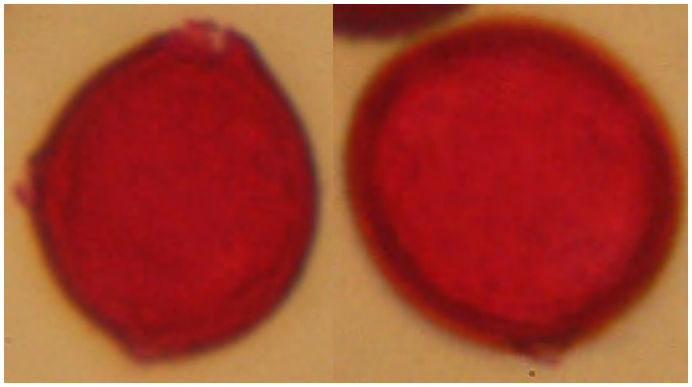
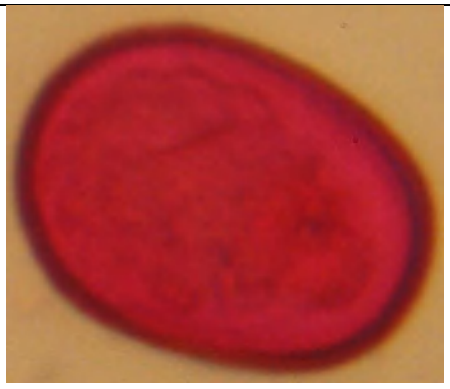
Cucurbitaceae Type	
Erica arborea Type	  

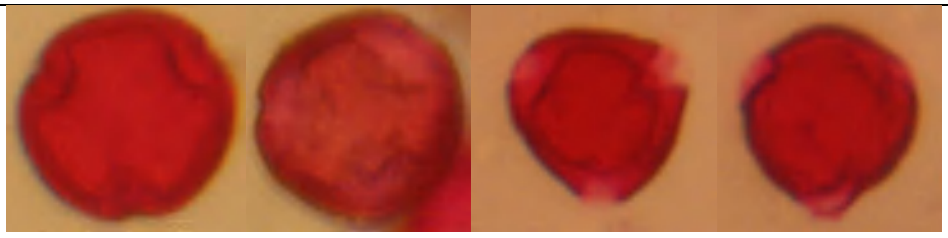
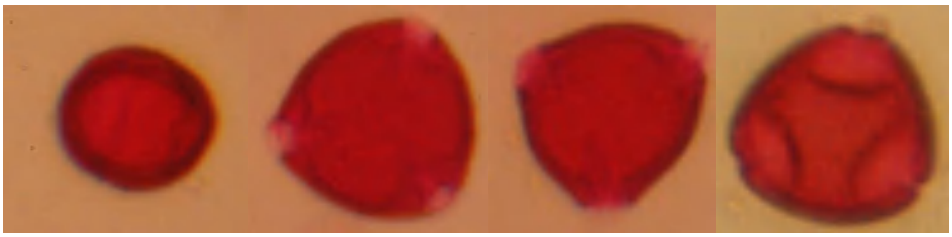
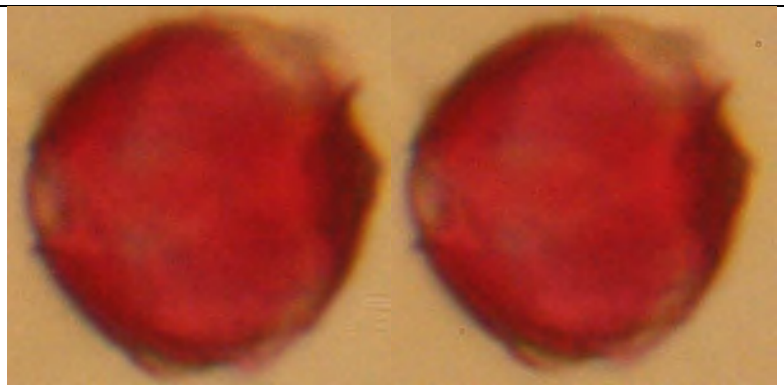
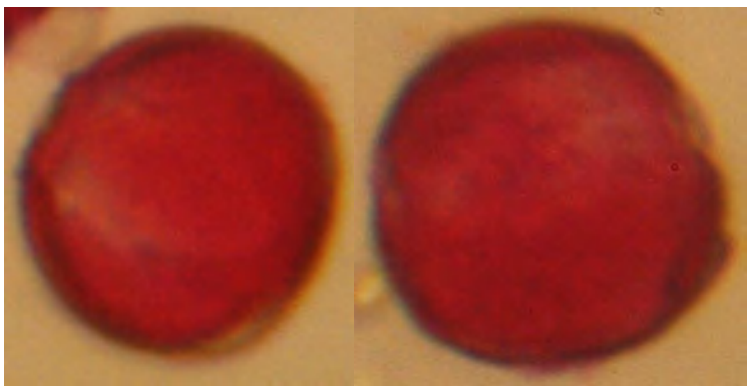
Euphorbiaceae Type	
Fabaceae Type	
Fraxinus Type	
Galactites Type	

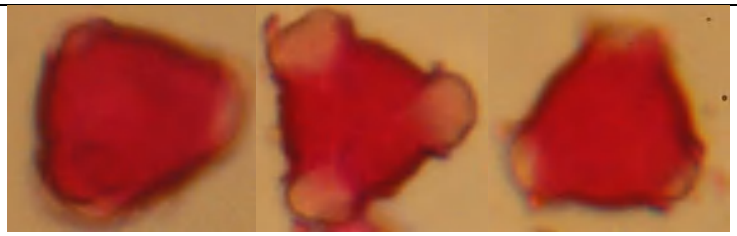
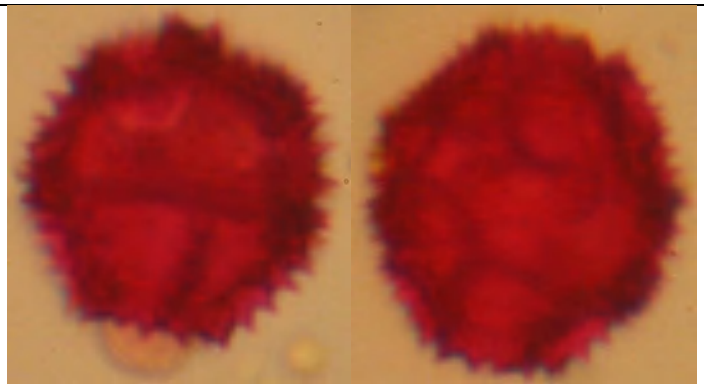
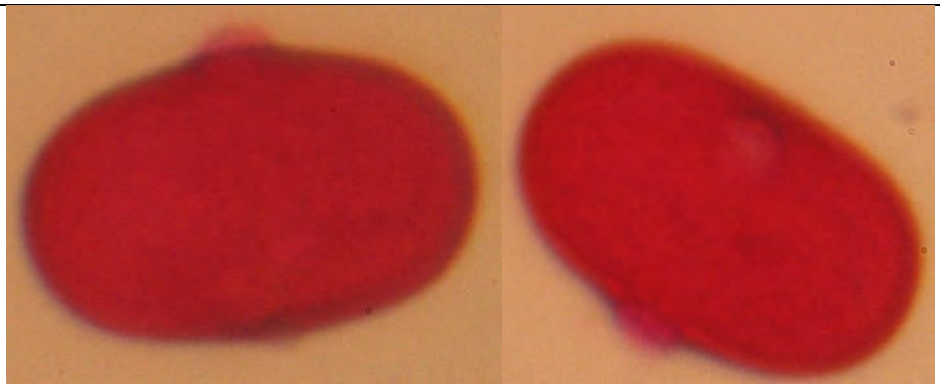
Halimium Type	
Helianthemum Type	
Juglans Type	
Lotus Type	
Myrtus communis Type	
Other Brassicaceae Type	

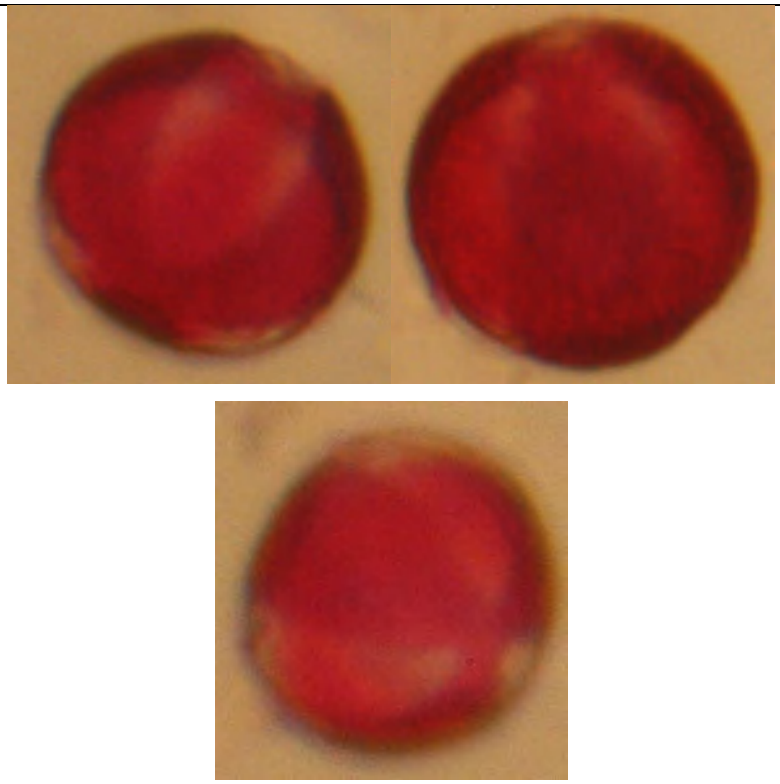
Oxalis Type	
Papaver Type	

Picris type	
Pistacia lentiscus Type	

	  
Poaceae Type	
Quercus ilex Type	

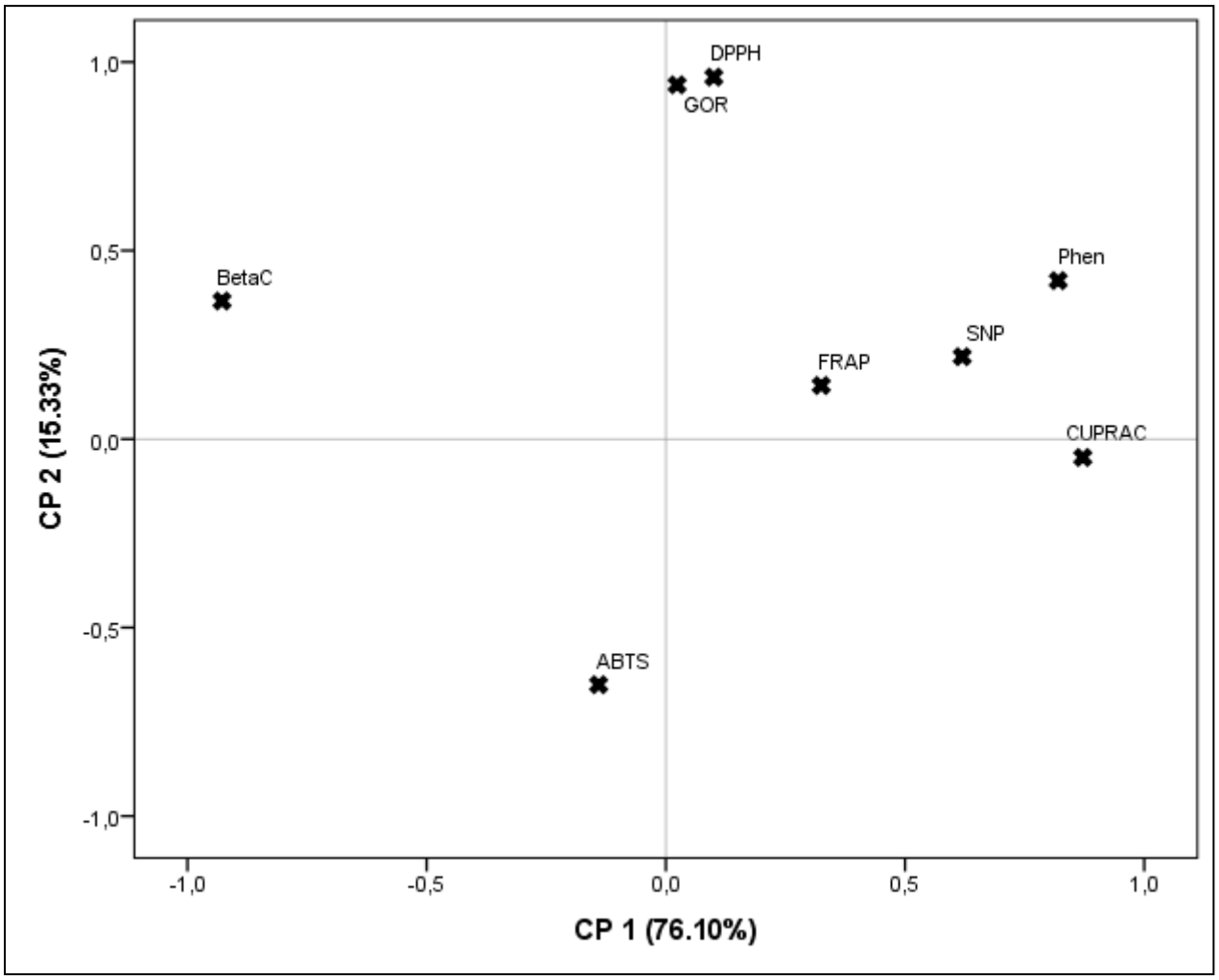
Quercus suber Type	
Quercus Type	 
Raphanus Type	 

Rhamnus Type	
Rosaceae Type	
Sonchus Type	
Verbenaceae Type	
Vicia Type	

Vitex Type	

Annexe 5

Analyse de la relation entre les différents tests antioxydants



Projection des résultats des différents tests antioxydants sur les deux premières composantes principales.

L'ACP indique que la CP1 représente 76.10 % avec des coefficients de corrélation positives vers les tests CUPRAC, à la 1,10-Phénanthroline et SNP (0.872, 0.820 et 0.619 respectivement). L'axe de la CP1 peut être qualifié par l'axe du pouvoir réducteur. La CP2 reconstitue 15.33 % des variances et présente les coefficients de corrélation positives avec les tests au DPPH et GOR (0.960 et 0.940 respectivement). L'axe de la CP2 peut être qualifié par l'axe du pouvoir piégeur.

Références

Références

Al-Enazi, M. M. (2014). Protective Effects of Combined Therapy of Rutin with Silymarin on Experimentally-Induced Diabetic Neuropathy in Rats. *Pharmacology & Pharmacy*, *05* (09), 876–889. doi: 10.4236/pp.2014.59098

Almatroudi, A., Mousa, A. M., Vinnakota, D., Abalkhail, A., Alwashmi, A. S. S., Almatroodi, S. A., Alhumaydhi, F. A., Kabir, R., & Mahmud, I. (2021). Prevalence and associated factors of respiratory allergies in the Kingdom of Saudi Arabia: A cross-sectional investigation, September–December 2020. *PLOS ONE*, *16* (6), 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0253558

Alves, R. de F., & Santos, F. de A. R. dos. (2014). Plant sources for bee pollen load production in Sergipe, northeast Brazil. *Palynology*, *38* (1), 90–100. doi: 10.1080/01916122.2013.846280

Amanullah, A., Upadhyay, A., Dhiman, R., Singh, S., Kumar, A., Ahirwar, D. K., Gutti, R. K., & Mishra, A. (2022). Development and Challenges of Diclofenac-Based Novel Therapeutics: Targeting Cancer and Complex Diseases. *Cancers*, *14* (18), 4385–4404. doi: 10.3390/cancers14184385

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, *160* (4), 413–419. doi: 10.1007/s00604-007-0777-0

Araújo, J., Chambó, E., Costa, M., Cavalcante da Silva, S., Lopes de Carvalho, C., & M. Estevinho, L. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of Mono- and Heterofloral Bee Pollen of Different Geographical Origins. *International Journal of Molecular Sciences*, *18* (5), 921–936. doi: 10.3390/ijms18050921

Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *147*, 110–124. doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.009

Arzi, A., Olapour, S., Yaghooti, H., & Sistani Karampour, N. (2015). Effect of Royal Jelly on Formalin Induced-Inflammation in Rat Hind Paw. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, *10* (1), 8–11. doi: 10.17795/jjnpp-22466

Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens—an update from a molecular perspective. *Allergy*, *70* (10), 1201–1211. doi: 10.1111/all.12696

Asmae, E. G., Nawal, E. M., Bakour, M., & Lyoussi, B. (2021). Moroccan Monofloral Bee Pollen: Botanical Origin, Physicochemical Characterization, and Antioxidant Activities. *Journal of Food Quality*, *2021*, 1–10. doi: 10.1155/2021/8877266

Aylanc, V., Tomás, A., Russo-Almeida, P., Falcão, S. I., & Vilas-Boas, M. (2021). Assessment of Bioactive Compounds under Simulated Gastrointestinal Digestion of Bee Pollen and Bee Bread: Bioaccessibility and Antioxidant Activity. *Antioxidants*, *10* (5), 651–668. doi: 10.3390/antiox10050651

B

Barcik, W., Boutin, R. C. T., Sokolowska, M., & Finlay, B. B. (2020). The Role of Lung and Gut Microbiota in the Pathology of Asthma. *Immunity*, *52* (2), 241–255. doi: 10.1016/j.immuni.2020.01.007

Beggs, P. J. (2015). Environmental Allergens: from Asthma to Hay Fever and Beyond. *Current Climate Change Reports*, *1* (3), 176–184. doi: 10.1007/s40641-015-0018-2

Berko, J. K., Brown, S., Elward, K. S., Fitzpatrick, A. M., Gerald, L. B., Holguin, F., Hsu, J., Israel, E., Lemanske, R. F., Mosnalm, G. S., Rachelefsky, G. S., Wheatley, L. M., Wlsnlesky, J. P., & Zeldln, D. C. (2020). 2020 Focused Updates to the Asthma Management Guidelines. *Expert Panel Working Group of the National Asthma Education and Prevention Program Coordinating Committee (NAEPPCC)*, 1–322.

Biedermann, T., Winther, L., Till, S. J., Panzner, P., Knulst, A., & Valovirta, E. (2019). Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*, *74* (7), all.13758. doi: 10.1111/all.13758

Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, *181* (4617), 1199–1200. doi: 10.1038/1811199a0

Bogdanov, S. (2004). Quality and Standards of Pollen and Beeswax. *APIACTA*, *38*, 334–341.

Borriello, F., Iannone, R., & Marone, G. (2017). Histamine Release from Mast Cells and Basophils. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *241*, 121–139. doi: 10.1007/164_2017_18

Bounil, S., Mezenner, H., Naamoune, S., & Salah, S. S. (2022). Prévalence et phénotype clinique des allergies respiratoires dans une région du centre algérien. *Revue Française d'Allergologie*, *62* (3), 294. doi: 10.1016/j.reval.2022.02.014

Boutabia, L., Telailia, S., & Chefrour, A. (2016). Pollen spectrum of honeys of bees (Apis mellifera L.) of el tarf region (Algeria northeast). *Livestock Research for Rural Development*, *28* (8), 1–16.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72* (1–2), 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999

Burks, W. A., Holgate, S. T., Bacharier, L. B., Broide, D. H., O'Hehir, R. E., Hershey, G. K. K., & Peebles, S. R. (2020). Middleton's Allergy 2-Volume Set_ Principles and Practice-. *Elsevier*, *2* (9), 1–1886. doi: 1131863570

C

Cardet, J. C., Castells, M. C., & Hamilton, M. J. (2013). Immunology and clinical manifestations of non-clonal mast cell activation syndrome. *Current Allergy and Asthma Reports*, *13* (1), 10–18. doi: 10.1007/s11882-012-0326-8

Carlson, G., & Coop, C. (2019). Pollen food allergy syndrome (PFAS): A review of current available literature. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *123* (4), 359–365. doi: 10.1016/j.anai.2019.07.022

Cellier, C. C., Lombard, C., Dimet, I., & Kolopp Sarda, M.-N. (2018). L'électrophorèse des protéines sériques en biologie médicale : interférences et facteurs confondants. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2018* (499), 47–58. doi: 10.1016/s1773-035x (18)30054-6

Chang, C., & Lu, Q. (2020). Epigenetics in Allergy and Autoimmunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1253*, 1–408. doi: 10.1007/978-981-15-3449-2

Chanput, W., Krueyos, N., & Ritthiruangdej, P. (2016). Anti-oxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids. *International Immunopharmacology*, *40*, 170–175. doi: 10.1016/j.intimp.2016.08.038

Charalampopoulos, A., Damialis, A., Lazarina, M., Halley, J. M., & Vokou, D. (2021). Spatiotemporal assessment of airborne pollen in the urban environment: The pollen scape of

Thessaloniki as a case study. *Atmospheric Environment*, *247*, 118185. doi: 10.1016/j.atmosenv.2021.118185

Chefrour, C., Draiaia, R., Tahar, A., Ait Kaki, Y., Bennadja, S., & Battesti, M. (2009). Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some north-east Algerian honeys. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *9* (5). doi: 10.4314/ajfand.v9i5.45101

Chen, S., Tang, Y., Gao, Y., Nie, K., Wang, H., Su, H., Wang, Z., Lu, F., Huang, W., & Dong, H. (2022). Antidepressant Potential of Quercetin and its Glycoside Derivatives: A Comprehensive Review and Update. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1–18. doi: 10.3389/fphar.2022.865376

Cheng, L., Chen, J., Fu, Q., He, S., Li, H., Liu, Z., Tan, G., Tao, Z., Wang, D., Wen, W., Xu, R., Xu, Y., Yang, Q., Zhang, C., Zhang, G., Zhang, R., Zhang, Y., Zhou, B., Zhu, D., … Zhang, L. (2018). Chinese Society of Allergy Guidelines for Diagnosis and Treatment of Allergic Rhinitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, *10* (4), 300–354. doi: 10.4168/aair.2018.10.4.300

Choi, E.-M. (2007). Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Pine (Pinus densiflora) Pollen Extract. *Phytotherapy Research*, *21*, 471–475. doi: 10.1002/ptr2103

Choi, H. G., Kim, S. Y., Joo, Y.-H., Cho, H.-J., Kim, S.-W., & Jeon, Y. J. (2022). Incidence of Asthma, Atopic Dermatitis, and Allergic Rhinitis in Korean Adults before and during the COVID-19 Pandemic Using Data from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19* (21), 14274–14286. doi: 10.3390/ijerph192114274

Choi, S.-S., Park, H.-R., & Lee, K.-A. (2021). A Comparative Study of Rutin and Rutin Glycoside: Antioxidant Activity, Anti-Inflammatory Effect, Effect on Platelet Aggregation and Blood Coagulation. *Antioxidants*, *10* (11), 1696–1713. doi: 10.3390/antiox10111696

D

D’Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T., & van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, *62* (9), 976–990. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x

D’Amato, G., Chong-Neto, H. J., Monge Ortega, O. P., Vitale, C., Ansotegui, I., Rosario, N., Haahtela, T., Galan, C., Pawankar, R., Murrieta-Aguttes, M., Cecchi, L., Bergmann, C., Ridolo,

E., Ramon, G., Gonzalez Diaz, S., D'Amato, M., & Annesi-Maesano, I. (2020). The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens. *Allergy, 75* (9), 2219–2228. doi: 10.1111/all.14476

Damas, J., & Liégeois, J.-F. (1999). The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 359* (3), 220–227. doi: 10.1007/PL00005345

Damialis, A., Traidl-Hoffmann, C., & Treudler, R. (2019). Climate Change and Pollen Allergies. *Biodiversity and Health in the Face of Climate Change*, 47–66. doi: 10.1007/978-3-030-02318-8_3

Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K., Kadri, A., & Gharsallah, N. (2019). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*, *12* (8), 3075–3086. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.07.014

De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., Freitas, A. da S. de, Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. de. (2018a). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, *25*, 91–110. doi: 10.1016/j.fbio.2018.08.001

De-Melo, A. A. M., Estevinho, L. M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., Freitas, A. da S. de, Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. de. (2018b). Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry, 42* (5), 1–21. doi: 10.1111/jfbc.12536

Dierick, B. J. H., van der Molen, T., Flokstra-de Blok, B. M. J., Muraro, A., Postma, M. J., Kocks, J. W. H., & van Boven, J. F. M. (2020). Burden and socioeconomics of asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergy. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, *20* (5), 437–453. doi: 10.1080/14737167.2020.1819793

Dobignard, Alain, Chatelain, C., Fischer, M., Orso, J., & Jeanmonod, D. (2013). Index Synonymique de la Flore d'Afrique du Nord. *Éditions Des Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève*, *5*, 1–465.

E

Ebisawa, M., Ito, K., & Fujisawa, T. (2017). Japanese guidelines for food allergy 2017. *Allergology International*, *66* (2), 248–264. doi: 10.1016/j.alit.2017.02.001

Eguiluz-Gracia, I., Ariza, A., Testera-Montes, A., Rondón, C., & Campo, P. (2020). Allergen Immunotherapy for Local Respiratory Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, *20* (7), 23–34. doi: 10.1007/s11882-020-00920-w

El Ghouizi, A., El Menyiy, N., Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., & Lyoussi, B. (2020). Chemical composition, antioxidant activity, and diuretic effect of Moroccan fresh bee pollen in rats. *Veterinary World*, *13* (7), 1251–1261. doi: 10.14202/vetworld.2020.1251-1261

Emile, C. (2013). Électrophorèse des protéines sériques : principes généraux – vérification de méthode – interprétation. *Option/Bio*, *24* (483), 20–22. doi: 10.1016/S0992-5945 (13)71155-3

Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 1–17. doi: 10.1155/2018/6241017

Estevinho, L. M., Rodrigues, S., Pereira, A. P., & Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, *47* (2), 429–435. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x

F

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., & Stričík, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *48* (2), 133–138. doi: 10.1080/03601234.2013.727664

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Máriássyová, M., & Kačániová, M. (2016). Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the Helianthus annuus L. bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *51* (3), 176–181. doi: 10.1080/03601234.2015.1108811

Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. (2012). Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules*, *17* (7), 8359–8377. doi: 10.3390/molecules17078359

Feo Brito, F., Gimeno, P. M., Carnés, J., Martín, R., Fernández-Caldas, E., Lara, P., López-Fidalgo, J., & Guerra, F. (2011). Olea europaea pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, *106* (2), 146–152. doi: 10.1016/j.anai.2010.11.003

Fereidoni, M., Ahmadiani, A., Semnanian, S., & Javan, M. (2000). An accurate and simple method for measurement of paw edema. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *43* (1), 11–14. doi: 10.1016/S1056-8719 (00)00089-7

Fröhlich, E., Mercuri, A., Wu, S., & Salar-Behzadi, S. (2016). Measurements of Deposition, Lung Surface Area and Lung Fluid for Simulation of Inhaled Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, *7* (JUN), 1–10. doi: 10.3389/fphar.2016.00181

G

Galli, S. J., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, *18* (5), 693–704. doi: 10.1038/nm.2755

Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, *454* (7203), 445–454. doi: 10.1038/nature07204

Gan, T. J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, *26* (7), 1715–1731. doi: 10.1185/03007995.2010.486301

García-Mozo, H. (2017). Poaceae pollen as the leading aeroallergen worldwide: A review. *Allergy*, *72* (12), 1849–1858. doi: 10.1111/all.13210

Gensollen, T., & Blumberg, R. S. (2017). Correlation between early-life regulation of the immune system by microbiota and allergy development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *139* (4), 1084–1091. doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.011

Georas, S. N., & Rezaee, F. (2014). Epithelial barrier function: At the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134* (3), 509–520. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.049

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*, *27* (1), 117–130. doi: 10.3390/molecules27010117

Ghiani, A., Aina, R., Asero, R., Bellotto, E., & Citterio, S. (2012). Ragweed pollen collected along high-traffic roads shows a higher allergenicity than pollen sampled in vegetated areas. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *67* (7), 887–894. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02846.x

Ghorab, A., Mesbah, M., Nakib, R., Kabli, N., Bekdouche, F., & Seijo, M. C. (2021). Input to the knowledge of the melliferous plants diversity in Babors Kabylia's region (North-East of Algeria). *Livestock Research for Rural Development*, *33* (10), 1–11.

Ghorab, A., Rodríguez-Flores, M. S., Nakib, R., Escuredo, O., Haderbache, L., Bekdouche, F., & Seijo, M. C. (2021). Sensorial, Melissopalynological and Physico-Chemical Characteristics of Honey from Babors Kabylia's Region (Algeria). *Foods*, *10* (2), 225–242. doi: 10.3390/foods10020225

Giampieri, F., Quiles, J. L., Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Orantes-Bermejo, F. J., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2022). Bee Products: An Emblematic Example of Underutilized Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *70* (23), 6833–6848. doi: 10.1021/acs.jafc.1c05822

González-de-Olano, D., Matito, A., Orfao, A., & Escribano, L. (2016). Advances in the understanding and clinical management of mastocytosis and clonal mast cell activation syndromes. *F1000Research*, *5*, 2666. doi: 10.12688/f1000research.9565.1

Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiroudis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E., & Chinou, I. (2011). Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal*, *5* (1), 33–42. doi: 10.1186/1752-153X-5-33

Gross, L., Weber, R., Wolf, M., & Crooks, J. L. (2019). The impact of weather and climate on pollen concentrations in Denver, Colorado, 2010-2018. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, *123* (5), 494–502. doi: 10.1016/j.anai.2019.08.002

H

Helander, M. L., Savolainen, J., & Ahlholm, J. (1997). Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy*, *52* (12), 1207–1214. doi: 10.1111/j.1398-9995.1997.tb02525.x

Helfrich, S., Mindt, B. C., Fritz, J. H., & Duerr, C. U. (2019). Group 2 Innate Lymphoid Cells in Respiratory Allergic Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *10* (JUN), 1–12. doi: 10.3389/fimmu.2019.00930

Hellings, P. W., Klimek, L., Cingi, C., Agache, I., Akdis, C., Bachert, C., Bousquet, J., Demoly, P., Gevaert, P., Hox, V., Hupin, C., Kalogjera, L., Manole, F., Mösges, R., Mullol, J., Muluk, N. B., Muraro, A., Papadopoulos, N., Pawankar, R., … Fokkens, W. J. (2017). Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *72* (11), 1657–1665. doi: 10.1111/all.13200

Henriquez, O. A., Beste, K. den, Hoddeson, E. K., Parkos, C. A., Nusrat, A., & Wise, S. K. (2013). House dust mite allergen Der p 1 effects on sinonasal epithelial tight junctions. *International Forum of Allergy & Rhinology*, *3* (8), 630–635. doi: 10.1002/alr.21168

Hew, M., Lee, J., Susanto, N. H., Prasad, S., Bardin, P. G., Barnes, S., Ruane, L., Southcott, A. M., Gillman, A., Young, A., Rangamuwa, K., O'Hehir, R. E., McDonald, C., Sutherland, M., Conron, M., Matthews, S., Harun, N. S., Lachapelle, P., Douglass, J. A., … Thien, F. (2019). The 2016 Melbourne thunderstorm asthma epidemic: Risk factors for severe attacks requiring hospital admission. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *74* (1), 122–130. doi: 10.1111/all.13609

Hiemstra, P. S., McCray, P. B., & Bals, R. (2015). The innate immune function of airway epithelial cells in inflammatory lung disease. *European Respiratory Journal*, *45* (4), 1150–1162. doi: 10.1183/09031936.00141514

Huerta-Ocampo, J. Á., Valenzuela-Corral, A., Robles-Burgueño, M. D. R., Guzmán-Partida, A. M., Hernández-Oñate, M. Á., Vázquez-Moreno, L., Pavón-Romero, G. F., & Terán, L. M. (2020). Proteomic identification of allergenic proteins in red oak (Quercus rubra) pollen. *World Allergy Organization Journal*, *13* (3), 100111–100120. doi: 10.1016/j.waojou.2020.100111

Humeniuk, P., Dubiela, P., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2017). Dendritic Cells and Their Role in Allergy: Uptake, Proteolytic Processing and Presentation of Allergens. *International Journal of Molecular Sciences*, *18* (7), 1491–1504. doi: 10.3390/ijms18071491

I

Ishikawa, Y., Tokura, T., Nakano, N., Hara, M., Niyonsaba, F., Ushio, H., Yamamoto, Y., Tadokoro, T., Okumura, K., & Ogawa, H. (2008). Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degranulation in vivo and in vitro. *Journal of Medicinal Food, 11* (1), 14–20. doi: 10.1089/jmf.2006.163

J

Jae-Won, O. (2022). Pollen Allergy in a Changing Planetary Environment. *Allergy, Asthma & Immunology Research, 14* (2), 168–181. doi: 10.4168/aair.2022.14.2.168

Jakubczyk, D., & Górska, S. (2021). Impact of Probiotic Bacteria on Respiratory Allergy Disorders. *Frontiers in Microbiology, 12*. doi: 10.3389/fmicb.2021.688137

Jannesar, M., Shoushtari, M. S., Majd, A., & Pourpak, Z. (2017). Bee Pollen Flavonoids as a Therapeutic Agent in Allergic and Immunological Disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol, 16* (3), 171–182.

Jeebhay, M. F., Moscato, G., Bang, B. E., Folletti, I., Lipińska-Ojrzanowska, A., Lopata, A. L., Pala, G., Quirce, S., Raulf, M., Sastre, J., Swoboda, I., Walusiak-Skorupa, J., & Siracusa, A. (2019). Food processing and occupational respiratory allergy- An EAACI position paper. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology, 74* (10), 1852–1871. doi: 10.1111/all.13807

K

Kahraman, H. A., Tutun, H., Kaya, M. M., Usluer, M. S., Tutun, S., Yaman, C., Sevin, S., & Keyvan, E. (2022). Ethanolic extract of Turkish bee pollen and propolis: phenolic composition, antiradical, antiproliferative and antibacterial activities. *Biotechnology and Biotechnological Equipment, 36* (1), 44–55. doi: 10.1080/13102818.2022.2045217

Kailaivasan, T., & Davies, J. M. (2018). The molecular allergology of subtropical grass pollen. *Molecular Immunology, 100*, 126–135. doi: 10.1016/j.molimm.2018.03.012

Kandemir, F. M., Ozkaraca, M., Yildirim, B. A., Hanedan, B., Kirbas, A., Kilic, K., Aktas, E., & Benzer, F. (2015). Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Renal Failure, 37* (3), 518–525. doi: 10.3109/0886022X.2015.1006100

Kato, A., Hulse, K. E., Tan, B. K., & Schleimer, R. P. (2013). B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131* (4), 933–957. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.023

Kawa A. M. Amin. (2015). Allergic Respiratory Inflammation and Remodeling. *Turkish Thoracic Journal/Türk Toraks Dergisi*, *16* (3), 133–140. doi: 10.5152/ttd.2015.4942

Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, T., Hagihara, K., Yamadori, T., Shima, Y., Ogata, A., Kawase, I., & Tanaka, T. (2007). Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. *Allergology International*, *56* (2), 113–123. doi: 10.2332/allergolint.R-06-135

Kawakami, T., & Blank, U. (2016). From IgE to Omalizumab. *The Journal of Immunology*, *197* (11), 4187–4192. doi: 10.4049/jimmunol.1601476

Khalifa, S. A. M., Elashal, M. H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S. G., Nahar, L., Sarker, S. D., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., Abd El-Wahed, A. A., Xiao, J., Omar, H. A., Hegazy, M.-E. F., & El-Seedi, H. R. (2021). Bee Pollen: Current Status and Therapeutic Potential. *Nutrients*, *13* (6), 1876–1891. doi: 10.3390/nu13061876

Khan, D. A. (2014). Allergic rhinitis and asthma: Epidemiology and common pathophysiology. *Allergy and Asthma Proceedings*, *35* (5), 357–361. doi: 10.2500/aap.2014.35.3794

Koidl, L., & Untersmayr, E. (2021). The clinical implications of the microbiome in the development of allergy diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *17* (2), 115–126. doi: 10.1080/1744666X.2021.1874353

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1–6. doi: 10.1155/2015/297425

Kostić, D. A., Dimitrijević, D. S., Stojanović, G. S., Palić, I. R., Đorđević, A. S., & Ickovski, J. D. (2015). Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *Journal of Chemistry*, *2015*, 1–8. doi: 10.1155/2015/294858

Kumaran, A., & Joel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. *LWT - Food Science and Technology*, *40* (2), 344–352. doi: 10.1016/j.lwt.2005.09.011

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227* (5259), 680–685. doi: 10.1038/227680a0

Lara, B., Rojo, J., Costa, A. R., Burgos-Montero, A. M., Antunes, C. M., & Pérez-Badia, R. (2023). Atmospheric pollen allergen load and environmental patterns in central and southwestern Iberian Peninsula. *Science of the Total Environment*, *858*, 1–10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159630

LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, *115* (4), 1299–1305. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.055

Lopes, A. J. O., Vasconcelos, C. C., Garcia, J. B. S., Dória Pinheiro, M. S., Pereira, F. A. N., Camelo, D. D. S., de Morais, S. V., Freitas, J. R. B., da Rocha, C. Q., de Sousa Ribeiro, M. N., & do Socorro de Sousa Cartágenes, M. (2020). Anti-inflammatory and antioxidant activity of pollen extract collected by Scaptotrigona affinis postica: In silico, in vitro, and in vivo studies. *Antioxidants*, *9* (2), 1–16. doi: 10.3390/antiox9020103

Lopes, A. J. O., Vasconcelos, C. C., Pereira, F. A. N., Silva, R. H. M., Queiroz, P. F. dos S., Fernandes, C. V., Garcia, J. B. S., Ramos, R. M., Rocha, C. Q. da, Lima, S. T. de J. R. M., Cartágenes, M. do S. de S., & Ribeiro, M. N. de S. (2019). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee Melipona fasciculata. *International Journal of Molecular Sciences*, *20* (18), 4512–4532. doi: 10.3390/ijms20184512

Loria, R. C., Wilson, P., & Wedner, H. J. (1989). Identification of potential allergens in white oak (Quercus alba) pollen by immunoblotting. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *84* (1), 9–18. doi: 10.1016/0091-6749 (89)90172-3

Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. *Bee World*, *59* (4), 139–157. doi: 10.1080/0005772X.1978.11097714

Luo, X., Dong, Y., Gu, C., Zhang, X., & Ma, H. (2021). Processing Technologies for Bee Products: An Overview of Recent Developments and Perspectives. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 1–30. doi: 10.3389/fnut.2021.727181

M

Mahgoub, M. A. M., & Nashwah, Z. (2009). Assessment the Ameliorative Effect of Pomegranate and Rutin on Chlorpyrifos-ethyl-Induced Oxidative Stress in Rats. *Nature and Science, 7* (10), 49–61.

Maqsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mora, L., Mohebodini, H., Ghorbani, M., & Toldrá, F. (2019). Controlled enzymatic hydrolysis of pollen protein as promising tool for production of potential bioactive peptides. *Journal of Food Biochemistry*, *43* (5), 12819–12829. doi: 10.1111/jfbc.12819

Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *45* (9), 594–598. doi: 10.1007/BF02668958

Mărgăoan, R., Özkök, A., Keskin, Ş., Mayda, N., Urcan, A. C., & Cornea-Cipcigan, M. (2021). Bee collected pollen as a value-added product rich in bioactive compounds and unsaturated fatty acids: A comparative study from Turkey and Romania. *LWT, 149*, 111925–111936. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111925

Marinova, M. D., & Tchorbanov, B. P. (2010). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Honeybee-Collected Pollen Using Plant Enzymes. *Enzyme Research*, *2010*, 1–5. doi: 10.4061/2010/415949

Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14* (S2), 49–59. doi: 10.1186/s13223-018-0278-1

Martinello, M., & Mutinelli, F. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants*, *10* (1), 71–108. doi: 10.3390/antiox10010071

Martinez-Gonzalez, I., Steer, C. A., & Takei, F. (2015). Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends in Immunology*, *36* (3), 189–195. doi: 10.1016/j.it.2015.01.005

Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., & Hara, H. (2010). Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Cistus sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *10* (1), 30–41. doi: 10.1186/1472-6882-10-30

Massoud, M., Dennis, K. L., & Timothy, C. (2019). Allergy and Asthma : The Basics to Best Practices. *Springer Reference*, 1–992. doi: 10.1007/978-3-030-05147-1

Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology*, *1855*, 101–105. doi: 10.1007/978-1-4939-8793-1_10

Matsumura, Y. (2012). Role of Allergen Source-Derived Proteases in Sensitization via Airway Epithelial Cells. *Journal of Allergy*, *2012*, 1–11. doi: 10.1155/2012/903659

Medeiros, K. C. P., Figueiredo, C. A. V., Figueredo, T. B., Freire, K. R. L., Santos, F. A. R., Alcantara-Neves, N. M., Silva, T. M. S., & Piuvezam, M. R. (2008). Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *119* (1), 41–46. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.036

Meng, Y., Wang, C., & Zhang, L. (2020). Advances and novel developments in allergic rhinitis. *Allergy*, *75* (12), 3069–3076. doi: 10.1111/all.14586

Millar, D. A., Kapwata, T., Kunene, Z., Mogotsi, M., Wernecke, B., Garland, R. M., Mathee, A., Theron, L., Levine, D. T., Ungar, M., Batini, C., John, C., & Wright, C. Y. (2022). Respiratory health among adolescents living in the Highveld Air Pollution Priority Area in South Africa. *BMC Public Health*, *22* (1), 2136–2148. doi: 10.1186/s12889-022-14497-8

Mims, J. W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology*, *5* (S1), S2–S6. doi: 10.1002/alr.21609

Moeller, T., Wolfheimer, S., Goretzki, A., Scheurer, S., & Schülke, S. (2019). NFκB- and MAP-Kinase Signaling Contribute to the Activation of Murine Myeloid Dendritic Cells by a Flagellin A:Allergen Fusion Protein. *Cells*, *8* (4), 355. doi: 10.3390/cells8040355

Moon, T. C., Befus, A. D., & Kulka, M. (2014). Mast Cell Mediators: Their Differential Release and the Secretory Pathways Involved. *Frontiers in Immunology*, *5* (NOV), 1–19. doi: 10.3389/fimmu.2014.00569

Muvhulawa, N., Dludla, P. v., Ziqubu, K., Mthembu, S. X. H., Mthiyane, F., Nkambule, B. B., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2022). Rutin ameliorates inflammation and improves metabolic function: A comprehensive analysis of scientific literature. *Pharmacological Research*, *178*, 106163–106175. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106163

N

Necib, A., Boughedir, L., & Aidaoui-Sari, G. (2021). Estimation de l'allergie pollinique dans la ville de Annaba (Algérie) Estimation of pollinic allergy in Annaba town (Algeria). *Revue Algérienne d'allergologie et d'immunologie Clinique*, *06* (01), 2543–2555.

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. doi: 10.3390/ijms130911173

O

Oduber, F., Calvo, A. I., Blanco-Alegre, C., Castro, A., Vega-Maray, A. M., Valencia-Barrera, R. M., Fernández-González, D., & Fraile, R. (2019). Links between recent trends in airborne pollen concentration, meteorological parameters and air pollutants. *Agricultural and Forest Meteorology*, *264*, 16–26. doi: 10.1016/j.agrformet.2018.09.023

Okatan, V., Bulduk, I., Kaki, B., Gundesli, M. A., Usanmaz, S., Alas, T., Helvaci, M., Kahramanoglu, I., & Hajizadeh, H. S. (2021). Identification and quantification of biochemical composition and antioxidant activity of walnut pollens. *Pakistan Journal of Botany*, *53* (6), 2241–2250. doi: 10.30848/PJB2021-6 (44)

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, *44* (6), 307–315. doi: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307

Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., & Apak, R. (2012). Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Analytical Chemistry*, *84* (18), 8052–8059. doi: 10.1021/ac301925b

P

Pabst, R. (2015). Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)—Structure, function and species differences. *Vaccine*, *33* (36), 4406–4413. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.022

Padem, N., & Saltoun, C. (2019). Classification of asthma. *Allergy and Asthma Proceedings*, *40* (6), 385–388. doi: 10.2500/aap.2019.40.4253

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science, 5*, 47–62. doi: 10.1017/jns.2016.41

Pandey, P., Khan, F., Qari, H. A., & Oves, M. (2021). Rutin (Bioflavonoid) as Cell Signaling Pathway Modulator: Prospects in Treatment and Chemoprevention. *Pharmaceuticals, 14* (11), 1069–1083. doi: 10.3390/ph14111069

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology, 63*, 233–239. doi: 10.1016/j.fct.2013.11.010

Plaza, M. P., Alcázar, P., Hernández-Ceballos, M. A., & Galán, C. (2016). Mismatch in aeroallergens and airborne grass pollen concentrations. *Atmospheric Environment, 144*, 361–369. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.09.008

Poncet, P., Sénéchal, H., & Charpin, D. (2020). Update on pollen-food allergy syndrome. *Expert Review of Clinical Immunology, 16* (6), 561–578. doi: 10.1080/1744666X.2020.1774366

Poole, J. A., Barnes, C. S., Demain, J. G., Bernstein, J. A., Padukudru, M. A., Sheehan, W. J., Fogelbach, G. G., Wedner, J., Codina, R., Levetin, E., Cohn, J. R., Kagen, S., Portnoy, J. M., & Nel, A. E. (2019). Impact of weather and climate change with indoor and outdoor air quality in asthma: A Work Group Report of the AAAAI Environmental Exposure and Respiratory Health Committee. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 143* (5), 1702–1710. doi: 10.1016/j.jaci.2019.02.018

Q

Quoc, L. P. T. (2021). Chemical composition and physical properties of coffee (Coffea robusta) bee pollen in Daklak province, Vietnam. *Acta Alimentaria, 50* (3), 453–463. doi: 10.1556/066.2021.00092

R

Radauer, C., & Breiteneder, H. (2006). Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117* (1), 141–147. doi: 10.1016/j.jaci.2005.09.010

Ramon, G. D., Green, B. J., Levetin, E., Makra, L., & Bielory, L. (2021). The Importance of Binomial Nomenclature for the Identification of Pollen Aeroallergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *9* (7), 2642–2644. doi: 10.1016/j.jaip.2021.03.007

Ravi, G. S., Charyulu, R. N., Dubey, A., Prabhu, P., Hebbar, S., & Mathias, A. C. (2018). Nano-lipid Complex of Rutin: Development, Characterisation and In Vivo Investigation of Hepatoprotective, Antioxidant Activity and Bioavailability Study in Rats. *AAPS PharmSciTech*, *19* (8), 3631–3649. doi: 10.1208/s12249-018-1195-9

Ravindra, K., Goyal, A., & Mor, S. (2021). Does airborne pollen influence COVID-19 outbreak? *Sustainable Cities and Society*, *70*, 102887–102896. doi: 10.1016/j.scs.2021.102887

Ravindra, K., Goyal, A., & Mor, S. (2022). Pollen allergy: Developing multi-sectorial strategies for its prevention and control in lower and middle-income countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *242*, 113951–113961. doi: 10.1016/j.ijheh.2022.113951

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26* (9–10), 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849 (98)00315-3

Riding, J. B. (2021). A guide to preparation protocols in palynology. *Palynology*, *45* (S1), 1–110. doi: 10.1080/01916122.2021.1878305

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Moździerz, A., & Buszman, E. (2015). Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, *20* (12), 21732–21749. doi: 10.3390/molecules201219800

S

Sabih, A., Russell, C., & Chang, C. L. (2020). Thunderstorm-related asthma can occur in New Zealand. *Respirology Case Reports*, *8* (7), 1–3. doi: 10.1002/rcr2.655

Şahin, S., & Karkar, B. (2019). The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. *Journal of Food Biochemistry*, *43* (7), 1–8. doi: 10.1111/jfbc.12888

Sakamoto, D., Hamada, S., Kobayashi, Y., Shimono, M., Shimamura, A., Kanda, A., Asako, M., & Iwai, H. (2022). Omalizumab is effective for a patient with pollen-food allergy syndrome who experienced intractable lip edema. *Auris Nasus Larynx*, 1–6. doi: 10.1016/j.anl.2022.12.001

Salazar, F., & Ghaemmaghami, A. M. (2013). Allergen Recognition by Innate Immune Cells: Critical Role of Dendritic and Epithelial Cells. *Frontiers in Immunology*, *4* (NOV), 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2013.00356

Saral, Ö., Şahin, H., Saral, S., Alkanat, M., Akyıldız, K., Topçu, A., & Yılmaz, A. (2022). Bee pollen increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and suppresses neuroinflammation in adult rats with chronic immobilization stress. *Neuroscience Letters*, *766*, 136342–136349. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136342

Saral, Ö., Yildiz, O., Aliyazicioğlu, R., Yuluğ, E., Canpolat, S., Öztürk, F., & Kolayli, S. (2016). Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *46* (1), 194–202. doi: 10.3906/sag-1411-35

Sawicki, T., Starowicz, M., Kłębukowska, L., & Hanus, P. (2022). The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products. *Molecules*, *27* (4), 1301–1317. doi: 10.3390/molecules27041301

Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., Pham-Thi, N., Poncet, P., & Sutra, J.-P. (2015). A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. *The Scientific World Journal*, *2015*, 1–29. doi: 10.1155/2015/940243

Shen, D., Feng, Y., Zhang, X., Gong, L., Liu, J., Li, Y., & Liao, H. (2022). Antiosteoporosis Studies of 20 Medicine Food Homology Plants Containing Quercetin, Rutin, and Kaempferol: TCM Characteristics, In Vivo and In Vitro Activities, Potential Mechanisms, and Food Functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*, 1–20. doi: 10.1155/2022/5902293

Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in Enzymology*, *335* (1992), 157–166. doi: 10.1016/S0076-6879(01)35240-0

Shin, J.-S., & Greer, A. M. (2015). The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72* (12), 2349–2360. doi: 10.1007/s00018-015-1870-x

Shivanna, K. R., & Tandon, R. (2020). Developmental biology of dispersed pollen grains. *The International Journal of Developmental Biology*, *64* (3), 7–19. doi: 10.1387/ijdb.190166ks

Singh, A. B., & Mathur, C. (2021). Climate Change and Pollen Allergy in India and South Asia. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, *41* (1), 33–52. doi: 10.1016/j.iac.2020.09.007

Singh, S., Singh, D. K., Meena, A., Dubey, V., Masood, N., & Luqman, S. (2019). Rutin protects t-butyl hydroperoxide-induced oxidative impairment via modulating the Nrf2 and iNOS activity. *Phytomedicine*, *55*, 92–104. doi: 10.1016/j.phymed.2018.07.009

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16* (3), 144–158.

Skjøth, C. A., Ørby, P. v., Becker, T., Geels, C., Schlünssen, V., Sigsgaard, T., Bønløkke, J. H., Sommer, J., Søgaard, P., & Hertel, O. (2013). Identifying urban sources as cause of elevated grass pollen concentrations using GIS and remote sensing. *Biogeosciences*, *10* (1), 541–554. doi: 10.5194/bg-10-541-2013

Smith, K. G., Kamdar, A. A., & Stark, J. M. (2019). Lung Defenses. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*, 120-133.e2. doi: 10.1016/B978-0-323-44887-1.00008-0

Soares de Arruda, V. A., Vieria dos Santos, A., Figueiredo Sampaio, D., da Silva Araújo, E., de Castro Peixoto, A. L., Estevinho, L. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2021). Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Journal of Apicultural Research*, *60* (5), 775–783. doi: 10.1080/00218839.2020.1840854

Sone, T., Dairiki, K., Morikubo, K., Shimizu, K., Tsunoo, H., Mori, T., & Kino, K. (2005). Identification of human T cell epitopes in Japanese cypress pollen allergen, Cha o 1, elucidates the intrinsic mechanism of cross-allergenicity between Cha o 1 and Cry j 1, the major allergen of Japanese cedar pollen, at the T cell level. *Clinical and Experimental Allergy*, *35* (5), 664–671. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02221.x

Soriano, J. B., Kendrick, P. J., Paulson, K. R., Gupta, V., Abrams, E. M., Adedoyin, R. A., Adhikari, T. B., Advani, S. M., Agrawal, A., Ahmadian, E., Alahdab, F., Aljunid, S. M., Altirkawi, K. A., Alvis-Guzman, N., Anber, N. H., Andrei, C. L., Anjomshoa, M., Ansari, F., Antó, J. M., … Vos, T. (2020). Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases,

1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Respiratory Medicine*, *8* (6), 585–596. doi: 10.1016/S2213-2600 (20)30105-3

Steelman, Z. A., Tolstykh, G. P., Estlack, L. E., Roth, C. C., & Ibey, B. L. (2015). The Role of PIP2 and the IP3/DAG Pathway in Intracellular Calcium Release and Cell Survival During Nanosecond Electric Pulse Exposures. *Energy-Based Treatment of Tissue and Assessment VIII*, *9326*, 932611. doi: 10.1117/12.2079928

Stone, E. A., Mampage, C. B. A., Hughes, D. D., & Jones, L. M. (2021). Airborne sub-pollen particles from rupturing giant ragweed pollen. *Aerobiologia*, *37* (3), 625–632. doi: 10.1007/s10453-021-09702-x

Straumite, E., Bartule, M., Valdovska, A., Kruma, Z., & Galoburda, R. (2022). Physical and Microbiological Characteristics and Antioxidant Activity of Honey Bee Pollen. *Applied Sciences*, *12* (6), 3039–3052. doi: 10.3390/app12063039

Suanno, C., Aloisi, I., Fernández-González, D., & del Duca, S. (2021). Monitoring techniques for pollen allergy risk assessment. *Environmental Research*, *197*, 111109–111120. doi: 10.1016/j.envres.2021.111109

Syahputra, R. A., Harahap, U., Dalimunthe, A., Nasution, M. P., & Satria, D. (2022). The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*, *27* (4), 1320–1339. doi: 10.3390/molecules27041320

Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., & Szłyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, *76* (4), 899–905. doi: 10.1016/j.talanta.2008.04.055

Szymanowicz, A., Cartie, B., Couaillac, J. P., Gibaud, C., Poulin, G., Rivière, H., & Le Carrer, D. (2006). Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. *Annales de Biologie Clinique*, *64* (4), 367–380.

T

Tamali, H. S., & Özkırım, A. (2019). Beekeeping Activities in Turkey and Algeria. *Mellifera, 19* (1), 30–40.

Tata, P. R., & Rajagopal, J. (2017). Plasticity in the lung: making and breaking cell identity. *Development*, *144* (5), 755–766. doi: 10.1242/dev.143784

Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, *98*, 82–106. doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.001

Thangam, E. B., Jemima, E. A., Singh, H., Baig, M. S., Khan, M., Mathias, C. B., Church, M. K., & Saluja, R. (2018). The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in Immunology*, *9* (AUG), 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01873

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of Pistacia terebinthus. *Food Chemistry*, *103* (3), 816–822. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.09.028

Tutun, H., Kaya, M. M., Usluer, M. S., & Kahraman, H. A. (2021). Bee pollen: Its antioxidant activity. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, *21* (1), 8–20. doi: 10.31467/uluaricilik.896045

V

Vakili Moghaddam, M., Fallahpour, M., Mohammadi, M., Rasi Varaee, F. S., Mokhtarian, K., Khoshmirsafa, M., Jafari, R., Shirzad, N., & Falak, R. (2019). Identification of polcalcin as a novel allergen of Amaranthus retroflexus pollen. *Allergologia et Immunopathologia*, *47* (4), 357–364. doi: 10.1016/j.aller.2018.12.006

Vedanthan, P. K., Nelson, H. S., Agashe, S. N., Mahesh, P. A., & Katial, R. (2021). Textbook of Allergy for the Clinician. *CRC Press*, *2*, 1–444

Velásquez, P., Rodríguez, K., Retamal, M., Giordano, A., Valenzuela, L. M., & Montenegro, G. (2017). Relation between composition, antioxidant and antibacterial activities and botanical origin of multi-floral bee pollen. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *90*, 306–314. doi: 10.5073/JABFQ.2017.090.038

Ver Heul, A., Planer, J., & Kau, A. L. (2019). The Human Microbiota and Asthma. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *57* (3), 350–363. doi: 10.1007/s12016-018-8719-7

W

Wallner, M., Erler, A., Hauser, M., Klinglmayr, E., Gadermaier, G., Vogel, L., Mari, A., Bohle, B., Briza, P., & Ferreira, F. (2009). Immunologic characterization of isoforms of Car b 1 and Que a 1, the major hornbeam and oak pollen allergens. *Allergy*, *64* (3), 452–460. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01788.x

Wang, R., Yin, X., Zhang, H., Wang, J., Chen, L., Chen, J., Han, X., Xiang, Z., & Li, D. (2016). Effects of a Moderately Lower Temperature on the Proliferation and Degranulation of Rat Mast Cells. *Journal of Immunology Research*, *2016*, 1–7. doi: 10.1155/2016/8439594

Wise, S. K., Lin, S. Y., Toskala, E., Orlandi, R. R., Akdis, C. A., Alt, J. A., Azar, A., Baroody, F. M., Bachert, C., Canonica, G. W., Chacko, T., Cingi, C., Ciprandi, G., Corey, J., Cox, L. S., Creticos, P. S., Custovic, A., Damask, C., DeConde, A., … Zacharek, M. (2018). International Consensus Statement on Allergy and Rhinology: Allergic Rhinitis. *International Forum of Allergy and Rhinology*, *8* (2), 108–352. doi: 10.1002/alr.22073

Wjst, M., Dharmage, S., André, E., Norback, D., Raherison, C., Villani, S., Manfreda, J., Sunyer, J., Jarvis, D., Burney, P., & Svanes, C. (2005). Latitude, birth date, and allergy. *PLoS Medicine*, *2* (10), 0977–0985. doi: 10.1371/journal.pmed.0020294

X

Xie, Z.-J., Guan, K., & Yin, J. (2019). Advances in the clinical and mechanism research of pollen induced seasonal allergic asthma. *Am J Clin Exp Immunol*, *8* (1), 1–8.

Y

Yagami, A., & Ebisawa, M. (2019). New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology*, *19* (3), 218–223. doi: 10.1097/ACI.0000000000000533

Yang, J., Guo, J., & Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT - Food Science and Technology*, *41* (6), 1060–1066. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.010

Yang, S., Song, B., Ye, S., Laws, E. A., He, L., Li, J., Chen, J., Zhao, G., Zhao, J., Mei, X., & Behling, H. (2019). Large-scale pollen distribution in marine surface sediments from the Bohai Sea, China: Insights into pollen provenance, transport, deposition, and coastal-shelf paleoenvironment. *Progress in Oceanography*, *178*, 102183–102200. doi: 10.1016/j.pocean.2019.102183

Yasar, M., Savranlar, Y., Karaman, H., Sagit, M., Silici, S., & Ozcan, I. (2016). Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, *37* (4), 287–293. doi: 10.1016/j.amjoto.2016.03.007

Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazıcıoğlu, R., Canpolat, S., & Kolaylı, S. (2013). Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1–9. doi: 10.1155/2013/461478

Yuksel, H., & Turkeli, A. (2017). Airway epithelial barrier dysfunction in the pathogenesis and prognosis of respiratory tract diseases in childhood and adulthood. *Tissue Barriers*, *5* (4), 1367458–1367472. doi: 10.1080/21688370.2017.1367458

Z

Zerrouk, S., Seijo, M. C., Boughediri, L., Escuredo, O., & Rodríguez-Flores, M. S. (2014). Palynological characterisation of Algerian honeys according to their geographical and botanical origin. *Grana*, *53* (2), 147–158. doi: 10.1080/00173134.2014.897751

Zhao, F., Elkelish, A., Durner, J., Lindermayr, C., Winkler, J. B., Ruioff, F., Behrendt, H., Traidl-Hoffmann, C., Holzinger, A., Kofler, W., Braun, P., von Toerne, C., Hauck, S. M., Ernst, D., & Frank, U. (2016). Common ragweed (Ambrosia artemisiifolia L.): Allergenicity and molecular characterization of pollen after plant exposure to elevated NO2. *Plant Cell and Environment*, *39* (1), 147–164. doi: 10.1111/pce.12601

Ziello, C., Sparks, T. H., Estrella, N., Belmonte, J., Bergmann, K. C., Bucher, E., Brighetti, M. A., Damialis, A., Detandt, M., Galán, C., Gehrig, R., Grewling, L., Gutiérrez Bustillo, A. M., Hallsdóttir, M., Kockhans-Bieda, M.-C., de Linares, C., Myszkowska, D., Pàldy, A., Sánchez, A., … Menzel, A. (2012). Changes to Airborne Pollen Counts across Europe. *PLoS ONE*, *7* (4), 34076–34084. doi: 10.1371/journal.pone.0034076

Ziemianin, M., Waga, J., Czarnobilska, E., & Myszkowska, D. (2021). Changes in qualitative and quantitative traits of birch (Betula pendula) pollen allergenic proteins in relation to the pollution contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, *28* (29), 39952–39965. doi: 10.1007/s11356-021-13483-8

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

Ziska, L. H., Makra, L., Harry, S. K., Bruffaerts, N., Hendrickx, M., Coates, F., Saarto, A., Thibaudon, M., Oliver, G., Damialis, A., Charalampopoulos, A., Vokou, D., Heiđmarsson, S.,

Guđjohnsen, E., Bonini, M., Oh, J.-W., Sullivan, K., Ford, L., Brooks, G. D., … Crimmins, A. R. (2019). Temperature-related changes in airborne allergenic pollen abundance and seasonality across the northern hemisphere: a retrospective data analysis. *The Lancet Planetary Health, 3* (3), 124–131. doi: 10.1016/S2542-5196 (19)30015-4

Publication

Publication

Citation/Atıf: Mokhtari MB, El Ouar I, Zeghina I,Tartouga MA, Ghorab A, Bahri L, Bensouici C. Palynological Analysis, Phenolic Components and Anti-Inflammatory Activity Of Some Bee Pollens Collected From The Northeast Region Of Algeria (Extended abstract in Turkish). U. Arı D. / U. Bee J. 2022, 22:45-58. DOI: 10.31467/uluaricilik.1073013

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

PALYNOLOGICAL ANALYSIS, PHENOLIC COMPONENTS AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SOME BEE POLLENS COLLECTED FROM THE NORTHEAST REGION OF ALGERIA

Cezayir'in Kuzeydoğu Bölgesinden Toplanan Bazı Arı Polenlerinin Palinolojik Analizi, Fenolik Bileşenleri ve Anti-İnflamatuar Aktivitesi

Mohamed Badreddine MOKHTARI[1,2*], Ibtissem EL OUAR[1,3], Ibtissem ZEGHINA[1], Maya Abir TARTOUGA[1], Asma GHORAB[4,5], Laid BAHRI[1,2], Chawki BENSOUICI[6]

[1]Université Frères Mentouri Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Departement de Biologie Animale, Constantine 25000, ALGERIA, Corresponding author E-mail: mohamedbadreddine.mokhtari@umc.edu.dz, ORCID No: 0000-0003-3066-8346, E-mail: louar.ibtissem@umc.edu.dz, ORCID No: 0000-0002-0266-4965, E-mail: zeghina.ibtissem@umc.edu.dz, ORCID No: 0000-0002-9065-3421, E-mail: Tartouga.abirmaya@umc.edu.dz, ORCID No: 0000-0001-9692-5339.

[2]Université Frères Mentouri Constantine1, Institut des Sciences Vétérinaires, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. , Constantine 25000, ALGERIA, E-mail: bahri.laid@umc.edu.dz, ORCID No: 0000-0003-2611-5140.

[3]Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP), Constantine 25000, ALGERIA.

[4]Université A. Mira de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire d'Ecologie et Environnement, Bejaia 06000, ALGERIA, E-mail: Asma.ghorab@univ-bejaia.dz, ORCID no: 0000-0001-6768-6316.

[5]Universida de de Vigo, Faculta de de Ciencias, Department of Vegetal Biology and Soil Sciences, 32004 Ourense, SPAIN.

[6]Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine 25000, ALGERIA, E-mail: c.bensouici@crbt.dz, ORCID no: 0000-0003-4612-4642.

Geliş Tarihi / Received: 20.02.2022 Kabul Tarihi / Accepted:21.03.2022 DOI: 10.31467/uluaricilik.1073013

ABSTRACT

Bee pollen is multiplex blend of floral pollen and nectar agglutinated by bee salivary substances. It is famously known for being high in proteins, carbs, lipids, vitamins, and phenolic compounds, among other physiologically dynamic components. Its composition fluctuates incredibly agreeing to both botanical origins and edaphoclimatic conditions. In this work, the botanical origin, the phenolic components and the anti-inflammatory activity *in vivo* of eight bee pollens intended for human consumption were taken from distinctive apiaries in Algeria's northeast, were determined and compared. All samples were detected heterofloral based on the identification of forty pollen types belonging to 22 botanical families. Total phenolic contents varied between 752.94 ± 17.78 and 12247.06 ± 40.04 mg GAE/ 100g, while the total flavonoid contents ranged from 2680.55 ± 12.02 to 8506.94 ± 15.56 mg QE/ 100g, and the total flavonol contents were in the interval between 4978.87 ± 33.39 and 7903.75 ± 24.39 mg QE/ 100g. The obtained results showed that the bulk of the ethanolic extracts had a good anti-inflammatory activity. As a conclusion, all the aforementioned heterofloral bee pollen samples could significantly be a wealthy source of polyphenols with a potential anti-inflammatory activity.

Key words: Bee pollen, Palynological analysis, Phenolic contents, Anti-inflammatory activity

ÖZ

Arı poleni, çiçek poleni ve nektar ile arı tükürük maddelerinin karmaşık bir karışımıdır. Karbonhidratlar, proteinler, lipidler, vitaminler ve fenolik bileşikler gibi birçok biyolojik olarak aktif maddenin zengin bir kaynağı olarak ünlüdür. Bileşimi, botanik kökenlere ve edafoklimatik koşullara göre büyük ölçüde değişir. Bu çalışmada, Cezayir'in kuzeydoğusunda bulunan farklı arılıklardan toplanan insan tüketimine yönelik sekiz arı poleninin botanik orijini, toplam fenolik içerikleri, toplam flavonoid içerikleri, toplam flavonol içerikleri ve *in vivo* antiinflamatuar aktiviteleri belirlendi ve karşılaştırıldı. Tüm örnekler, 22 botanik familyaya ait kırk polen türünün tanımlanmasıyla heterofloral olarak saptandı. Toplam fenolik içerik 752,94 ± 17,78 ile 12247,06 ± 40,04 mg GAE/ 100 arasında değişirken, toplam flavonoid içeriği 2680,55 ± 12,02 ila 8506,94 ± 15,56 mg QE/ 100g arasında değişmekte ve toplam flavonol içeriği 4978,87 ± 33,39 ile arasında değişmektedir. 7903,75 ± 24,39 mg QE/ 100g. Sonuçlar etanolik ekstraktların büyük kısmının iyi bir anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, yukarıda bahsedilen tüm heterofloral arı poleni örnekleri, potansiyel bir anti-inflamatuar aktiviteye sahip zengin bir polifenol kaynağı olabilir.

Anahtar kelimeler: Arı poleni, Palinolojik analiz, Fenolik içerik, Antiinflamatuar aktivite

GENİŞLETİLMİŞ TÜRKÇE ÖZET

Çalışmanın amacı: Arı poleni nektarın arı tükürük maddeleriyle aglutine edilmiş multipleks karışımıdır. Proteinler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler ve fenolik bileşikler gibi etkileyici fizyolojik olarak dinamik bileşenlere sahiptir. Arı poleni, bağışıklık uyarıcı, antimikrobiyal, antienflamatuar, antioksidan ve antinosiseptif özelliklere sahip olduğundan, geleneksel Çin tıbbında genellikle apiterapötik bir çare olarak tavsiye edilir. Bununla birlikte, bileşimi, botanik kökenlere ve edafoklimatik koşullara göre inanılmaz derecede dalgalıdır. Buna göre bu çalışmada sekiz Cezayir arı poleninin in vivo botanik orijini, toplam fenolik içerikleri, toplam flavonoid içerikleri, toplam flavonol içerikleri ve antiinflamatuar aktiviteleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Cezayir'in kuzeydoğu bölgesindeki farklı arı kovanlarından insan tüketimine yönelik sekiz arı poleni örneği toplandı. Daha sonra, Louveaux ve diğerleri tarafından belirtildiği gibi slaytlarda (asetoliz olmadan hazırlanmış) 500'den fazla polen tanesinin değerlendirilmesiyle palinolojik tanımlama doğrulandı (1978) ve polen frekansları sınıflandırıldı (de França Alves ve de Assis Ribeiro DosSantos 2014). Toplam fenolik, flavonoid ve flavonol içerikleri üç yöntem kullanılarak belirlendi: sırasıyla Folin–Ciocalteu kolorimetrik yöntem (Singleton ve Rossi 1965) ve trikloroalüminyum kolorimetrik yöntemler (Topçu ve diğerleri 2007) ve (Kumaran ve Joel Karunakaran 2007). Olası antienflamatuar aktivite, sıçanlarda formalin testi kullanılarak in vivo olarak değerlendirildi (Arzi ve ark. 2015).

Bulgular: Mikroskobik analiz, tüm örneklerin heterofloral olduğunu ortaya koydu. 22 botanik familyaya ait toplam kırk polen tipi tespit edilmiş olup, örneklerin tamamında Cistus tipi mevcuttur. Toplam fenolik içerikler 752.94 ± 17.78 ve 12247.06 ± 40.04 mg GAE/ 100g arasında değişirken, toplam flavonoid içerikleri 2680.55 ± 12.02 ila 8506.94 ± 15.56 mg QE/ 100g arasında değişmektedir. Ayrıca, toplam flavonol içerikleri 4978.87 ± 33.39 ve 7903.75 ± 24.39 mg QE/ 100g aralığındaydı. Son olarak, numunelerimizin etanolik ekstraktlarının büyük kısmının iyi bir anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu bulundu. Ek olarak, en iyi anti-enflamatuar aktivite, tüm değerlendirilen sürelerde, Diklofenak ile gözlemlenenden önemli ölçüde daha düşük şişme yüzdeleriyle ekstrak E'de gözlendi.

Sonuç: Bu çalışmada incelenen heterofloral arı poleni örnekleri, önemli bir anti-inflamatuar aktivite sergileyen zengin bir polifenol kaynağı olabilir. Bu nedenle, ilaç ve gıda endüstrilerinde kullanımı kesinlikle umut vericidir.

INTRODUCTION

In Algeria, beekeeping is a genealogical hone although its origin is lost in the mists of time. It has gained prominence over the last two decades and has become an indispensably portion for the sustainable economical advancement of agricultural and provincial exercises. The Algerian's apiarian livestock has jumped from 360000 colonies in 2000 to over 1300000 colonies in 2014, thanks to the various agricultural and rural development plans

connected within the nation (Tamali and Özkırım 2019).

Bee pollen is one of the hive-derived products (together with honey, propolis, beeswax, royal jelly, beebread and bee venom) that is expecting more noteworthy popularity among beekeepers as a result of the growing request on it from agri-food, pharmaceutical and cosmetics industries around the world. Bee pollen is advertised as a nutrient-dense food with a wide range of medicinal and nutritional benefits, which is driving up demand (Nogueira et al., 2012). Commonly designated as "the life-giving dust", it is floral pollen gathered by foraging bees, mixed with nectar then agglutinated by bee salivary substances. This bee product is harvested in a form of pellets using a trap installed at the entrance of the beehives (Thakur and Nanda 2020).

Bee pollen is usually recommended as an apitherapeutic remedy in traditional Chinese medicine since it has immune-stimulating, antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal, antioxidant, antinociceptive and antiviral properties (Komosinska-Vassev et al. 2015, Tutun et al. 2021).

It has the potential to provide vital nutrients like proteins, carbs, lipids and minerals. Furthermore, it contains some antioxidant vitamins, mainly vitamin C, E, all B-complex vitamins and provitamin A. Besides vitamins, it is considered as a rich source of polyphenols, mainly flavonoids (Khalifa et al. 2021). The chemical composition of this bee product fluctuates incredibly agreeing to plant origin and its nutrient status, geographical region, edaphoclimatic conditions, storage and degree of processing (Aylanc et al. 2021, Sattler et al. 2015)

In this context, the current work is devoted to determine the botanical origins, assess the phenolic components and evaluate the anti-inflammatory activities *in vivo* of eight bee pollens intended for human consumption with various botanical and geographical origins. As far as we are mindful, this could be the first ponder conducted on Algerian bee pollen aimed to compare and to look up for a possible relationship between the anti-inflammatory potential, the botanical origin, and the total phenolic, flavonoid and flavonol contents. In this regard, this study has the characteristic of being a preliminary study.

MATERIALS AND METHODS

Bee pollen samples

Eight bee pollen samples (A-H) intended for human consumption were collected by beekeepers during 2019 flowering season, from different apiaries in Algeria's northeastern region: sample A (Constantine), sample B (Guelma), sample C (Boumerdès), sample D (Sétif), sample E (Jijel), sample F (Skikda), sample G (Khenchla) and sample H (Tizi Ouzou) (Figure 1). After the beekeepers had dried the bee pollen, the samples were delivered and kept in the dark at ambient temperature until their used.

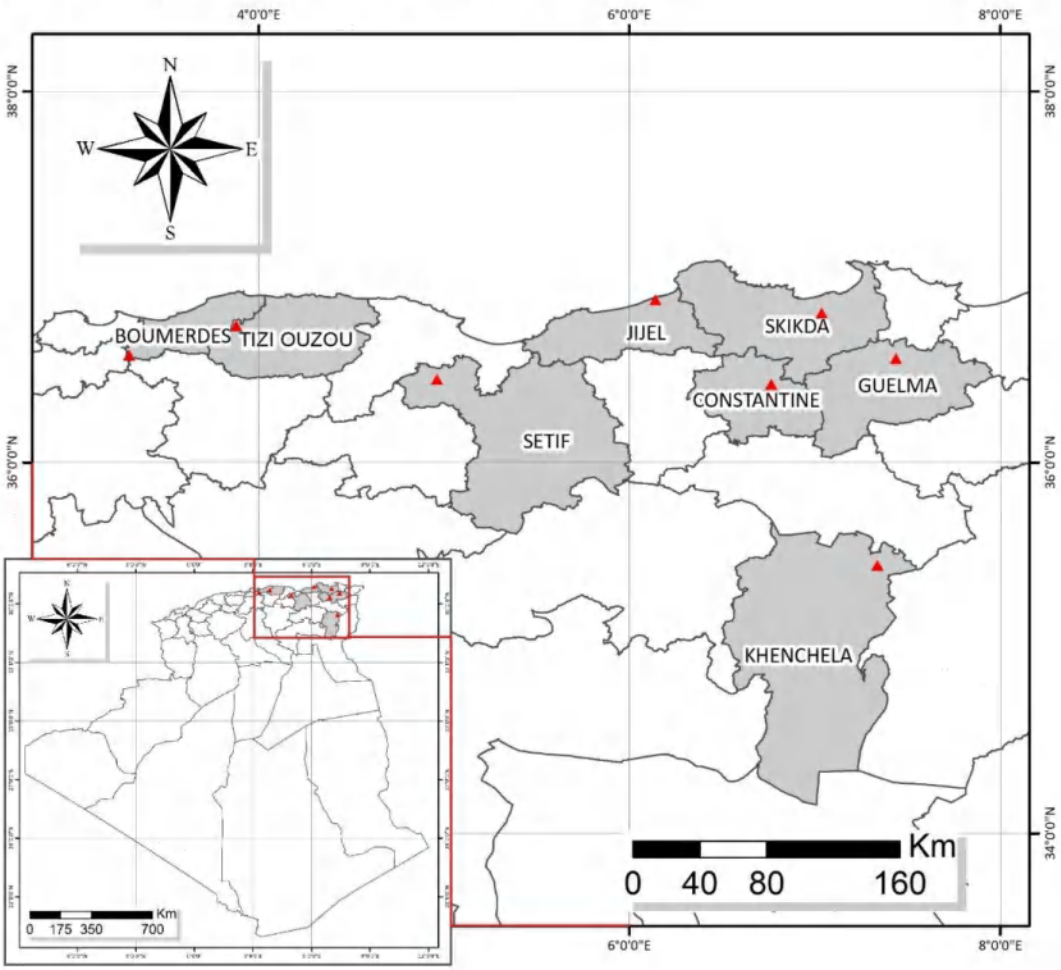
Palynological analysis

A ten-gram sample of each specimen was mixed with 100 milliliters of warm water. Two hours later, the pollen was totally macerated with a glass stick. The supernatant was drawn off after centrifugation (10 min, 2500 r/min). Water: glycerin solution (50 mL), at ratio 1:1 (v/v), was added to the pollen residue. After 2 hours and 24 hours, another centrifugation was done following the same conditions. Finally, the slides were prepared using the glycerol jelly method (Riding 2021) with the final pollen residue. During the slides mounting process, basic fuchsine was used as dye to stain pollen grains. Palynological identification of bee pollen samples was ascertained by examining over 500 pollen grains in slides prepared without acetolysis as outlined by Louveaux et al. (1978) with some modifications.

The pollen grains observation was carried out using an optical microscope, BIOSTAR B4 SP Microscope (Exacta Optech, München, Germany), at 400X and a picture analysis system EOS 450 D (CANON Inc., Japan). The authors' reference collection was used to identify pollen types, as well as specialized atlases and literature when necessary.

When the pollen grains were identified as a belonging to a particular genus and a specific species, their scientific names; consisting of the genus and the species, were applied. However, when the pollen grains had a similar morphology for some species and genus or even botanical families, the nomenclature pollen type was used. Therefore, a pollen type can be defined as a group of plants with similar pollen grains under a light microscope.

Figure 1: Apiaries geopositioning in the study area (Source: Arc Gis 10.7).



The frequency of occurrence (FO) was assigned to the types in each sample based on the percentage of each pollen type's occurrence in the sample set: De França Alves and de Assis Ribeiro DosSantos (2014) defined Rare (less than 10 percent), Less Frequent (10–20 percent), Frequent (21–50 percent), and Very Frequent (more than 50 percent).

Extracts preparation

The extracts were prepared by macerating 300 g of the powdered bee pollen samples with Ethanol (96%) at a ratio of 1:2 (w/v) for 5 days at room temperature, with solvent renovation in the third day and every 24 hours thereafter. The ethanolic extracts of bee pollen were obtained by mixing, filtering, and then concentrating the products of all extractions for each sample in a rotavap at 40 °C.

Phenolic components

Total phenolic content (TPC)

The total phenolics contents of the eight (8) extracts were assessed spectrophotometrically using the Folin–Ciocalteu method (Singleton and Rossi 1965). In every well of the microtiter plate, 100 µL of 1/10 (v/v) diluted Folin–Ciocalteu reagent and 7.5µL of sodium carbonate (7.5%) were added to 20 µL extract. After incubating the microtiter plate for 2

hours in the dark, the absorbances of each mixture were measured at 765 nm using a 96-well microtiter plate reader (Perkin Elmer, Enspire). The results were expressed as milligram gallic acid equivalents per 100 gram of bee pollen extract (mg GAE/100 g).

Total flavonoid content (TFC)

The total flavonoids contents were determined by the trichloroaluminum colorimetric method (Topçu et al. 2007). In every well, 130 µL of methanol, 10 µL of aluminum nitrate (10%) and 10 µL of aqueous potassium acetate (1 M) were added to 20 µL extract. After a 40-minutes incubation period, the absorbances were read at 415 nm using the microtiter platereader. Results were expressed as milligram quercetin equivalent per 100 gram of bee pollen extract (mg QE/100 g).

Total flavonols content (TFIC)

The total flavonols contents were carried out using the trichloroaluminum colorimetric method with slight modifications (Kumaran and Joel Karunakaran 2007). In every well, 50 µL of each extract were placed then 50 µL of aluminum nitrate (2%) and 150 µL of aqueous sodium acetate (5%) were added. After a 2-hours incubation period, the absorbances were recorded at 440 nm using the microtiter platereader. Results were expressed as milligram equivalent per 100 gram of bee pollen extract (mg QE/100 g).

Animals

Fifty male Wistar rats weighing 250–300 g, aged 3–4 months, were used for *in vivo* anti- inflammatory activity. The animals were produced and raised at the laboratory animal facility of the "Department of Animal Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Frères Mentouri Constantine 1 University, Algeria". The rats were kept in groups of five per cage, for acclimatization for seven days before the start of the experiment, under standard laboratory condition (temperature 22 ± 2 °C, photoperiodic cycle (light/darkness) of 12h and relative humidity 50 ± 5%) and unrestricted access to food and water *ad libitum*. This protocol was used in accordance with the Laboratory Animals Care and Use guidelines and approved under the PRFU project (D01N01UN250120210003) by the Ethical Committee of the DGRSDT at the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

***In vivo* Anti-Inflammatory Activity**

Formalin-induced paw edema test

The formalin-induced inflammation test was carried out based on the method of Arzi et al. (2015) with slight modifications. The Wistar rats were randomly allocated into ten homogeneous groups (n=5). After a 12-hours fast period, the rats of each group received the tested samples intraperitoneally. Group 1 received normal saline solution (5 mL/kg) and treated as negative control. Group 2 was administered by an anti-inflammatory drug (Diclofenac) in a dose of 20 mg/kg of Body Weight (BW) and considered as standard. Group 3 to 10 were given different bee pollen extracts in a dose of 200 mg/kg of BW. Thirty minutes later, acute paw edema was induced on the right hind paw by a subplantar injection of 1% formalin (100 µL). Paw volume was measured before and after formalin injection at 0, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes, using a water displacement plethysmometer (Fereidoni et al. 2000). The results (% swelling) were expressed as the proportional rise in paw volume before formalin injection. The following formula was used to calculate it:

$$\%\ swelling = \left[\frac{V_t - V_i}{V_i}\right] \times 100$$

Where V_i is the paw volume before formalin injection and V_t is the paw volume after formalin injection at different time points.

Statistical analysis

The *in vivo* experiment was carried out in quintuplicate and the data were recorded as means ± standard deviation. The one-Factor ANOVA test was used to determine whether there were significant differences between pollen samples, with the Tukey test serving as post-hoc test. Moreover, the principal components analysis (PCA) was used to check the relationships between pollen types, phenolic components and anti-inflammatory activity. All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 23.0 software (IBM® SPSS Inc.). For all analyses, the level of significance was set at 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Pollen analysis revealed that all samples were heterofloral. A total of 40 pollen types belonging to 22 botanical families were identified in eight pollen

samples (Table 1). The most diverse families were *Asteraceae* (8 types), *Brassicaceae* (4 types), *Cistaceae*, *Fabaceae*, and *Fagaceae* (3 types) respectively. The other families were represented by one or two types only.

Cistus type was the most represented, found in all samples. *Bellis*, *Boraginaceae*, *Bryonia*, *Buxus*, *Centaurea*, *Cerinthe major*, *Convolvulus*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fraxinus*, *Galactites*, *Helianthemum*, *Juglans*, *Myrtus communis*, *Oxalis*, *Poaceae*, *Quercus suber*, *Raphanus*, *Rhamnus*, *Sonchus*, *Verbenaceae*, *Vicia* and *Vitex* pollen types were in turn observed in only a single sample.

For sample A, eight different pollen types were identified, of which *Brassicaceae* and *Cistus* types were the two most frequent pollen types. Twelve pollen types were recorded in sample B without any frequent pollen types. The *Pistacia lentiscus* was the most frequent pollen type among 10 different pollen types recorded in sample C. In sample D, the two most frequent pollen types were *Cistus* and *Quercus*, out of a total of 9 pollen types. Thirteen different pollen types were found in sample E where *Quercus* type was the most frequent type. For sample F, *Brassica* was the most repeated type out of a total of 14 pollen types. The recurrent pollen types in sample G were *Brassica* and *Pistacia lentiscus* types from 7 pollen types. Finally, ten different pollen types were found in sample H, among which three pollen types were frequent: *Bryonia*, *Cistus* and *Quercus ilex*.

Table 1: Frequency of occurrence data recorded in the eight bee pollen samples

Family	Pollen Type	Samples (%)							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Anacardiaceae	***Pistacia lentiscus*** type	-	R. 9.12%	F. 45.70%	-	-	L.F. 14.97%	F. 43.04%	L.F. 11.46%
Asteraceae	***Anthemis*** type	-	-	R. 0.17%	-	-	R. 0.66%	R. 0.72%	-
	Bellis type	-	-	-	-	-	-	-	R. 0.83%
	Carduus type	-	-	R. 0.33%	-	R. 0.18%	R. 0.49%	-	-
	Centaurea type	-	-	-	-	L.F. 19.85%	-	-	-
	Cichorium type	-	-	-	-	-	R. 0.33%	R. 0.36%	R. 0.66%
	Galactites type	L.F. 10.07%	-	-	-	-	-	-	-
	Picris type	-	R. 5.34%	-	R. 0.64%	R. 0.72%	-	-	-
	Sonchus type	R. 0.72%	-	-	-	-	-	-	-
Boraginaceae	***Boraginaceae*** type	-	-	-	-	-	-	-	R. 2.49%
	Cerinthe major type	-	-	L.F. 19.25%	-	-	-	-	-
Brassicaceae	***Brassica*** type	-	-	R. 4.51%	R. 5.14%	-	F. 30.60%	F. 41.96%	L.F. 13.95%
	Brassicaceae type	F. 39.78%	L.F. 10.53%	-	L.F. 12.05%	-	R. 3.95%	-	-
	Other Brassicaceae type	-	-	-	-	R. 3.43%	-	L.F. 12.11%	R. 3.99%
	Raphanus type	-	-	-	-	-	R. 3.29%	-	-
Buxaceae	***Buxus*** type	-	R. 7.07%	-	-	-	-	-	-
Cistaceae	***Cistus*** type	F. 21.40%	L.F. 16.20%	R. 1.64%	F. 24.30%	R. 3.97%	R. 9.55%	R. 0.36%	F. 20.10%
	Halimium type	-	R. 9.90%	-	-	R. 3.43%	R. 2.96%	-	-

	Helianthemum type	-	R. 5.97%	-	-	-	-	-	-
Convolvulaceae	***Convolvulus*** type	-	-	-	-	-	-	-	R. 5.81%
Cucurbitaceae	***Bryonia*** type	-	-	-	-	-	-	-	F. 20.61%
	Cucurbitaceae type	-	-	-	-	R. 3.79%	-	-	-
Ericaceae	***Erica arborea*** type	-	-	R. 6.03%	-	-	R. 4.28%	-	-
Euphorbiaceae	**Euphorbiaceae** type	-	-	-	-	L.F. 19.68	-	-	-
Fabaceae	***Fabaceae*** type	-	L.F. 18.88%	R. 8.49%	L.F. 13.18%	-	-	R. 1.45%	-
	Lotus type	-	R. 5.19%	-	-	-	-	-	-
	Vicia type	-	-	-	-	R. 7.04%	-	-	-
Fagaceae	***Quercus ilex*** type	R. 1.08%	-	-	R. 8.84%	-	R. 5.26%	-	F. 20.10%
	Quercus suber type	-	R. 2.99%	-	-	-	-	-	-
	Quercus type	L.F. 10.07%	R. 4.25%	-	F. 20.74%	F. 22.92%	L.F. 16.43%	-	-
Juglandaceae	***Juglans*** type	-	-	-	R. 7.88%	-	-	-	-
Lamiaceae	***Vitex*** type	R. 5.57%	-	-	-	-	-	-	-
Myrtaceae	***Myrtus communis*** type	-	-	R. 2.78%	-	-	-	-	-
Oleaceae	***Fraxinus*** type	-	-	-	-	R. 2.17%	-	-	-
Oxalidaceae	***Oxalis*** type	-	-	-	R. 7.23%	-	-	-	-
Papaveraceae	***Papaver*** type	L.F. 11.33%	-	-	-	R. 2.53%	-	-	-
Poaceae	***Poaceae*** type	-	-	-	-	-	R. 3.78%	-	-
Rhamnaceae	***Rhamnus*** type	-	R. 4.56%	-	-	-	-	-	-
Rosaceae	***Rosaceae*** type	-	-	L.F. 11.10%	-	-	R. 3.45%	-	-
Verbenaceae	***Verbenaceae*** type	-	-	-	-	L.F. 10.29%	-	-	-
Number of pollen types		8	12	10	9	13	14	7	10

* F.: Frequent, L.F.: Less Frequent, R.: Rare

The results of phenolic components of the eight ethanolic extracts indicated significant differences in their total contents. Whereby, high total phenolics contents were recorded in the extract D followed by the extract G then the extracts C and E (12247.06 ± 40.04, 9050.98 ± 17.93, 7854.90 ± 33.05, and 7541.27 ± 48.71 mg GAE/100 g; respectively) with insignificant difference in the two last ones (Table 2), while the lowest content was obtained in the extract A (752.94 ± 17.78 mg GAE/100 g). For flavonoids, the extract D provides the highest content (8506.94 ± 15.56 mg QE/100 g), followed by the extract G (6076.39 ± 20.01 mg QE/100 g), whereas low values were registered in extracts A and B (2694.44 ± 22.85 and 2680.55 ± 12.02 mg QE/100 g; consecutively). Flavonols contents values ranged from 4978.87 ± 33.39 mg QE/100 g (extract B) to 7903.75 ± 24.39 mg QE/100 g (extract D).

In the anti-inflammatory activity, after formalin injection into the hind paw, the paw edema in the normal saline group, increased along with the time course and the peak edema, was registered after 240 min in which the mean of swelling percentage was 63.99 ± 2.98 % (Table 3). Our results showed that the extract E had the best anti-inflammatory

activity with the least significant swelling percentage mean in all assessed time. Followed by extract F which had also strongly and significantly activity, compared to the control group, inhibited the formalin induced paw edema, with comparable effect to the reference drug (diclofenac at 20 mg/kg BW). Furthermore, extracts A, D, G, and H exhibited mild anti-inflammatory effect, with significant statistical difference when compared to the normal saline group. However, extracts B and C did not affect the paw edema with non-significant difference compared to the control group.

Table 2: Phenolic components contents in the pollen types ethanolic extracts

Extracts	TPC (mg GAE/100 g)	TFC (mg QE /100 g)	TFIC (mg QE /100 g)
A	752.94 ± 17.78 ^{e}	2694.44 ± 22.85 ^{e}	5058.68 ± 12.97 ^{d}
B	5913.72 ± 19.13 ^{d}	2680.55 ± 12.02 ^{e}	4978.87 ± 33.39 ^{d}
C	7854.90 ± 33.05 ^{c}	5201.39 ± 37.87 ^{c}	6950.70 ± 31.72 ^{a,b}
D	12247.06 ± 40.04 ^{a}	8506.94 ± 15.56 ^{a}	7903.75 ± 24.39 ^{a}
E	7541.27 ± 48.71 ^{c}	4847.22 ± 36.10 ^{c,d}	7406.10 ± 17.13 ^{a}
F	6482.35 ± 15.5 ^{d}	4965.28 ± 27.43 ^{c}	5744.13 ± 50.46 ^{c,d}
G	9050.98 ± 17.93 ^{b}	6076.39 ± 20.01 ^{b}	6208.92 ± 43.97 ^{b,c}
H	6178.43 ± 34.45 ^{d}	4347.22 ± 27.43 ^{d}	7485.91 ± 54.82 ^{a}

*The outcomes were presented as Means ± SD of three measurements. Analysis of variance (One-Factor ANOVA and Tukey tests) revealed statistical difference ($P < 0.05$). Different superscripts (a, b, c…) for the values in the same columns are statistically different.

The obtained data on the main pollen types, the total bioactive components and the swelling percentages were ordinated with PCA analysis. In total, 48 standardized variables were introduced to create covariance matrix. Whereby, Varimex method was used as a factor analysis rotation technique and the number of extracted factors was fixed at two principal components (PCs). The PCA indicated that the two PCs accounted for 71.16% of the total variance. The first principal component (PC1) represented 40.42% and had the highest positive correlation coefficients with the swilling percentages (t+30: 0.975; t+120: 0.972; t+60: 0.964; t+180: 0.960 and t+240: 0.947). The PC2 (30.74% of the variance) had the main correlation coefficients with the total bioactive components (TPC: 0.985; TFC: 0.908 and TFIC: 0.689). The variables with high correlation coefficients appeared together in the biplot (Figure 2). Focusing on the PC1, the PCA demonstrated four bee pollen types; *Centaurea*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae* and *Fraxinus*, with negative correlation coefficient (-0.796) with the swilling percentages which means that these pollen types were characterized by potent anti-inflammatory activity. Regarding PC2, it can be concluded that *Oxalis* and *Juglans* types are positively correlated (0.575) with the total bioactive components (TPC, TFC, and TFIC) and that their presence matches up with high total bioactive components. Whereas, the three pollen types; *Galactites*, *Sonchus* and *Vitex* had a negative relationship (-0.777) with the total bioactive components.

Table 3: Effects of bee pollen and diclofenac on formalin-induced paw edema in rats.

Extracts and standards	T+30 (%)	T+60 (%)	T+120 (%)	T+180 (%)	T+240 (%)
A	19.80 ± 1.29 ^{d,e}	26.42 ± 2.89 ^{b,c}	32.49 ± 2.57 ^{c}	32.86 ± 2.60 ^{c,d}	42.38 ± 2.06 ^{c}
B	30.84 ± 2.31 ^{a}	40.01 ± 1.74 ^{a}	44.44 ± 2.55 ^{b}	55.59 ± 2.96 ^{a}	61.08 ± 1.90 ^{a}
C	29.75 ± 2.25 ^{a,b}	42.40 ± 2.51 ^{a}	53.49 ± 2.76 ^{a}	55.68 ± 3.75 ^{a}	63.71 ± 3.28 ^{a}
D	15.12 ± 1.78 ^{e,f}	23.87 ± 1.93 ^{b,c}	35.14 ± 1.51 ^{c}	38.10 ± 1.67 ^{b}	49.53 ± 1.03 ^{b}
E	3.89 ± 0.66 ^{h}	3.67 ± 0.66 ^{e}	4.22 ± 1.27 ^{f}	7.71 ± 1.46 ^{h}	10.17 ± 2.31 ^{h}
F	12.68 ± 2.74 ^{f,g}	21.97 ± 1.77 ^{c}	25.54 ± 2.47 ^{d}	28.04 ± 1.89 ^{d}	31.95 ± 2.14 ^{d}
G	18.73 ± 2.09 ^{e,}	26.75 ± 1.52 ^{b}	30.18 ± 2.07 ^{c,d}	37.70 ± 2.55 ^{b,c}	43.71 ± 1.90 ^{c}
H	23.04 ± 2.90 ^{c,d}	24.29 ± 2.48 ^{b,c}	34.97 ± 2.92 ^{c}	39.02 ± 2.21 ^{b}	49.73 ± 2.60 ^{b}
Control	26.61 ± 2.90 ^{b,c}	37.99 ± 2.37 ^{a}	57.81 ± 2.57 ^{a}	59.74 ± 1.17 ^{a}	63.99 ± 2.98 ^{a}
Diclofenac	8.74 ± 1.17 ^{g}	12.54 ± 2.98 ^{d}	11.53 ± 2.63 ^{e}	16.50 ± 2.73 ^{e}	22.49 ± 1.94 ^{e}

* The swelling percentages values mean ± SD (n = 5) were checked by One-Factor ANOVA test followed by multiple comparison test Turkey ($p < 0.05$). Outcomes with distinct superscript letters are statistically different.

DISCUSSION

The botanical identification of our samples confirmed the richness of the northeastern region of Algeria in important species resulting from the particular climate (Mediterranean climate for both tell and steppe regions), orography and human impact. Most of the found pollen types were from spontaneous species known by their high melliferous potential (Ghorabet al. 2021b, Saadia TamaliandÖzkırım 2019, Zerrouk et al. 2014). Therefrom, this floral diversity represents a great feature that favours the sustainable development of beekeeping activities in Algeria.

Even if *Asteraceae* family was the most diverse (8 types), it was not the most frequent plant family (represents just 5.25% of identified pollen types). The most abundant families in our samples were *Brassicaceae* (its 4 pollen types constituted 23.15% of identified pollen types), followed by *Anacardiaceae* (represented by its unique type *Pistacia lentiscus* with 15.53% of identified pollen types) then *Cistaceae* (14.99%) and *Fagaceae* (14.10%). Excluding *Brassicaceae* family, all the cited families are well known as good polliniferous species. However, most species of *Brassicaceae* and *Asteraceae* families were considered as nectariferous. *Fabaceae* family members (6.68% of identified pollen types) were known as good nectar and pollen producers (Ghorabet al. 2021a).

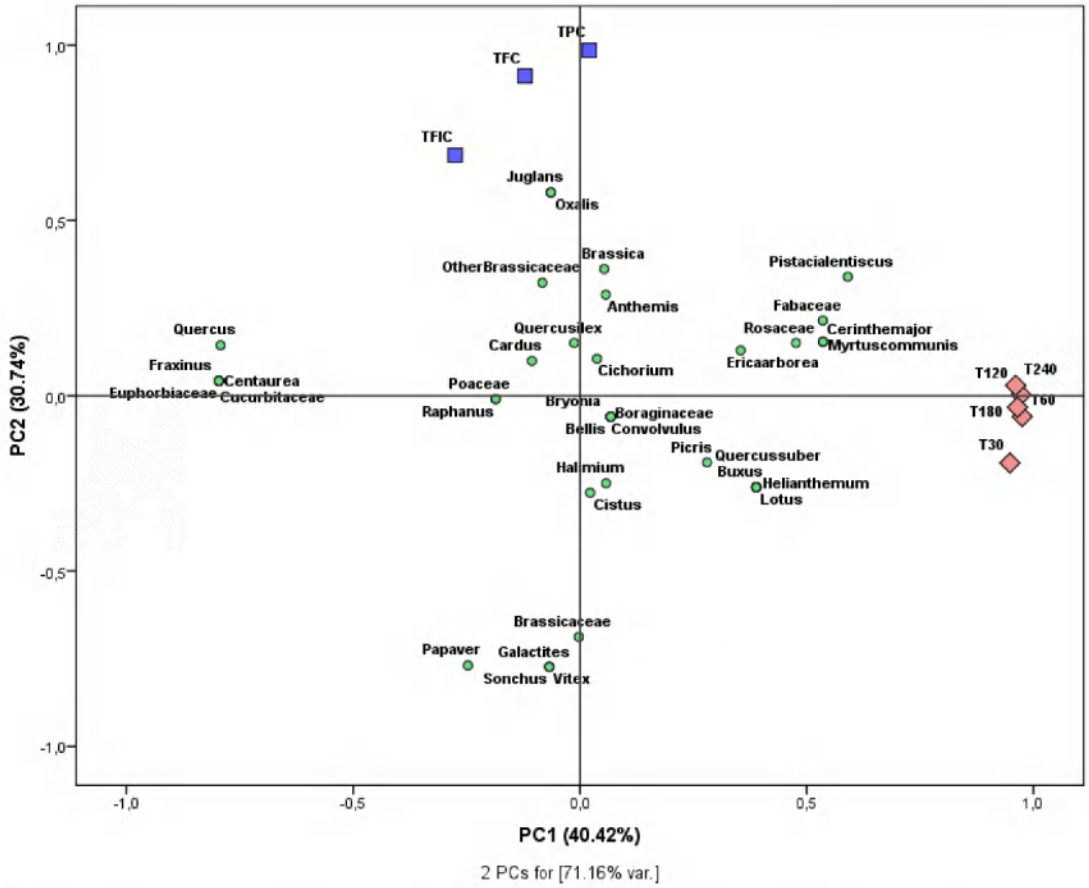


Figure 2: Loading biplot of variables (Pollen types, phenolic components and swilling percentages) included in the Principal Component Analysis (PCA)

Numerous studies in many countries have been conducted on bee pollen total bioactive components. Concerning our bee pollens, the TPCs were ranging from 752.94 to 12247.06 mg GAE/100 g, TFC ranging from 2680.55 to 8506.94 mg QE/100 g and TFIC ranging from 4978.87 to 7903.75 mg QE/100 g. Although different extraction and assay methods were used, these results were tad higher than those reported by (Asmae et al. 2021, Eraslan et al. 2009, Fatrcová-Šramková et al. 2013, LeBlanc et al. 2009, Yildiz et al. 2013). Our results can also be comparable with those obtained by (ŞahinandKarkar 2019, Žilić et al. 2014). Nevertheless, the present findings were moderately lower than those found on Turkish bee pollen (Gercek et al. 2021).

This variation is common and may be ascribed to variations in geographical origin and edaphoclimatic condition (Araújo et al. 2017, Nogueira et al. 2012). However, the most influencing factor remains botanical origin (Bogdanov 2004, Daoud et al. 2019, Estevinho et al. 2012).

The anti-inflammatory effect of our ethanolic bee pollen extracts was investigated by a method of formalin-induced paw edema in rats. This method is commonly used as a model for anti-nociceptive and anti-inflammatory activities assessment which mainly results from a neurogenic inflammation mediated by neuropeptides such as substance P (Damas et al. 1999).

The diclofenac was chosen as an anti-inflammatory drug reference. It is a proven nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) with antipyretic, anti-inflammatory and analgesic properties. Diclofenac exerts its action via cyclooxygenases (COX-1 and 2) inhibition with relative equipotency. However, extensive research shows that the mechanisms of action of diclofenac goes beyond COX inhibition and confirms that it can inhibit substance P, inhibit lipoxygenase enzymes, influence the release and uptake of arachidonic acid, activate the nitric oxide–cGMP antinociceptive pathway and alter the interleukin-6 production (Gan 2010).

The bulk of the tested bee pollen ethanolic extracts suppressed paw edema. Homogeneous effect was found in an ethanolic bee pollen extract from *Cistus sp.* of Spanish (Maruyama et al. 2010), hydroethanolic extracts of bee pollen from *M.fasculata* (Lopes et al. 2019) and from *S.aff.postica* (Lopes et al. 2020) at comparable doses showed high anti-inflammatory activity in rat carrageenan-induced paw edema models. These results confirm the hypothesis that bee pollen extract may act by COX-2 inhibition and also probably acts by NO release inhibition and as H1 histamine receptor antagonist (Lopes et al. 2019).

In mouse formalin-induced paw edema model, Choi (2007) noted that the ethanolic extract of pine (*Pinus densiflora*) bee pollen has demonstrated at the same dose (200mg/kg BW) a strong anti-inflammatory activity significantly better than that of the used anti-inflammatory drug reference (indomethacin at 10 mg/kg BW). This finding corroborates with the result observed with extract E.

The results of the PCA showed that there is no correlation between the total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the samples with the anti-inflammatory activity (0.057, -0.042 and -0.167 respectively). Therein, the registered variation of the anti-inflammatory activity in our results between the eight bee pollen extracts could be explained by the different botanical origins of our bee pollen which certainly implies a variation in their secondary metabolites composition. The high anti-inflammatory activity registered with extract E compared to remaining extracts could be attributed to its possible richness in flavonoids from the subgroup of flavonols with potent anti-inflammatory effect like quercetin and kaempherol, likewise their glycosides especially rutin (Panche et al. 2016; Rzepecka-Stojko et al. 2015). Therefore, additional research is required to identify the phenolic profile of each extract and thus clarify the possible mechanism.

This finding gives us more information and details about the relation between pollen types and phenolic components and anti-inflammatory activity of a bee pollen ethanolic extract. However, these results remain preliminary, whereby future investigations are needed to affirm them.

Several studies must be launched inside and outside Algeria on monofloral bee pollens to pinpoint the biological characteristics and the chemical composition of each pollen type, for better comprehension of their anti/pro-inflammatory activity mechanisms.

Conclusion

All bee pollen samples, intended for human consumption, collected from the northeast of Algeria, an area known for its flora diversity, are heterofloral. The ethanolic extracts of the studied samples are rich in total phenolic, flavonoid and flavonol contents. Most extracts exhibited a good anti-inflammatory activity. In this fact, Algerian bee pollen can be an important candidate which opens up new possibilities for developing many food supplements and pharmaceutical products. It is therefore advisable to give more attention and support more research on this bee hive product.

Author contributions: Conceptualization: MOKHTARI M.B., EL OUAR I. and GHORAB A., Methodology: MOKHTARI M.B. and EL OUAR I.Sample collection: MOKHTARI M.B., ZEGHINA I. and TARTOUGA M.A., Palynological Identification: MOKHTARI M.B., GHORAB A., ZEGHINA I. and TARTOUGA M.A, Phenolic components dosages: MOKHTARI M.B and BENSOUICI C., Anti-inflammatory activity: MOKHTARI M.B. and BAHRI L., Statistical analysis: MOKHTARI M.B., Writing original draft: MOKHTARI M.B, Writing -review and editing: ZEGHINA I., GHORAB A., EL OUAR I., TARTOUGA M.A. and BENSOUICI C.

Conflicf of Interest: There are no conflicting interests in the realization of the present work.

Ethical issue: Not applicable.

Funding: The authors are thankful to DGRSDT and MESRS for financial support.

Declaration of Interest:

The authors declare that they have no conflicts of interest, financial or otherwise. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments: The authors are very grateful to Dr Maria Carmen Seijo Coello & Dr Rifka Nakib for their generous support. They would like also to express their sincere appreciation for all the staff of the Faculty of Life and Natural Sciences (UFMC1), of the CRBt and CRSP.

REFERENCES

Araújo, J., Chambó, E., Costa, M., Cavalcante da Silva, S., Lopes de Carvalho, C., M. Estevinho, L. (2017). Chemical Composition and Biological Activities of Mono- and Heterofloral Bee Pollen of Different Geographical Origins. International Journal of Molecular Sciences, 18(5), 921. https://doi.org/10.3390/ijms18050921.

Arzi, A., Olapour, S., Yaghooti, H., Sistani Karampour, N. (2015). Effect of Royal Jelly on Formalin Induced-Inflammation in Rat Hind Paw. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 10(1), 8–11. https://doi.org/10.17795/jjnpp-22466.

Asmae, EG., Nawal, EM., Bakour, M., Lyoussi, B. (2021). Moroccan Monofloral Bee Pollen: Botanical Origin, Physicochemical Characterization, and Antioxidant Activities. Journal of Food Quality, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/8877266.

Aylanc, V., Tomás, A., Russo-Almeida, P., Falcão, S. I., Vilas-Boas, M. (2021). Assessment of bioactive compounds under simulated gastrointestinal digestion of bee pollen and bee bread: Bioaccessibility and antioxidant activity. Antioxidants, 10(5). https://doi.org/10.3390/antiox10050651.

Bogdanov, S. (2004). Quality and Standards of Pollen and Beeswax. APIACTA, 38, 334–341.

Choi, EM. (2007). Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Pine (*Pinus densiflora*) Pollen Extract. Phytotherapy Research, 21, 471–475. https://doi.org/10.1002/ptr.

Damas, J., Liégeois, J.-F. (1999). The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. In Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 359 (3): 220-7.

Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K., Kadri, A., Gharsallah, N. (2019). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date Palm Pollen (DPP) from two Tunisian cultivars. Arabian Journal of Chemistry, 12(8), 3075–3086. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.07.014

de França Alves, R., de Assis Ribeiro dos Santos, F. (2014). Plant sources for bee pollen load production in Sergipe, northeast Brazil. Palynology, 38(1), 90–100. https://doi.org/10.1080/01916122.2013.846280.

Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Cem Liman, B., Altinordulu, Ş., Soyer Sarica, Z. (2009). Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(3), 931–937. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.06.008.

Estevinho, LM., Rodrigues, S., Pereira, AP., Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. International Journal of Food Science and Technology, 47(2), 429–435. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x.

Fatrcová-Šramková, K., Nôžková, J., Kačániová, M., Máriássyová, M., Rovná, K., Stričík, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 48(2), 133–138. https://doi.org/10.1080/03601234.2013.727664

Fereidoni, M., Ahmadiani, A., Semnanian, S., Javan, M. (2000). An accurate and simple method for measurement of paw edema. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 43(1), 11–14. https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00089-7.

Gan, TJ. (2010). Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. In

Current Medical Research and Opinion 26(7)1715–1731. Informa Healthcare. https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301.

Gercek, YC., Celik, S., Bayram, S. (2021). Screening of Plant Pollen Sources, Polyphenolic Compounds, Fatty Acids and Antioxidant/Antimicrobial Activity from Bee Pollen. Molecules, 27(1), 117. https://doi.org/10.3390/molecules27010117.

Ghorab, A., Mesbah, M., Nakib, R., Kabli, N., Bekdouche, F., Seijo, MC. (2021a). Input to the knowledge of the melliferous plants diversity in Babors Kabylia's region (North-East of Algeria). Livestock Research for Rural Development, 33. www.lrrd.org/lrrd33/10/33119asma.html.

Ghorab, A., Rodríguez-Flores, M. S., Nakib, R., Escuredo, O., Haderbache, L., Bekdouche, F., & Seijo, M. C. (2021b). Sensorial, melissopalynological and physico-chemical characteristics of honey from Babors Kabylia's region (Algeria). Foods, 10(2). https://doi.org/10.3390/foods10020225.

Khalifa, SAM., Elashal, MH., Yosri, N., Du, M., Musharraf, SG., Nahar, L., Sarker, SD., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., Abd El-Wahed, AA., Xiao, J., Omar, HA., Hegazy, MEF., El-Seedi, HR. (2021). Bee pollen: Current status and therapeutic potential. In Nutrients (Vol. 13, Issue 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/nu13061876.

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Ka, J., Mencner, L., Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. 2015. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/297425.

Kumaran, A., oel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India. LWT - Food Science and Technology, 40(2), 344–352. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.011.

LeBlanc, BW., Davis, OK., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. Food Chemistry, 115(4), 1299–1305. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.055.

Lopes, AJO., Vasconcelos, CC., Garcia, JBS., Dória Pinheiro, MS., Pereira, FAN., Camelo, DD. S., de Morais, SV., Freitas, JRB., da Rocha, CQ., de Sousa Ribeiro, MN., do Socorro de Sousa Cartágenes, M. (2020). Anti-inflammatory and antioxidant activity of pollen extract collected by *Scaptotrigona affinis postica*: *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* studies. Antioxidants, 9(2), 1–16. https://doi.org/10.3390/antiox9020103.

Lopes, AJO., Vasconcelos, CC., Pereira, FAN., Silva, RHM., Queiroz, PFDSQ., Fernandes, CV., Garcia, JBS., Ramos, RM., da Rocha, CQ., Lima, STDJRM., Cartágenes, MDSDS., de Sousa Ribeiro, MN. (2019). Anti-Inflammatory and antinociceptive activity of pollen extract collected by stingless bee *Melipona fasciculata*. International Journal of Molecular Sciences, 20(18). https://doi.org/10.3390/ijms20184512.

Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. (1978). Methods of Melissopalynology. Bee World, 59(4), 139–157. https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714.

Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. (2010). Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus sp.* of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. In BMC Complementary and Alternative Medicine (Vol. 10). http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/30.

Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X., Estevinho, LM. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. International Journal of Molecular Sciences, 13(9), 11173–11187. https://doi.org/10.3390/ijms130911173.

Panche, AN., Diwan, AD., & Chandra, SR. (2016). Flavonoids: An overview. In Journal of Nutritional Science (Vol. 5). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41.

Riding, JB. (2021). A guide to preparation protocols in palynology. Palynology, 45(S1), 1–110. https://doi.org/10.1080/01916122.2021.1878305.

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Możdzierz, A., Buszman, E., Iriti, M. (2015). Polyphenols from Bee Pollen: Structure, absorption, metabolism and biological activity. In Molecules (Vol. 20, Issue 12, pp. 21732–21749). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules201219800.

Saadia Tamali, H., Özkırım, A. (2019). Beekeeping Activities in Turkey and Algeria. In Mellifera (Vol. 19, Issue 1).

Şahin, S., Karkar, B. (2019). The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. Journal of Food Biochemistry, 43(7), 1–8. https://doi.org/10.1111/jfbc.12888.

Sattler, JAG., de Melo, ILP., Granato, D., Araújo, E., da Silva de Freitas, A., Barth, OM., Sattler, A., de Almeida-Muradian, LB. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. Food Research International, 77, 82–91. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013

Singleton, VL., Rossi, JA. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16(3), 144 LP – 158.

Thakur, M., Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. Trends in Food Science and Technology, 98, 82–106. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarikürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry, 103(3), 816–822. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028.

Tutun, H., Kaya, MM., Usluer, MS., Kahraman, HA. (2021). Bee pollen: Its antioxidant activity. Uludağ Arıcılık Dergisi, 21(1), 8–20. https://doi.org/10.31467/uluaricilik.896045.

Yildiz, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazicioğlu, R., Canpolat, S., Kolayli, S. (2013). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/461478.

Zerrouk, S., Seijo, MC., Boughediri, L., Escuredo, O., Rodríguez-Flores, MS. (2014). Palynological characterisation of Algerian honeys according to their geographical and botanical origin. Grana, 53(2), 147–158. https://doi.org/10.1080/00173134.2014.897751.

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

Résumés

الملخص

لقاح النحل هو أحد المنتجات المشتقة من خلايا النحل ذات القيمة الغذائية العالية والغنية جدًا بالجزيئات النشطة بيولوجيًا. يختلف تكوينه على نطاق واسع حسب أصوله النباتية وظروفه المناخية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم العلاقة بين التركيبة الكيميائية و البيولوجية لثماني عينات من لقاح النحل والفاعلية المضادة للأكسدة, للالتهابات و الحساسية.

تم تحليل ثماني عينات من لقاح النحل مأخوذة من مناطق مختلفة من شمال الجزائر. قمنا بتحديد كمية المحتويات الفينولية (البوليفينول ، الفلافونويد والفلافانول) من المستخلصات الإيثانولية مع القيام بتوصيف المكونات الفينولية بواسطة LC-MS و تقدير كمية البروتينات الكلية للقاح النحل و تحليلها بواسطة page-SDS. مع اختبار النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الإيثانولية *in vitro* من خلال عدة تقنيات طيفية. كما تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات للمستخلصات *in vivo* واستخدم مستخلص لقاح النحل الأكثر فعالية لتحديد تأثيره على حساسية الجهاز التنفسي عند الجرذان.

من خلال النتائج توصلنا إلى تحديد 40 نوعًا من حبوب اللقاح النحل ذات أصل زهري مختلف, أظهرت دراسة المركبات الفينولية أن المستخلصات غنية جدًا بالمركبات الفينولية. بينت الدراسة خارج العضوية أن جميع المستخلصات تمتلك نشاطًا مضادًا للأكسدة. كما أكدت نتائج الرحلان الكهربائي الاختلاف في تركيبة حبوب اللقاح وأوضح النشاط المضاد للالتهابات عند الجرذان أن غالبية المستخلصات لها فعالية جيدة كمضاد للالتهابات، وقد تم تسجيل أفضل نشاط لها مع مستخلص جيجل. تم شرح الاختلافات الكبيرة التي لوحظت بين تأثيرات المستخلصات في الأنشطة المختلفة من خلال التركيبة الفينولية. مقارنة بنتائج أعراض الحساسية المسجلة، أعطى مستخلص جيجل تأثيراً جيداً كمضاد للحساسية.

كل هذه النتائج المحصل عليها تأكد الفرضية التي تشير إلى أن تنوع لقاح النحل مرتبط بالأصل النباتي والجغرافي وكذلك بالظروف المناخية. تؤكد هذه النتائج على غنى لقاح النحل من المركبات الفينولية التي تتمتع بمضادات أكسدة, مضادة للالتهابات ومضادة للحساسية.

الكلمات المفتاحية : لقاح النحل, حساسية الجهاز التنفسي, مضاد للالتهابات, مضادة الأكسدة, مضاد الحساسية

Abstract

Bee pollen is one of the hive-derived products with a high nutritional value and very rich in bioactive molecules. Its composition varies widely depending on its botanical origins and edaphoclimatic conditions.

The objective of this study is to evaluate the relationship between the chemical and biological composition of 8 bee pollen samples and the antioxidant, anti-inflammatory ant anti-allergic potencies. Therefore, the samples of bee pollen collected from eight regions in the north of Algeria were palynologically analyzed to identify the botanical origins. The phenolic contents (polyphenols, flavonoids and flavanols) of the ethanolic extracts were quantified, before proceeding to a characterization of the phenolic profile by LC-MS. The antioxidant activity was tested *in vitro* by 8 complementary methods: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, SNP, O-Phenanthroline, GOR and β-carotene. The anti-inflammatory activity of the extracts was evaluated *in vivo* and the extract with the best activity was used to assess the anti-allergic effect *in vivo* on an animal model of pollen respiratory allergy. Pollen proteins were quantified and analyzed by SDS-page.

The results of the palynological analysis revealed that all bee pollen samples are heterofloral with the identification of 40 types of pollens. The dosages of phenolic compounds showed that the extracts are very rich in polyphenols, flavonoids and flavonols. The *in vitro* study demonstrated that all the extracts possess an antioxidant activity. The anti-inflammatory activity *in vivo* showed that the most extracts have a good anti-inflammatory potency, however the best activity was recorded with the extract of Jijel. The significant variations noted between the effects of the extracts in the different activities were explained by the phenolic profiles.

The results obtained by allergic symptom scores, serum proteins electrophoresis and the lung histological investigations proved that the extract of Jijel show a good anti-allergic effect. The SDS-page electrophoretic profiles confirmed the variation in the composition of the various pollens.

Our results confirmed that the variability of bee pollen is linked to the botanical origins as well as to the edaphoclimatic conditions. These results underline the richness of bee pollen in phenolic compounds endowed with a strong antioxidant, anti-inflammatory and anti-allergic potential.

Key words: Bee pollen, Respiratory allergy, Anti-inflammatory, Antioxidant, Anti-allergic.

Année universitaire : 2022/2023	Présentée par **MOKHTARI Mohamed Badreddine**

Intitulée

Evaluation de la relation entre la composition biochimique et le pouvoir immuno-modulateur du pollen d'abeille collecté de diverses régions d'Algérie

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat

Résumé

Le pollen d'abeille est un des produits de la ruche d'une haute valeur nutritionnelle et très riche en molécules bioactives. Sa composition varie largement en fonction de ses origines botaniques et des conditions édaphoclimatiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la relation entre la constitution biologique et phytochimique de 8 échantillons de pollen d'abeille et leurs pouvoirs antioxydants, anti-inflammatoires et anti-allergiques. Les échantillons de pollen d'abeille collectés dans 8 régions du Nord algérien ont été palynologiquement analysées afin d'identifier les origines botaniques. Les teneurs en composés phénoliques (polyphénols, flavonoïdes et flavanols) des extraits éthanoliques ont été quantifiées, avant de procéder à une caractérisation du profil phénolique par LC-MS. L'activité antioxydante a été testée *in vitro* spectroscopiquement : DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, SNP, O-Phenanthroline, GOR et β-carotène. L'activité anti-inflammatoire des extraits a été évaluée *in vivo* et l'extrait ayant la meilleure activité a été utilisé pour déterminer son effet anti-allergique *in vivo* sur un modèle animal d'allergie respiratoire au pollen. Les protéines polliniques totales ont été quantifiées et explorées par SDS-page.

Les résultats de l'analyse palynologique ont révélé que tous les échantillons de pollen d'abeille sont hétérofloraux avec l'identification de 40 types de pollen. Les dosages des composés phénoliques ont montré que les extraits sont très riches en polyphénols, flavonoïdes et flavonols. L'étude *in vitro* a noté que tous les extraits possèdent une activité antioxydante et la RCP révèle que les extraits de Jijel et Skikda possèdent la meilleure activité antioxydante. Les profils électrophorétiques des protéines polliniques totales ont confirmé la variation de la composition des divers pollen étudiés. L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a indiqué que la majorité des extraits ont un pouvoir anti-inflammatoire dont la meilleure activité est constatée avec l'extrait de Jijel. Les variations significatives constatés entre les effets des extraits dans les différentes activités ont été expliquées par les profils phénoliques. L'extrait de Jijel a démontré un effet anti-allergique constaté par l'étude comportementale et a été confirmé par l'étude histologique des poumons.

Les résultats obtenus confirment que la variabilité du pollen est liée à l'origine botanique et géographique ainsi qu'aux conditions édaphoclimatiques. Ces constatations soulignent la richesse du pollen d'abeille en composés phénoliques dotés d'un fort potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-allergique.

Mots clés. Pollen d'abeille - Allergie respiratoire - Anti-inflammatoire – Antioxydant - Anti-allergique

Laboratoire de recherche. Immunologie et Activités Biologiques des Substances Naturelles