

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT Sciences de la Matière



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie organique appliquée

Par :

HADJ AISSA FEKHAR Redeouane
HADJ YAHIA El hadi

THEME

**Quantification des composés phénoliques et évaluation
de l'activité antioxydante des extraits de pollen de la
région de Laghouat**

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

<i>Mr. HAMDI Ahmed</i>	<i>M.C.A</i>	Président
<i>Mlle. BATANA Fatima Zohra</i>	<i>M.A.A</i>	Examinatrice
<i>Mr. KORIBA Bakhti</i>	<i>M.A.A</i>	Examineur
<i>Mr. BOUCHOUKA El Mouloud</i>	<i>M.C.B</i>	promoteur

Année Universitaire 2017- 2018

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire nous remercions **ALLAH** qui nous a aidé et donné de la patience et du courage durant ces longues années d'études.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement Monsieur

BOUCHOUKA El Mouloud Maître de conférences à l'Université de Laghouat de nous avoir permis de bénéficier de son expérience, de sa présence et surtout pour ses conseils précieux.

Nous tenons aussi à remercier Monsieur **HAMDI Ahmed** Maître de conférences à l'Université de Laghouat d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance. Nous le remercions encore en tant que Chef de département de science de la matière de l'Université AMAR TELIDJI d'avoir mis à notre disposition tout le matériel nécessaire.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury : **M^{elle} BATANA Fatima Zohra** et Monsieur **KORIBA Bakhti** Maîtres assistants pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre mémoire et d'avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions aussi le personnel de laboratoire pour leur disponibilité.

Nous aimerions en fin exprimer notre reconnaissance à tous nos amis et collègues pour leur soutien moral et matériel.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction Générale	01
II. Matériel Et Méthode	04
II.1. Matériel	04
II.1.1. Appareillage et produits	04
II.1.2. Matériel Végétal	04
II.2. Méthodes	05
II.2.1. Extraction de la matière végétale	05
II.2.2. Quantification des composés phénoliques	07
II.2.2.1. Dosage des phénols totaux	07
II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes	08
II.2.3. Évaluation de l'activité antioxydante	08
II.2.3.1. Test DPPH	09
II.2.3.2. Test ABTS	10
III. RESULTATS ET DISCUSSION	11
III.1. Quantification des composés phénoliques	11
III.2. Évaluation de l'activité antioxydante	14
IV. CONCLUSION GENERALE	19
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIE	20
VI.RESUME	

Liste des Abréviations

Abs	Absorbance
ABTS	Acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EAG	Équivalent acide gallique
Ebr	Extrait hydrométhanolique (Extrait brut)
EC	Équivalent catéchine
EC₅₀	La concentration en extrait phénolique nécessaire pour l'inhibition de 50% des radicaux libres
PI %	Pourcentage d'inhibition
UV	Rayons ultraviolet
VC	Vitamine C
λ	Longueur d'onde (nm)
A.	Acétone
M.	Méthanol

Liste des Figures

Figure 1:	Schéma d'une fleur montrant les grains du pollen	02
Figure 2:	Patte d'abeille chargée de pollen	02
Figure 3:	Trappe de pollen	02
Figure 4:	Composition du pollen	03
Figure 5:	Les grains de pollen	04
Figure 6:	Couleurs de pollen (350 px)	05
Figure 7:	Protocole d'extraction hydrométhanolique et acétonique	06
Figure 8:	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	07
Figure 9:	Courbe d'étalonnage de catéchine	08
Figure 10:	Structure chimique du radical DPPH [•] et de sa forme réduite.	09
Figure 11:	Structure chimique du radical ABTS ^{•+} et de sa forme réduite	10
Figure 12:	Rendements des extraits de pollen	11
Figure 13:	Variation de la teneur en polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes.	13
Figure 14:	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits pollen hydrométhanoliques dans le test DPPH.	15
Figure 15:	Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits pollen acétoniques dans le test DPPH.	16

- Figure 16:** Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des antioxydants standards dans test DPPH. 16
- Figure 17:** Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits pollen hydrométhanoliques dans le test ABTS. 17
- Figure 18:** Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits pollen acétoniques dans le test ABTS. 17
- Figure 19:** Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des antioxydants standards dans le test ABTS. 18

Liste des Tableaux

Tableau 1	Appareillage et produits	4
Tableau 2	Rendements d'extractions et concentrations des extraits.	12
Tableau 3	Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de différentes graines	14
Tableau 4	Valeurs de l'EC ₅₀ et du TAC des différents extraits dans le test DPPH et le test ABTS	15

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

La médecine traditionnelle est pratiquée dans la plupart des pays ; 40 à 60 % de la population a recours à la médecine traditionnelle (Rokia, S. 2006). Celle-ci a par ailleurs un rôle économique important dans de nombreux pays.

Depuis ces dix dernières années, les milieux universitaires et industriels s'intéressent de plus en plus à la médecine traditionnelle et aux plantes médicinales.

Le manque de médicaments essentiels, le coût élevé des médicaments et les habitudes socioculturelles des populations expliquent le recours aux pratiques de la médecine traditionnelle à base de plantes médicinales.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, comme les alcaloïdes, les terpénoïdes et les composés phénoliques.

Les polyphénols ou composés phénoliques forment une grande classe de produits chimiques qu'on trouve dans les plantes au niveau des tissus superficielles, ils sont des composés phytochimiques polyhydroxylés et comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones. Ils se subdivisent en sous classe principales ; les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines, les tanins...comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle important à la vie de la plante notamment à la défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et à la protection contre les rayonnements UV ; sachant que tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements solaires (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Ils sont des molécules biologiquement actives largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antimicrobiens, anti-radicalaires et antioxydants (Djemai, S. et *al.*, 2008).

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries, "poumons" de la cellule, qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène et de l'azote en équilibre avec les systèmes antioxydants

Le stress oxydant est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés oxydants et leur élimination.

Les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (**les antioxydants primaires**) ou en épurant les radicaux libres oxygénés formés (**les antioxydants secondaires**). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en

outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire(Gardes- Albert, 2003).

Le pollen, en tant que produit naturel très abondant, est un constituant de certaines plantes. Il constitue l'élément fécondant mâle des fleurs (**Figure 1**). Ce sont des grains aux formes parfois très complexes de couleurs très variées (beige pour le framboisier, orange pour le pissenlit, noir pour le coquelicot...). Il se trouve dans les anthères des étamines. Lorsqu'il atteint le stigmate (partie femelle de la fleur) il « germe » et lance un tube pollinique vers l'ovule de la fleur).

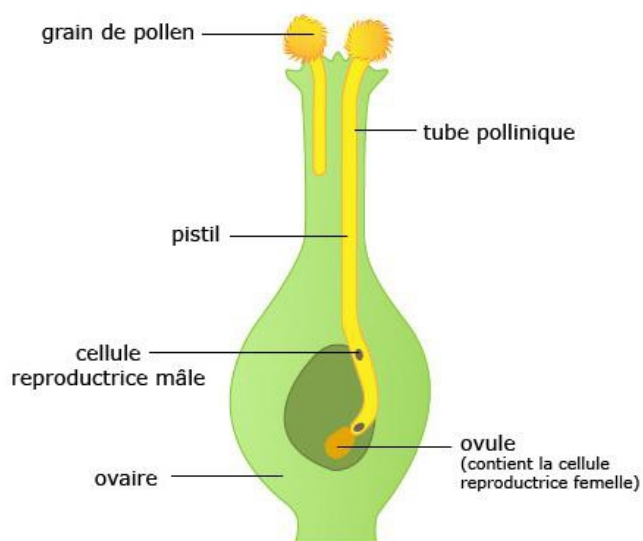


Figure 1 : Schéma d'une fleur montrant les grains du pollen (www.maxicours.com)

La technique du ramassage du pollen s'est beaucoup améliorée depuis quelques années. Il peut s'effectuer de deux manières :

- On laisse les abeilles butiner le pollen et l'on recueille les « pelotes » qu'elles laissent tomber dans la trappe à pollen (Louveaux, 1958) (**Figures 2 et 3**).
- On peut récolter le pollen mécaniquement (ou à la main), directement, à partir des plantes.



Figure 2 : Patte d'abeille chargée de pollen

Figure 3 : Trappe de pollen

L'intérêt du pollen est grand en agriculture, en médecine ou au point de vue purement scientifique. Il est très riche en composants chimiques (protéines, lipides, glucides, vitamines hydrosolubles et liposolubles) (Campos et *al.*,2008) et considéré comme une source d'antioxydants.

La composition du pollen peut varier fortement en fonction des fleurs que les abeilles butinent.

La **figure 4** donne quelques valeurs relatives à la composition générale de pollen

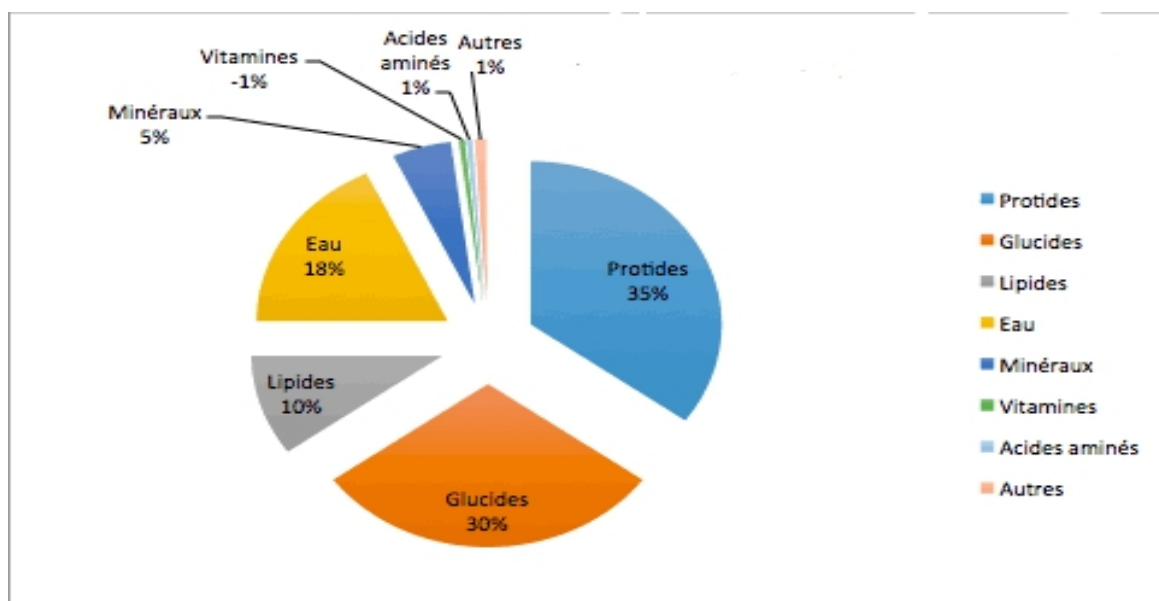


Figure 4 :Composition du pollen(www.abeillesduberry.com)

En effet, la famille des polyphénols devient le point de départ de toutes les recherches scientifiques en particulier pour la découverte des molécules naturelles à très forte activité antioxydante.

Dans le contexte de recherche des antioxydants naturels, nous nous sommes intéressés, d'une part, à évaluer les propriétés antioxydantes de trois échantillons de pollen de trois couleurs différentes. D'autre part, la quantification des composés phénoliques et des flavonoïdes a été envisagée en vue de rechercher une éventuelle corrélation entre ces derniers et l'activité antioxydante.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Appareillage et produits

Dans notre travail nous sommes utilisées les produits et le matériel qui dans le tableaux suivant

Tableau 1 : Appareillage et produits

Appareillage	Produits	
Rota vapeur	Méthanol	Folin- Cioclateu
Spectrophotomètre	Acétone	DPPH
Agitateur	Ethanol	ABTS
Balance	H ₂ O	Catéchine
Micropipettes	Na ₂ CO ₃	Acide gallique
Etuve	AlCl ₃	VC
Tubes à essai	NaNO ₂	Trolox
Cuvette en quartz	NaOH	BHA

II.1.2. Matériel Végétal

Le pollen a été récolté par un apiculteur au début de février 2018, dans la région de Laghouat. Le tri du pollen frais a permis d'obtenir trois échantillons de trois couleurs différentes : rouge, vert et orange. Les échantillons sont stockée dans des boites en verre dans un endroit froid (réfrigérateur) jusqu'à leur utilisation.

Nom communs: pollen d'abeilles, pollen de fleurs, bifteck des abeilles(**Figure 5**).

Classification botanique: pas de classification botanique.



Figure 5 : Les grains de pollen (urbanbeehoney.ca)

Description de pollen : Le pollen est l'élément reproducteur mâle des plantes à graines. Il présente une multitude de corpuscules microscopiques contenus dans les sacs polliniques de l'anthere des fleurs, constituant les éléments fécondants mâles de celles-ci(**Figure 6**)

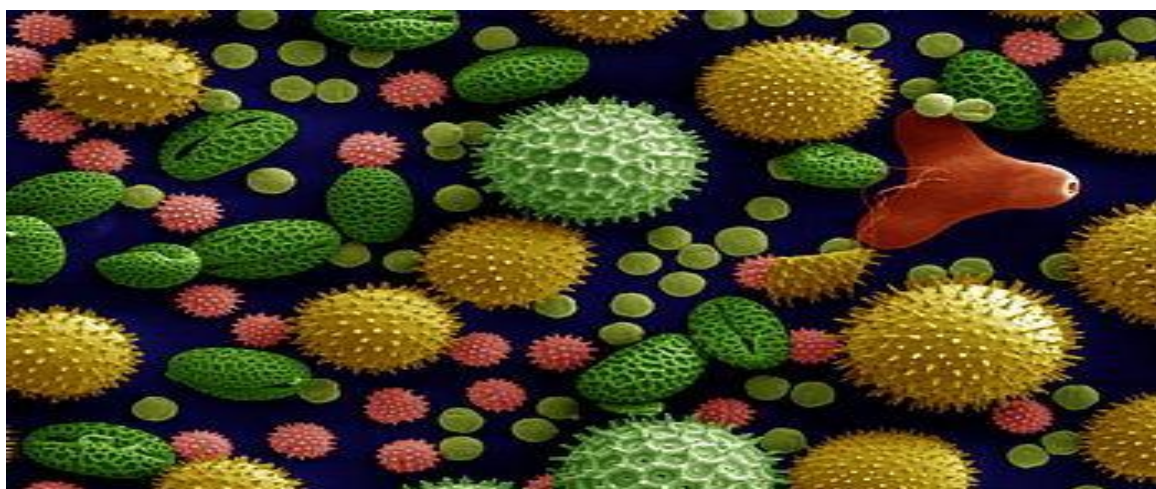


Figure 6 : Couleurs de pollen (350 px) (commons.wikimedia.org)

Utilisations thérapeutiques de pollen : Le pollen permet de lutter efficacement contre la fatigue, physique ou intellectuelle et aide à améliorer la mémoire, surtout chez les personnes matures. Il est utilisé comme : stimulant de l'organisme, euphorisant, fortifiant, reconstituant, rééquilibrant fonctionnel, anti-allergène et stimulant du transit. (Sarni-Manchado, 2006)

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction de la matière végétale

Dans notre étude, la méthode d'extraction utilisée est une macération à froid effectuée en utilisant séparément deux solvants organiques : Méthanol 80% (volume) et Acétone. Ceci permet dans une certaine mesure de mettre en évidence l'effet du solvant aussi bien sur la quantité de l'extrait obtenu à partir du pollen que sur sa qualité en terme d'activité biologique recherchée en l'occurrence l'activité antioxydante. Une quantité de 7 g de chaque échantillon de pollen frais (rouge, vert et orange) est macérée trois fois dans 70 ml du solvant choisi (Méthanol 80% et Acétone) pendant 24h sous agitation. Les macérations ainsi obtenues sont filtrées sur papier filtre, puis évaporées à sec sous vide à l'aide d'un rota vapeur à 45°C. Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma suivant (**Figure7**) :

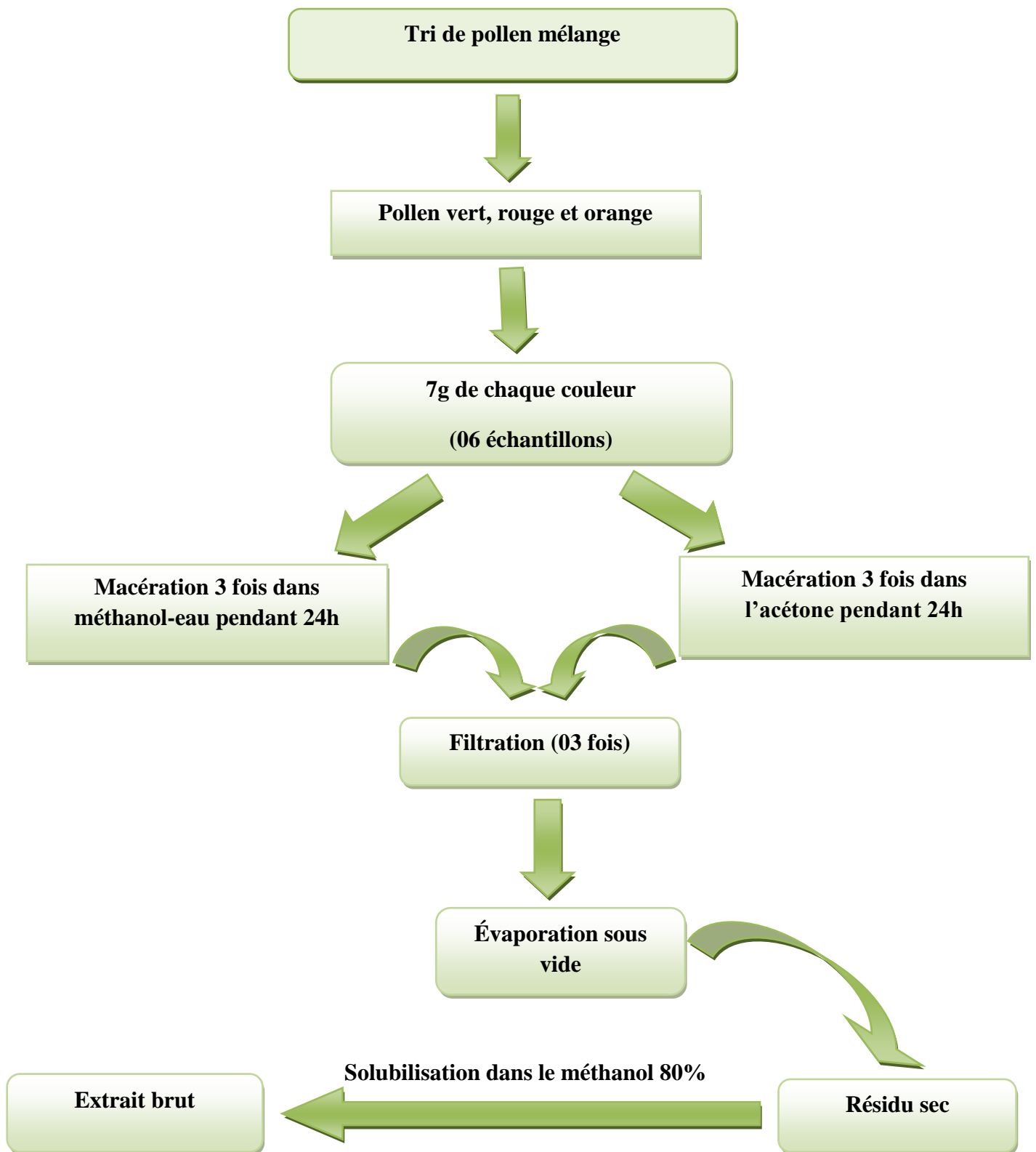


Figure 7: Protocol d'extraction hydrométhanolique et acétonique

II.2.2. Quantification des composés phénoliques

II.2.2.1. Dosage des phénols totaux

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode au réactif de Folin- Cioclateu (Singleton et *al.*, 1999); Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Cioclateu en un complexe ayant une couleur bleu constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (Boizot et *al.*, 2006).

Dans un tube à essai, on introduit 100µl de l'extrait convenablement dilué, 100µl de réactif de Folin-Cioclateu, 1 ml de carbonates de sodium(Na_2CO_3)7,5 % et 400µl de H_2O . Le tube est ensuite incubé à l'ombre, à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 750 nm. Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière fraîche (mg EAG/g MF)(**Figure 8**).

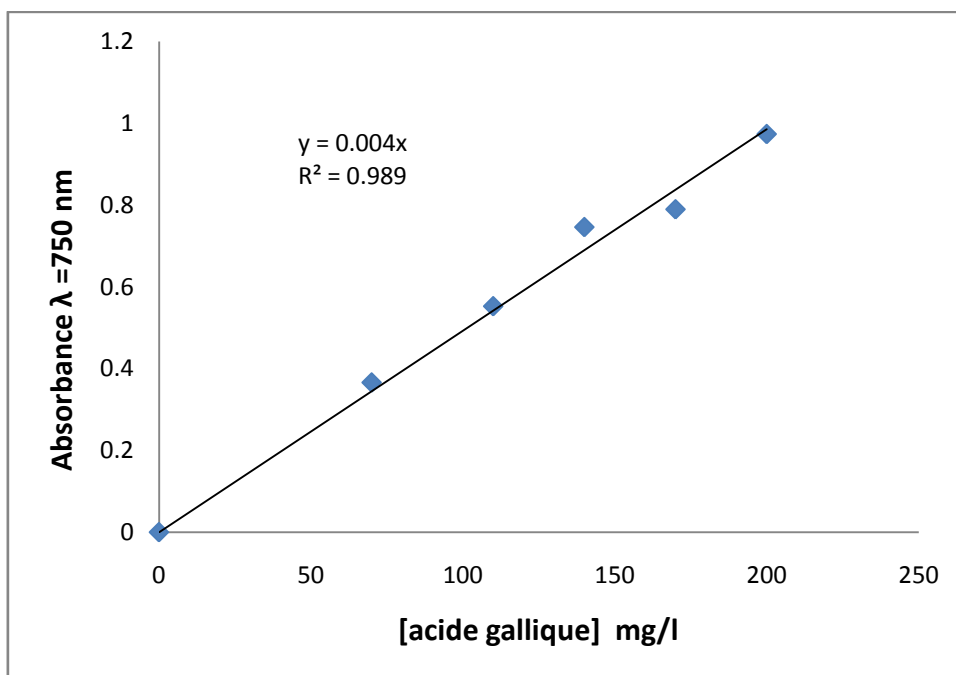


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Une version légèrement modifiée de la méthode de (Zhishen et *al.*, 1999, Dewanto et *al.*, 2002) a été employé pour déterminez les teneurs en flavonoïdes des échantillons en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Cette méthode est basée sur la complexassions entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium en présence de nitrite de sodium et la soude, ce qui entraîne une coloration rose détectable dans le visible.

Les teneurs en flavonoïdes des extraits ainsi préparés ont été calculées à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine choisie comme étalon (**Figure 9**).

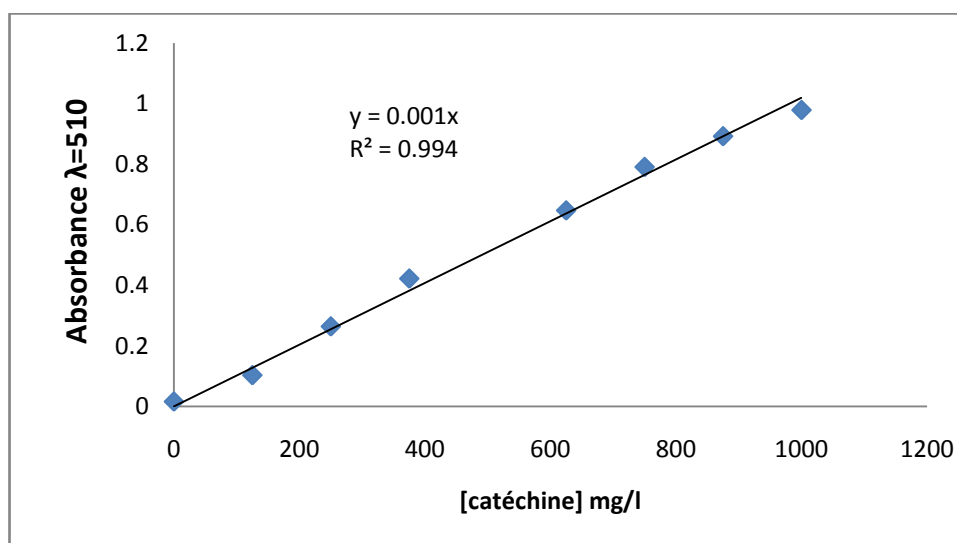


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de catéchine

Dans une fiole jaugée de 10 ml, nous avons introduit 1ml de chaque échantillon, 5 ml d'eau distillée et 0.3 ml de 5% de NaNO_2 . Après 5 minutes, 0.6 ml de 10% d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a été ajouté. 2 mL de NaOH de concentration 1M a été ajouté 5 minutes plus tard et alors le volume était ajusté à 10 ml avec de l'eau distillé. La solution est bien homogénéisée et l'absorbance a été mesurée immédiatement à 510 nm contre un blanc en employant le même spectrophotomètre pour le dosage précédent.

II.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Deux tests ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* des extraits bruts hydrométhanoliques et acétoniques des trois types de pollens étudiés dans ce travail. Il s'agit du pouvoir piègeur du radical cationique $\text{ABTS}^{+\cdot}$ et du pouvoir piègeur du radical DPPH^{\cdot} .

II.2.3.1. Test DPPH

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (**Figure 10**). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (Brand-Williams, 1995).

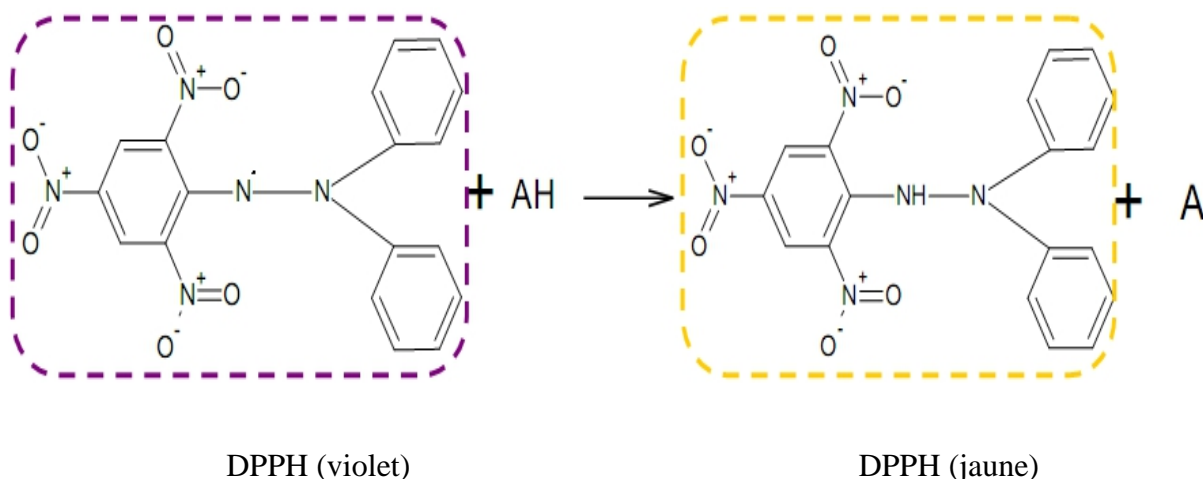


Figure 10 : Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite.

Protocole

L'effet piègeur ou le pouvoir antiradicalaire des extraits Ebr et acétone des trois types de pollens étudiés vis-à-vis du radical DPPH[•] est évalué selon la méthode décrite par Hansraj et ses collaborateurs (2006) en y apportant quelques modifications. Un volume de 1 ml de la solution de DPPH[•] (0.2 mM) préparée dans l'éthanol 80% est mélangé avec 1 ml des solutions d'extraits ou des antioxydants de référence (BHA, Troloxet Vitamine C) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition (PI%) est calculé par la relation suivante :

$$I\% = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

La concentration efficace (EC₅₀) qui est la concentration d'extrait ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH[•] présents dans le meilleur actionnel, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH[•] en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence.

II.2.3.2. Test ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates (**Figure 11**).



En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm (Chen *et al.*, 1997). Ce test est simple, opérationnel, reproductible, et peut être utilisé dans différents milieux.

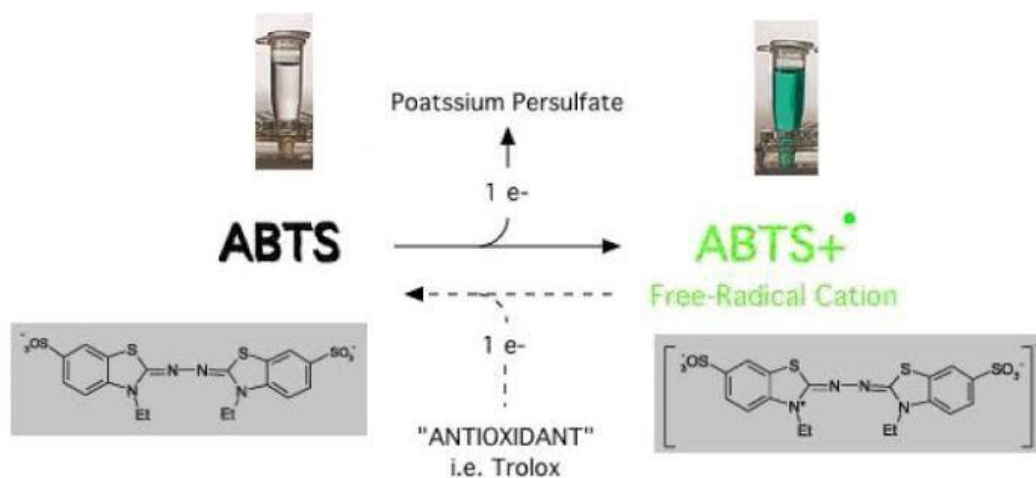


Figure 11 : Structure chimique du radical ABTS^{•+} et de sa forme réduite

Protocole

Le test ABTS est effectué selon la méthode décrite par Re et ses collaborateurs (1999). Deux solutions ont été préparées : une solution d'ABTS (7mM) et une solution de persulfate de potassium (2.4 mM). Le radical cationique ABTS^{•+} est généré en mélangeant les deux solutions en quantités équivalentes. Le mélange est laissé réagir pendant 12 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution ainsi obtenue est diluée avec de l'eau distillée pour avoir une absorbance de 0.7 ± 0.02 mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 734 nm.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Quantification des composés phénoliques

Les extraits phénoliques ainsi obtenus présentent généralement un aspect visqueux de couleur orange, vert et rouge avec un rendement qui varie entre 50,85 et 5,01%. (**Tableau 2**). Il a été constaté que la plus importante quantité du résidu sec a été trouvée dans le pollen de l'échantillon M. rouge comparativement aux autres échantillons. Les extraits de l'échantillon A. rouge et A. orange ont les plus faibles rendements.

M : Méthanol-eau , A : Acétone

Tableau2 :Rendements d'extraction et concentrations des extraits.

Pollen	Extrait	Rendement (%)	Concentration (g/l) (Résidu sec)
<i>Rouge</i>	Ebr	50,85	15
	Acétone	5,01	
<i>Vert</i>	Ebr	45,14	15
	Acétone	7,28	
<i>Orange</i>	Ebr	45,97	15
	Acétone	5,05	

La figure suivante représente les rendements des différents extraits (**Figure12**) :

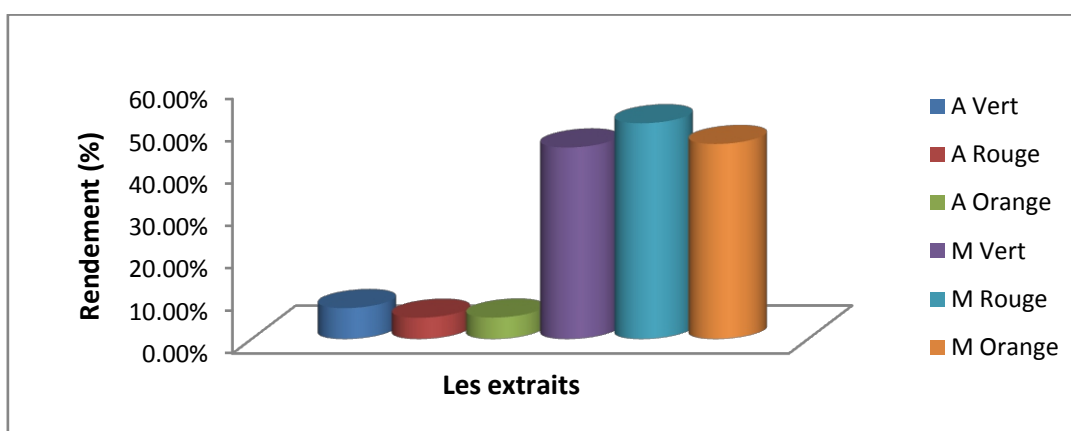


Figure 12: Rendements des extraits de pollen

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de pollen a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique (GAE) par gramme de matière fraîche. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

La quantification des flavonoïdes dans nos extraits a été déterminée en utilisant la relation numérique de la courbe d'étalonnage de la catéchine. Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalents de catéchine (EC) par gramme de matière fraîche et regroupés dans le tableau 3.

D'après la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus lors de la quantification des phénols totaux, on peut constater que les teneurs de ces composés varient entre 92,25 et 12,7 mg EAG /g, et les valeurs des quantités de flavonoïdes obtenus sont comprises entre 591,2 et 43 mg EC/g de la matière. Les taux des composés flavonoïdiques et phénoliques les plus élevés ont été détectés dans les échantillons A. vert et A. orange, tandis que les teneurs les plus basses sont remarquées dans les échantillons M. orange et M. rouge (**Tableau 3**). Mais si on compare les teneurs en phénols totaux de l'échantillon hydrométhanoliques et acétoniques, on trouve le dernier et plus élevé à l'échantillon hydrométhanoliques et l'inversement de cette valeur, lorsque nous comparons le rendement, on remarque que l'échantillon hydrométhanoliques plus grande à l'échantillon acétoniques (même façon avec des composés flavonoïdique). Une explication simple pourra être retirée de ce résultat, c'est que le résidu de l'échantillon hydrométhanoliques renferme des molécules autres que les composés phénoliques ou composés flavonoïdique. Également, nous avons remarqué que les teneurs en flavonoïdes des extraits sont supérieures à celles des phénols totaux. Cette différence pourra être due aux phénols standards utilisés pour la préparation des courbes d'étalonnage ou même aux méthodes choisies pour le dosage. Nous avons également représenté la variation de la teneur des polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes (**Figure 13**). D'après ce graphe, il est clair qu'il existe une bonne corrélation positive entre la teneur en phénols totaux et le taux des flavonoïdes ($R^2 = 0.691$). Ce résultat peut être expliqué par le fait que la quantité des flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en polyphénols d'un échantillon à un autre et que les pollens étudiés renferment en général un matériel polyphénolique riche en composés flavonoïdiques.

Tableau 3 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits

Pollen	Extrait	Teneur en phénols totaux (mg EAG /g)	Teneur en flavonoïdes (mg EC/g)
	Ebr	12,700 ± 0,25	34,466 ± 5,00
<i>Orange</i>	Acétone	107,33 ± 1,25	444,33 ± 10,5
	Ebr	13,575 ± 3,375	43,000 ± 3,00
<i>Rouge</i>	Acétone	18,958 ± 3,875	280,33 ± 6,00
	Ebr	44,750 ± 1,000	102,8 ± 1,00
<i>Vert</i>	Acétone	92,25 ± 1,125	591,2 ± 10,0

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± Ecart type.

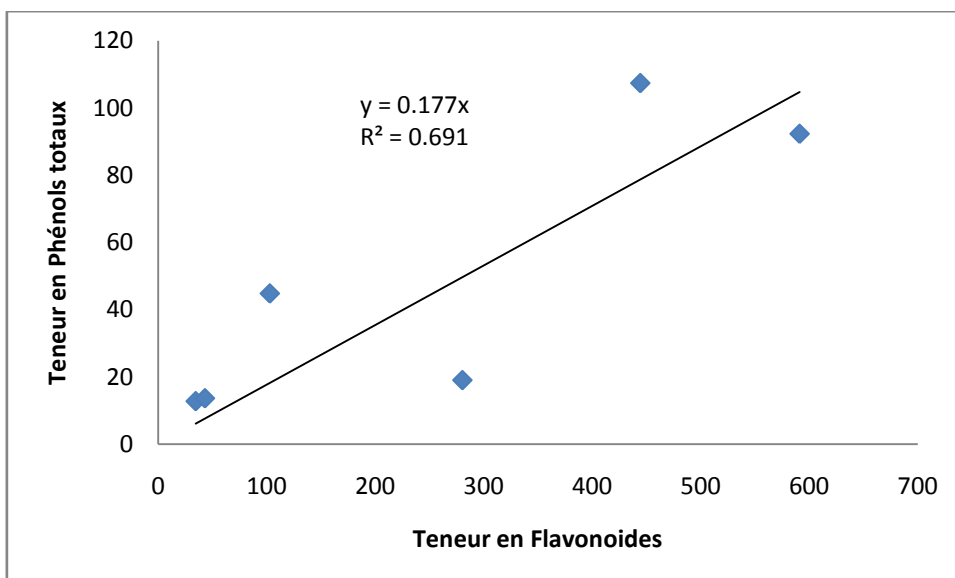


Figure 13 : Variation de la teneur en polyphénols en fonction de la teneur en flavonoïdes.

III.2. Évaluation de l'activité antioxydante

Les mesures des densités optiques en présence de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis d'évaluer l'activité antioxydante de nos différents échantillons.

Les capacités antioxydantes obtenues par les deux tests ABTS et DPPH sont exprimées en EC₅₀. Le paramètre EC₅₀ représente la concentration d'antioxydant nécessaire pour faire baisser de 50% la quantité des radicaux libres initialement présente. On peut aussi représenter le pouvoir antiradicalaire de nos extraits en utilisant un autre paramètre qui est le TAC.

Le TAC (Total Antioxidant Capacity) représente l'inverse de l'EC₅₀ : 1/EC₅₀.

Le tableau suivant (**Tableau 4**) résume les différents résultats obtenus.

Tableau 4 : Valeurs de l' EC₅₀ et du TAC des différents extraits dans le test DPPH.

Pollen	Extrait	DPPH		ABTS	
		EC ₅₀ (mg/l)	TAC(l/g)	EC ₅₀ (mg/l)	TAC(l/g)
	Ebr	1626,3 ± 15,8	0,6149 ± 0,0059	239,17 ± 31,59	4,2553 ± 0,5621
<i>Orange</i>	Acétone	246,70 ± 1,76	4,0536 ± 0,0290	36,699 ± 0,1077	27,248 ± 0,0801
	Ebr	816,25 ± 7,9369	1,2252 ± 0,0119	172,69 ± 1,3962	5,7910 ± 0,0470
<i>Rouge</i>	Acétone	653,55 ± 0,7380	1,5301 ± 0,0017	184,02 ± 0,3715	5,4340 ± 0,0109
	Ebr	495,06 ± 1,2889	2,0199 ± 0,0052	117,58 ± 0,9733	8,5053 ± 0,0704
<i>Vert</i>	Acétone	235,72 ± 1,1873	4,2423 ± 0,0213	36,023 ± 0,0989	27,760 ± 0,0764
	VC	16,471 ± 0,0172	60,710 ± 0,0636	3,9393 ± 0,0282	253,86 ± 1,8307
<i>Standard</i>	Trolox	15,173 ± 0,2570	65,924 ± 1,1167	3,9471 ± 0,0035	253,34 ± 0,2255
<i>s</i>	BHA	15,228 ± 0,1395	65,673 ± 0,6016	1,1089 ± 0,0018	901,79 ± 1,5275

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± Ecart type.

Le paramètre EC₅₀ a été présenté récemment pour l'interprétation des résultats de l'activité antioxydante (autrement appelé la valeur IC₅₀). Ceci est défini comme la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical libre. Ce paramètre a été présenté par Brand-Williams et ses collaborateurs (1995). Il a été employé plus tard par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats :

(Matsuo, T. et *al.*, 2007; Ren,H.et *al.*, 2007; Tesmol, G. et *al.*, 2007; Jian, T. et *al.*, 2007)L'inconvénient de ce paramètre est plus que l'activité antioxydante est élevée, mais la valeur d'EC₅₀ est petite. De ce fait, et pour des raisons de simplicité, nous avons introduit le paramètre TAC qui représente la capacité antioxydante totale de l'extrait calculé à partir des valeurs d'EC₅₀. C'est-à-dire, plus les valeurs du TAC est grandes plus le pouvoir anti radicalaire des extraits est important. A partir des résultats obtenus de ce screening, on peut remarquer que le pouvoir anti radicalaire des différents échantillons varie considérablement avec des valeurs de TAC allant de 0,6149 à 4,2423 l .g⁻¹ et de 4,2553 à 27,760 l .g⁻¹ pour les tests DPPH et ABTS respectivement. Il est à noter aussi que ces deux tests sont en bonne corrélation. En effet, l'extrait A. vert qui a donné dans le test DPPH la meilleure activité d'antioxydante, a présenté également la meilleure activité antioxydante dans le test ABTS dont les valeurs d'EC₅₀ sont respectivement : 235,72 et 36,023 mg.l⁻¹. La valeur de l'activité antioxydante la plus faible a été observée pour l'extrait M. orange avec une valeur de TAC de 0,6149 et de 4,2553 l .g⁻¹ pour le tests DPPH et ABTS respectivement.

L'approche la plus simple dans l'interprétation des données, est de tracer une courbe présentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'antioxydant (standard et échantillon). Cette approche nous a permis de conclure que l'activité antioxydante de nos échantillons est concentration dépendante (**Figure14, 15, 16, 17, 18, et 19**).

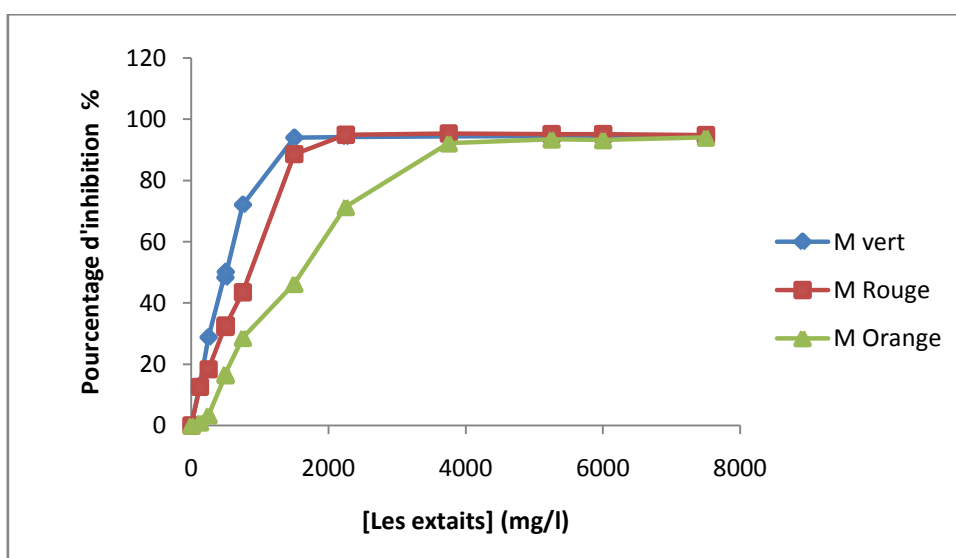


Figure14 :Variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits hydrométhanoliques(Ebr) dans le test DPPH.

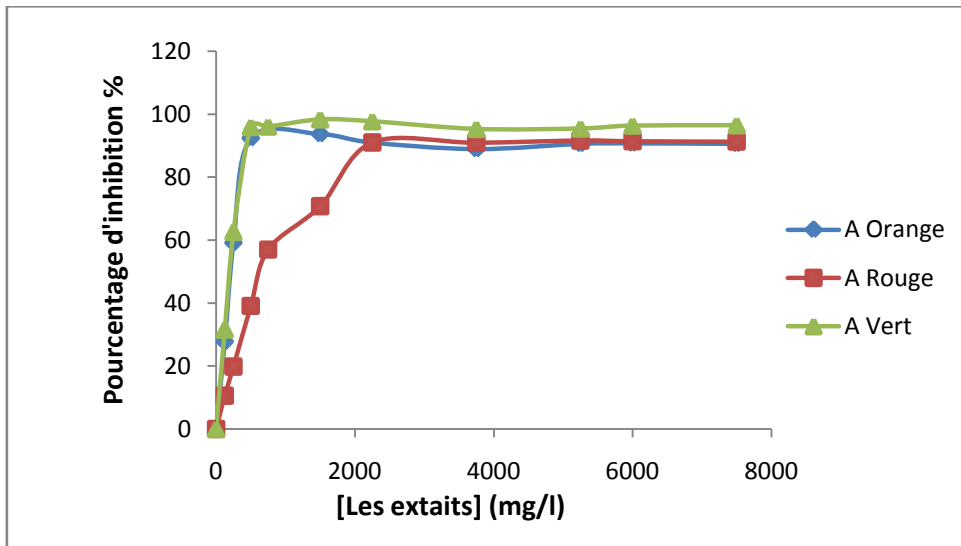


Figure15 : Variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits acétoniques dans le test DPPH.

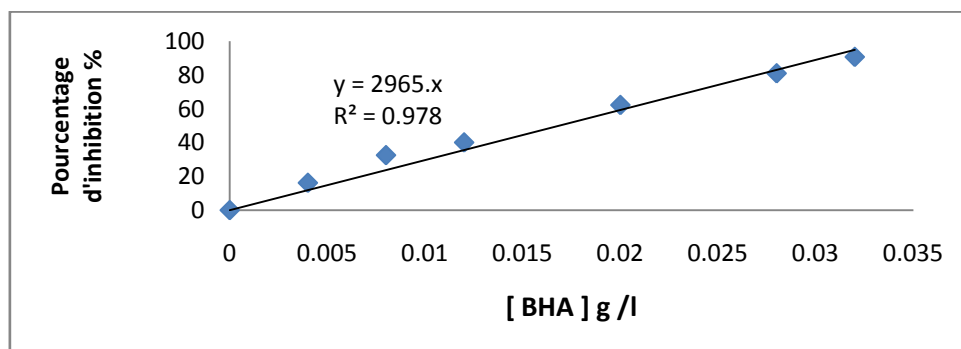
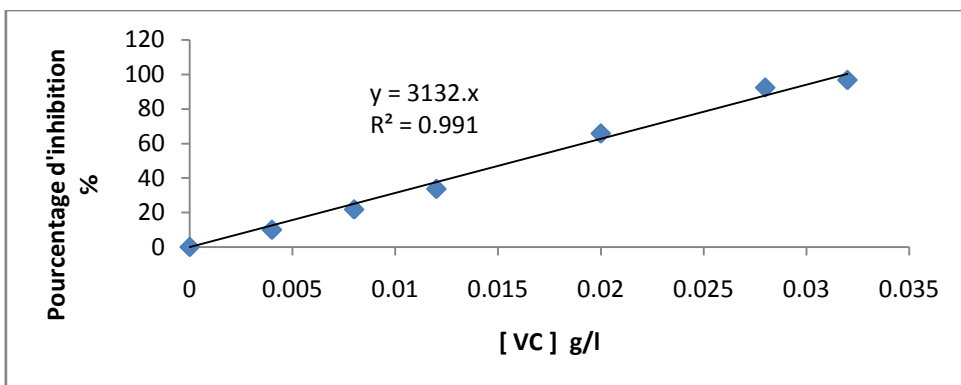
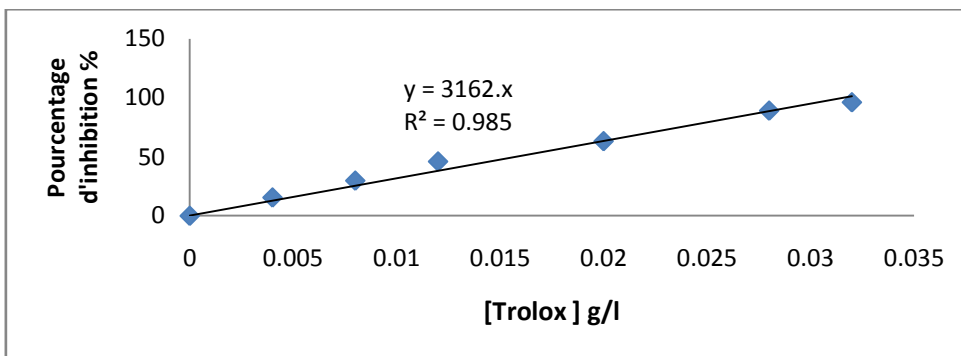


Figure16 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des antioxydants standards dans le test DPPH.

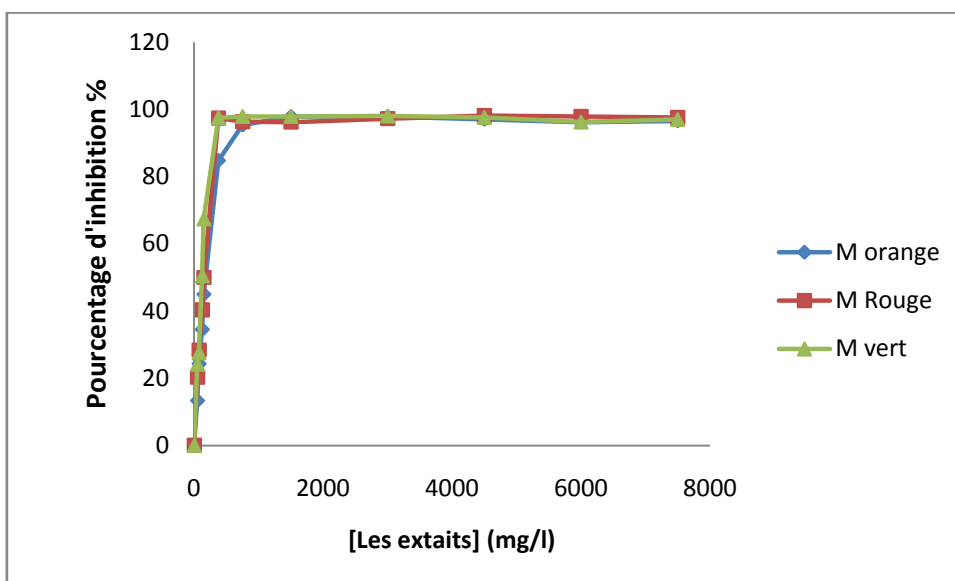


Figure17 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits hydrométhanoliques dans le test ABTS.

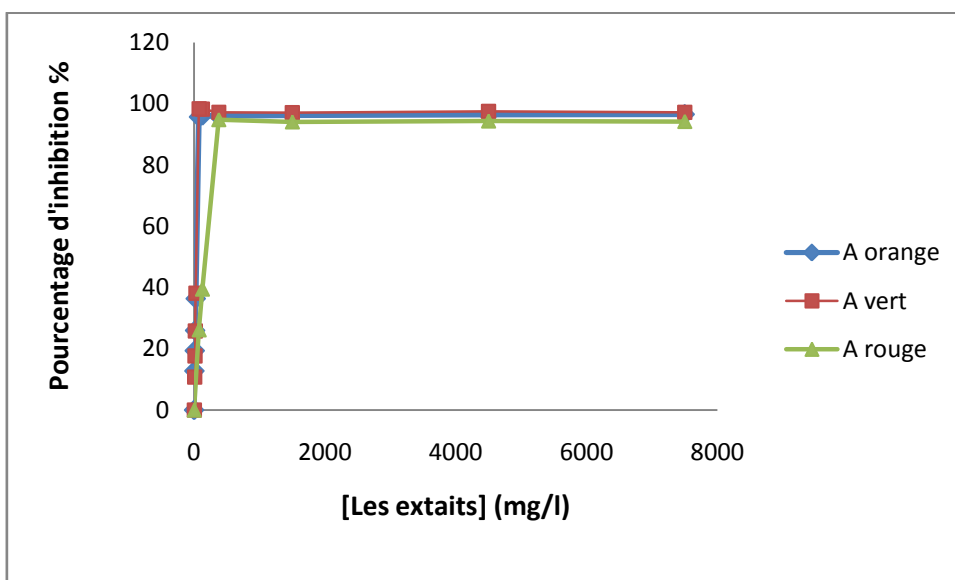


Figure18 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits acétoniques dans le test ABTS.

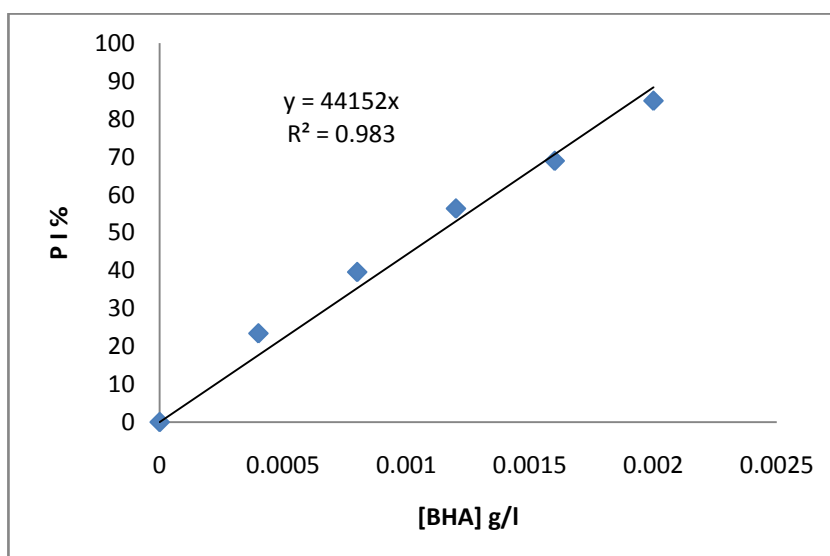
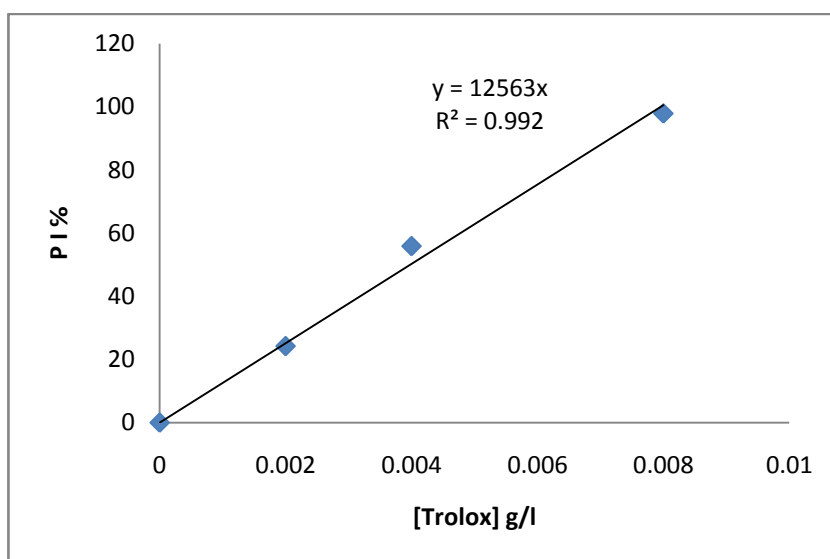
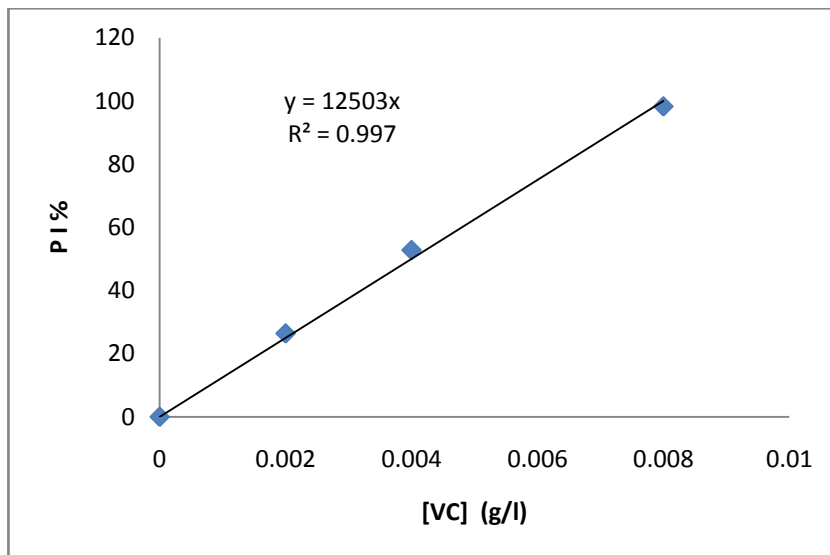


Figure 19 : Courbes représentant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des antioxydants standards dans le test ABTS.

IV. CONCLUSION GENERALE

Trois échantillons de pollen de couleurs différentes (rouge, vert et orange) récoltés dans la région de Laghouat ont fait l'objet de notre travail. Nous procédons en premier lieu à une détermination grossière de la teneur en composés phénoliques de six extraits obtenus par macération dans deux solvants de polarités différentes : méthanol-eau et acétone.

Les résultats de cette partie ont révélé que l'extrait du pollen vert de l'acétone est le plus riche en composés phénoliques et flavonoïdiques. Il a été constaté aussi que l'acétone est meilleure que le méthanol-eau pour extraire les composés phénoliques du pollen.

Nous nous sommes intéressés par la suite à l'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits. Pour cela, deux tests complémentaires ont été utilisés à savoir le test DPPH et le test ABTS. Par ailleurs, et dans un but de comparaison, nous avons de même évalué l'activité antioxydante de trois antioxydants standards : Vitamine C, Trolox et BHA. Le même constat établi pour l'acétone dans le dosage des composés phénoliques est valable aussi dans l'évaluation de l'activité antioxydante. Pour les deux tests, l'acétone donne les extraits les plus actifs parmi lesquels l'extrait du pollen vert détient toujours la première place.

Les résultats de notre étude nous a permis de conclure que la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante du pollen sont tributaires de la couleur de ce dernier et de la nature du solvant.

Ainsi, des études complémentaires restent nécessaires pour approfondir les résultats obtenus et déterminer les molécules actives responsables de cette activité.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ Alhamidi, N. A. (2017). Etude du pollen de quelques espèces allergisantes de la région de Tlemcen.
- ❖ Boizot N., and Charpentier .J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. Le cahier des techniques de l'Inra. pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- ❖ Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. et Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.
- ❖ Campos et al. (2008), Pollen composition and standardisation of analytical methods
<https://www.tandfonline.com/toc/tjar20/current>.
- ❖ Chen, J. H., et Ho, C. T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acids and its related hydrocinnamic acid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2374–2378.
- ❖ Djemai, S. Z. (2008). Étude de l'activité biologique des extraits du fruit de Zizyphus lotus, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhdar –Batna).p12.
- ❖ Gardes- Albert (2003).Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?Par Monique Gardès-Albert , Dominique Bonnefont-Rousselot , Zohreh Abedinzadeh , Daniel Jore
- ❖ Hansraj, D., Ou, B. et Prior, R.L. (2006). The chemistry behind antioxidant capacity assay. Journal of Agricultural and Food chemistry 1841-1856, p 53. Re, R., pellegrini, N., protegrente, A., Pannala, A., Yang, M. et Rice-Evans. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorization assay. Free radical bio Med c 26:1231-1237.
- ❖ Jean Louveaux (1958). Les relations abeilles-pollens, Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques
- ❖ Lebensm.-Wiss. (1997). Antioxidant activities of caffeic acids and its related hydrocinnamic acidcompounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2374–2378.

- ❖ Re, R., pellegrini, N., protegrente, A., Pannala, A., Yang, M. et Rice-Evans. (1999).
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.
Free radical bio Med c 26:1231-1237.

- ❖ Rokia, S.(2006). Le Rôle Des Plantes Médicinales En Médecine Traditionnelle,
Développement, Environnement et Santé 10^{ème} école d'été de l'IEPF et du SIFEE

- ❖ .Sarni-Manchado,P.et.Cheynier, V.(2006). Les polyphénols en agroalimentaire, sciences
et techniques agroalimentaires.

- ❖ Singleton et al. (1999). TOTAL PHENOLIC CONTENT, FLAVONOID
CONCENTRATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF Marrubium peregrinum L.
EXTRACTS Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of
Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Republic of Serbia

- ❖ Zhishen J, Mengcheng T and Jianming W . 1999 The determination of flavonoid
contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food
Chemistry

ملخص:

إن الأبحاث العلمية الحديثة لعلم النباتات الطبية تهتم أساساً بدراسة النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات النباتات. من خلال الدراسة التجريبية حاولنا تقدير النشاطية المضادة للأكسدة لثلاثة ألوان مختلفة من حبوب الطلع كل لون مستخلص في مذيبين (ميثانول 80%، أسيتون). أثبتت النتائج التحليلية أنها تحتوي بين 12,7 إلى 44,75 و 18,95 إلى 107,33 ميليغرام مكافئ حمض الغاليك/ غرام من المادة الخام لمستخلصات الميثانول 80% و الأسيتون على الترتيب، أما عن مركبات الفلافونويد فإنها تحتوي بي ن 43 إلى 102,8 و 280,33 إلى 591,2 ميليغرام مكافئ الكاتشين/ غرام من المادة الخام لمستخلصات الميثانول 80% والأسيتون على الترتيب.

وأثبتت النتائج أن مستخلص الأسيتون لحبوب الطلع الأخضر و البرتقالي يمتلكان قدرة عالية على مقاومة الجذور الحرة بمقدار 0,0366 و 0,0366 غرام/في اللتر على الترتيب بالنسبة ل لجذور الحرة (ABTS), كما سجلنا قدرة مقاومة الجذور الحرة (DPPH) في نفس المستخلص لحبوب الطلع الأخضر و البرتقالي بمقدار 0,23 و 0,24 غرام/في اللتر على الترتيب. من خلال النتائج التجريبية استنتجنا أن مستخلص الأسيتون لحبوب الطلع الخضراء و البرتقالية يمتلكان قدرة عالية على مقاومة الجذور الحرة وكمية معتبرة من المركبات الفينولية.

الكلمات المفتاحية: حبوب الطلع، الجزيئات الطبيعية، القدرة المضادة للأكسدة

Résumé

La recherche scientifique récente en botanique médicinale porte principalement sur l'étude de l'activité antioxydant des extraits des plantes. Par la présente étude expérimentale, nous avons essayé d'estimer l'activité antioxydant de trois couleurs différentes de pollen et chaque couleur est extraite dans deux solvants (méthanol 80%, acétone). Les résultats ont révélé qu'ils contiennent entre 12,7 à 44,75 et 18,95 à 107,33 mg équivalent d'acide gallique/gramme de matière première pour les extraits de méthanol 80% et d'acétone respectivement, pour les flavonoïdes qu'ils contiennent entre 43 à 102,8 et 280,33 à 591,2 milligrammes équivalent catéchine / gramme de matière première pour des extraits de méthanol 80% et d'acétone respectivement.

Les résultats ont prouvé que l'extrait d'acétone pour les haricots verts et le pollen orange possèdent une résistance des radicaux libres à haute capacité par 0,0366 et 0,0366 g / litre, respectivement, pour les radicaux libres (ABTS), que nous avons enregistré la capacité de résistance aux radicaux libres (DPPH) dans le même résumé. Pour le pollen vert et orange de 0.23 et 0.24 g/l respectivement.

A partir du résultats expérimentaux, nous avons conclu que l'extrait d'acétone pour le pollen vert et orange a une forte résistance aux radicaux libres et une quantité importante de composés phénoliques.

Mots-clés: pollen, molécules naturelles, capacité antioxydante

Abstract

Recent scientific research of medicinal botany is mainly concerned with the study of antioxidant activity of plant extracts. Through the experimental study we tried to estimate the antioxidant activity of three different colors of pollen each color extracted in two solvent (methanol 80%, acetone). The results showed that between 12.7 to 44.75 and 18.95 to 107.33 milligrams of galic acid / g of raw material for extracts of methanol 80% and acetone respectively, flavonoids contained between 43 and 102.8 and 280,33 to 591.2 milligrams of equal catechin / gram of raw material for extracts of methanol 80% and acetone respectively.

The results showed that acetone extract for green and orange pollen had a high resistance to free radicals by 0,0366 and 0,0366 g / l respectively for free roots (ABTS). We also recorded the ability of free radical resistance (DPPH) in the same extract. For green and orange pollen by 0.23 and 0.24 g / l respectively.

Through the experimental results, we concluded that acetone extract for green and orange pollen has a high resistance to free radicals and a significant amount of phenolic compounds.

Keywords: pollen, natural molecules, antioxidant capacity