

Résumé

LA CARACTÉRISATION DU POLLEN RÉCOLTÉ PAR DES ABEILLES AFIN D'OBTENIR DES SUPPLÉMENTS ALIMENTAIRES

Coordinateur scientifique: Prof.univ.dr. POPA Ovidiu

Doctorant: MARIA I. Antoaneta-Roxana (SPULBER)

Mots clés : pollen récolté par des abeilles, origine botanique, composition chimique, composés biologiquement actifs, nanoparticules magnétiques.

La thèse de doctorat intitulée « **La caractérisation du pollen récolté par des abeilles afin d'obtenir des suppléments alimentaires** », présente l'analyse des différentes sortes de pollen sous aspect structuré, physico-chimique et biologique. De plus, elle met en évidence le potentiel nutritionnel et la capacité du pollen à former des api-nano systèmes avec des meilleures caractéristiques biologiques.

La thèse a été structurée en deux parties principales : la première partie *L'étude bibliographique* et la deuxième partie *Recherches propres*, suivies par la présentation de la bibliographie, la liste des articles publiés lors de l'élaboration de la thèse de doctorat.

La partie d'étude bibliographique est composée de deux chapitres, un total de 37 pages qui représentent 21 % du volume de la thèse.

Le premier chapitre (**La caractérisation morphologique et physico-chimique du pollen récolté par des abeilles**) présente les caractéristiques morphologiques du pollen, met en évidence une série d'aspects macroscopiques, microscopiques et une microstructure ainsi que la composition chimique du pollen récolté par des abeilles en traitant individuellement les principales catégories des composés identifiés dans le pollen.

Le deuxième chapitre (**Méthodes d'extraction utilisées pour la séparation et l'identification des composés biologiques actifs avec valeur nutritive et apithérapeutique**) est dédié aux méthodes et aux conditions d'extraction utilisées pour la séparation de certains composés d'intérêt nutritionnel qui met en valeur la qualité nutritionnelle et apithérapeutique du pollen.

La deuxième partie nommée *Recherches propres* présentée en 143 pages, qui représente 79 % de cette thèse, est structurée en 5 sous chapitres dans les quels sont décrites le but et les objectifs des recherches, le matériel végétal utilisé, le cadre naturel, géographique et institutionnel dans lesquels les recherches se sont déroulées, les résultats expérimentaux obtenus et leur interprétation, les conclusions générales et les recommandations.

Les recherches ont été effectuées pour établir les caractéristiques spécifiques de chaque type de pollen, l'évaluation de l'activité biologique, l'obtention et la caractérisation des composés nanostructurés avec un potentiel biomédical.

Les objectifs de cette thèse sont les suivants :

- ✓ La caractérisation morphologique au niveau macroscopique et microscopique des types de pollen ;
- ✓ La caractérisation des types de pollen en identifiant et en quantifiant les composés principaux chimiques suite à l'application de méthodes analytiques ;
- ✓ L'élaboration et l'application d'une méthode chemométrique pour différencier les types de pollen ;
- ✓ L'évaluation des principales activités biologiques des échantillons de pollen *in vitro* ;
- ✓ L'utilisation d'extraits de pollen pour obtenir des composés nanostructurés ;
- ✓ La caractérisation api-nano complexe formée et l'évaluation du potentiel biomédical du complexe nanostructuré.

Chaque chapitre de la deuxième partie commence avec une courte introduction, une description des matériaux et méthodes utilisées, les résultats et les discussions et se termine par une section consacrée aux conclusions de ce chapitre.

Dans le troisième chapitre sont présentés les étapes de formation des échantillons de pollen utilisés pour la caractérisation macroscopique, sensorielle et l'identification de l'origine botanique du pollen.

Dans le quatrième chapitre sont détaillées les étapes de caractérisation physico-chimique des échantillons de pollen récoltés par des abeilles et qui est le chapitre expérimental le plus volumineux. Nous avons trouvé les paramètres suivants : l'humidité par la méthode thermogravimétrique, le contenu de protéines totales, le profil d'acides aminés libres par chromatographies en phase liquide couplé à un détecteur de masse, des substances minérales par calcination et par spectrométrie d'émission optique à plasma couplé inductif (ICP-OES), sucre total, acidité libre, lipides totaux, acides gras par chromatographie en phase gazeuse, le contenu total de polyphénols, le profil des composés phénoliques par techniques d'électrophorèse capillaire et application à la spectroscopie FTIR ATR. Les spectres IR acquis ont constitué la base des données pour la différenciation et la classification des échantillons de pollen récoltés par des abeilles par des méthodes de statistique multidimensionnelle : L'analyse du composant principal (ACP), L'analyse discriminée linéaire (ADL) et la méthode de la régression type PLS. Les données statistiques ont été traitées avec l'aide du programme Matlab (Mathworks, Massachusetts USA version R2015). APC et ADL ont été utilisées pour classer le pollen en fonction de l'origine botanique et/ou les spectres IR et les principales caractéristiques physico-chimiques du pollen.

Les spectres FTIR – ATR à 47 échantillons de pollen ont été mis sous l'analyse chemométrique en leur donnant la possibilité de se grouper selon l'origine botanique. La stratégie expérimentale appliquée par nous même est composée de l'analyse spectrale FTIR-ATR et les plus performantes méthodes analytiques, une première nationale concernant la détermination de ce groupe de travail. Dans ce même chapitre, les conditions pédoclimatiques de toutes les zones d'emplacement des ruchers où des quantités moyennes de précipitations et des températures mensuelles enregistrées ont été mentionnées.

Dans le cinquième chapitre ont été présentés les résultats de l'évaluation des principales activités biologique du pollen récolté par des abeilles. Afin de déterminer l'activité antioxydante des radicaux DPPH et ABTS ainsi que l'activité antimicrobienne de certaines souches d'intérêt clinique, mais également de certaines souches microbiennes pathogènes chez certaines espèces végétales.

Le sixième chapitre présente l'utilisation d'extrait de pollen afin d'obtenir des composés nanostructurés organique-inorganique, leur caractérisation et la démonstration de la stabilité du nano fluide. Les méthodes d'investigation des systèmes nanostructurés ont été représentées par la diffusion de la lumière, les mesures du potentiel zêta et la microscopie électronique. Egalement dans ce chapitre, l'évaluation de la combinaison synergique des extraits de pollen avec des nanoparticules magnétiques de Fe₃O₄-PABA est évaluée dans le but d'identifier un complexe nano-hybride doté des propriétés antibactériennes supérieures.

Le septième chapitre fini par la section des conclusions générales qui émergent de la caractérisation structurelle, chimique et d'utilisation du pollen.

Résultats obtenus

Chapitre III – La caractérisation du pollen selon les aspects morphologiques et sensoriels

Chaque échantillon de pollen monochrome caractérisé macroscopique a été classifié selon l'analyse palynologique comme éprouve mono fluore (espèce botanique prédominante en pourcentage >90%), après avoir identifié 50% des échantillons analysés, biflorale (la présence de deux espèces botaniques) – 30% des échantillons, ou heteroflorale (identification de trois ou plusieurs espèces florales dans l'échantillon de pollen) – 20% des échantillons inclus dans l'étude.

La détermination de l'origine botanique de tous les échantillons formés et réalisés par analyse microscopique a permis d'identifier 20 espèces de plantes appartenant à 14 familles botaniques, comme suite : *Brassicaceae* (*Brassica sp.*), *Asteraceae* (*Carduus sp.*, *Cirsium sp.*, *Helianthus annuus*, *Solidago virgaurea*, *Matricaria sp.* și *Taraxacum officinale*), *Fagaceae* (*Aesculus sp.*), *Plantaginaceae* (*Plantago lanceolata*), *Malvaceae* (*Tilia sp.*), *Rosaceae* (*Prunus L sp.* și *Crataegus monogyna*), *Poaceae* (*Zea mays*), *Caprifoliaceae* (*Symphoricarpos rivularis*),

Vitaceae (*Vitis sp.*), *Fabaceae* (*Trifolium repens*), *Papaveraceae* (*Papaver sp.*), *Umbeliferae* (*Apiaceae type*), *Lamiaceae* (*Lavandula sp.*), *Anacardiaceae* (*Anacardium sp.*).

L'analyse morphologique des types de pollen étudiés a permis d'identifier les limites situés aux deux pôles des dimensions microscopiques à laquelle l'axe polaire a enregistré des valeurs de 98.2µm et 24.8µm, et le diamètre équatoriale 97.9µm et 25.4µm ; toutes ces valeurs se retrouvent également aux échantillons de pollen qui proviennent de *Zea mays* (la valeur maximale) et *Brassica sp.* (la valeur minimale).

De tous les paramètres morphologiques investigués avec le microscope optique, la sculpture de l'exina montre la plupart des différences dans le cadre de types de pollen étudié. Trois de tout cela représente la structure de l'exina type equinate, tous cela appartenant à la famille *Asteraceae*. La sculpture à rayures ou perforée a été mise en évidence dans le cas des représentants de la famille *Rosaceae* (*Crataegus monogyna* et *Prunus sp.*), mais la sculpture de la gaine a été retrouvé dans le pollen de type *Plantago lanceolata* et *Papaver sp.* La structure fovéolée et réticulée de l'exine a été identifiée dans un type de pollen analysé : *Tilia sp.* et *Brassica sp.*

Chapitre IV – La caractérisation physico-chimique des échantillons de pollen monoflor

Les résultats obtenus suite à la détermination du contenu d'eau pour les échantillons de pollen démontrent que ce paramètre est dépendent des certains indicateurs météorologiques pendant la période de récolte du pollen, comme la température et les précipitations. Les plus grandes valeurs du contenu total de protéine ont été enregistrées par les espèces florales de la famille *Rosaceae* (*Prunus sp.* et *Crataegus monogyna*), et suite à l'analyse générales des statistiques, nous avons observé que les pollens avec une valeur au delà de 20% de protéine brute proviennent particulièrement des espèces végétales qui fleurissent le printemps. Dans la composition de tous les échantillons de pollen récolté des abeilles ont été identifiés 8 aminoacides essentiels (isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine) et 14 nonessentiels (histidine, arginine, acide aspartique, alanine, acide glutamique, glutamine, glycine, proline, sérine, tyrosine, ornithine, asparagine, 4-hydroxyproline, sarcosine). Le pollen de type *Helianthus annuus* a indiqué la plus élevée valeur de concentration en aminoacides essentiels en enregistrant 27.5%, et au-delà de 90 de pourcentage ont indiqué chaque type de pollen *Crataegus monogyna* et *Prunus sp.* pour les aminoacides non essentiels rapporté à la totalité des aminoacides déterminés.

Tous les échantillons de pollens étudiés dans cette thèse ont enregistré les plus grandes valeurs pour la concentration de potassium, le contenu d'éléments minéraux peut être mis dans la série suivante : K>Ca>Mg>Fe>Zn>Mn>Cu>B.

Dans les cas des acides gras, on peut également parler de spécificité parmi les espèces de pollen comme l'absence d'acides gras provenant d'échantillons différents dans des pourcentages variables : l'acide laurique est absent dans environ 60% des échantillons, l'acide margarique dans

plus de 50% des échantillons, l'acide lignocérique est absent dans plus de 44% des échantillons, tandis que les acides myristique et béhénique n'ont pas été identifiés dans plus de 20% et 10% des cas analysés. Du point de vue de la classification du contenu en flavones et flavonols de la famille botanique, un contenu plus élevé de ces composés a été trouvé chez les espèces appartenant à la famille *Asteraceae*, suivies des membres de la famille *Rosaceae* ; le pollen qui provient des espèces *Taraxacum officinalis* et *Helianthus annuus* a indiqué des valeurs élevées du contenu des flavones et flavonols et du contenu total des polyphénols, indiquant un contenu important en composés biologiquement actifs dans les échantillons de pollen.

Les résultats du criblage des composés phénoliques ont indiqué que 35% des composés analysés étaient identifiés comme des composants uniques du profil phénolique, contribuant à la mise en forme des marqueurs biologiques dans les types de pollen.

Pour la différenciation botanique et géographique, on a utilisé tout le domaine spectral accessible par FTIR-ATR (4000-400 cm^{-1}). Les statistiques obtenus ont été utilisés pour l'identification d'un set de huit propriétés caractéristiques par l'application des techniques PCA-LDA-PLS. Après le traitement des dix premiers composants principaux, qui représentaient 99.8% de la variabilité expérimentale, huit groupes ont été séparés dans l'espace LDA1-LDA2. Les résultats obtenus recommandent la méthode de la spectrométrie FTIR-ATR comme une méthode rapide d'identification de la source botanique dans le cas d'échantillons de pollen de source inconnue, ainsi que pour l'estimation des principales propriétés physico-chimiques.

Capitolul V – Les principales activités biologiques du pollen récolté par des abeilles

Les espèces *Prunus sp.* et *Brassica sp.* ont enregistré la meilleure activité antioxydante exprimée à la fois par la capacité de piégeage du radical ABTS, ainsi que par la méthode DPPH avec *Papaversp.* et *Crataegus monogyna*.

L'activité antimicrobienne des extraits à l'éthanol obtenus du pollen monofloral a été testé contre les bactéries gram-positifs, gram-négatifs et les champignons (à la fois des souches d'intérêt médical ainsi que des microorganismes pathogènes pour certaines espèces végétales).

Les souches le plus sensibles de celles d'intérêt clinique sont les bactéries gram positifs et les champignons.

L'étude réalisé a montré l'efficacité de tous les extraits de pollen à l'éthanol testés en tant qu'inhibiteurs de la souche *Xanthomonascampestris* ICCF 274. L'extrait de pollen *Zea mays* a manifesté une faible activité inhibitrice sur la souche *Erwinia carotovora* ICCF 138 par rapport aux autres échantillons testés. L'extraits de pollen n'ont pas eu un effet antifongique sur la souche *Aspergillus niger* ICCF 92.

Chapitre VI – L'utilisation d'extrait de pollen pour obtenir certains composés nanostructurés inorgano-organiques.

Des composés hybrides nanostructurés organique-inorganique ont été obtenus par la décomposition des composés naturels d'extrait de pollen sur le support complexe de Fe_3O_4 – PABA. Les études de caractérisation ont confirmé la présence de nanostructures et, dans certains cas, ont indiqué les paramètres établissant une prédisposition minimale à l'agrégation.

La confirmation des dimensions des nanostructures synthétisées a été réalisée par microscopie électronique et leur stabilité par le potentiel Zeta. Les nanostructures hybrides sur lesquelles le greffage des api composés d'extrait de pollen a été appliqué, ont également confirmé leur fixation en augmentant le diamètre des api nanosystèmes obtenus.

L'api nanosystème de pollen récolté par des abeilles a montré une inhibition des microorganismes Gram positifs et Gram négatifs. Parmi les bactéries Gram positives, la souche *S. aureus* s'est révélée être la plus sensible à l'action des api nanosystèmes fonctionnalisés avec les extraits de pollen suivants : *Brassica sp.*, *Taraxacum officinallis*, *Plantago lanceolata* et *Zea mays*, pendant que l'extrait de pollen *Brassica sp.* appliqué aux nanoparticules magnétiques ont eu le meilleur effet inhibiteur sur la souche Gram négative, *E.coli*. L'activité antifongique du complexe hybride nanostructuré a montré une bonne inhibition de 50% des souches testées et parmi celles là, *C. albicans* s'est révélée plus sensible à l'action du api nanosystème à la base d'extrait de pollen et PABA.

Eléments d'originalité

- ✓ La caractérisation microscopique et physico-chimique des variétés (types) de pollen qui provient des plantes indigènes dans des conditions climatiques des années 2014 – 2015 ;
- ✓ L'élaboration et la vérification d'une méthode chémométrique pour l'identification d'une source botanique de pollen et l'évaluation des caractéristiques physico-chimiques du pollen récolté par des abeilles ;
- ✓ L'évaluation de l'activité biologique in vitro (l'activité antimicrobienne) de l'extrait de pollen sur certaines souches pathogènes pour certaines espèces végétales ;
- ✓ L'obtention des composés nanostructurés hybrides inorgano-organiques en décomposant les composés naturels d'extrait de pollen sur le support complexe de Fe_3O_4 -PABA ;
- ✓ Le test de l'activité antimicrobienne des api-nanosystèmes à base du pollen.