جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH DE FES
كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES

N° d'Ordre : **67/2021**

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologie

Discipline : Biologie

Spécialité : Substances Naturelles, Physiologie, Pharmacologie, Santé Environnementale, Modélisation, et Qualité de vie

Laboratoire : Substances Naturelles, Pharmacologie, environnement, Modélisation, Santé et Qualité de vie

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

ASMAE EL GHOUIZI

Le Pollen d'abeilles Frais Marocain : Caractérisation Physicochimique, Identification des Biomolécules et Applications Pharmacologiques chez le Rat

Soutenue le 29 / 12 / 2021 devant le jury composé de :

***Pr.* BOUSHABA Abdallah**	***Faculté des Sciences Dhar El Mehraz - Fès***	***Président***
***Pr.* BENAJI Brahim**	***ENSAM, Université Mohammed V - Rabat***	***Rapporteur***
***Pr.* BOUYAZZA Lahboub**	***Faculté des Sciences et Techniques, Settat***	***Rapporteur***
***Pr.* LAMCHOURI Fatima**	***Faculté Polydisiplinaire - Taza***	***Rapporteur***
***Pr.* BENZIANE Zineb**	***Faculté des Sciences Dhar El Mehraz - Fès***	***Examinateur***
***Pr.* EL ARABI Ilham**	***Faculté des Sciences Dhar El Mehraz - Fès***	**Examinateur**
***Mr.* MEZZOUR Mohammed**	***Direction provinciale de l'agriculture- Séfrou***	**Invité**
Pr. LYOUSSI Badiaa	***Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès***	**Directeur de thèse**

Année universitaire : 2021-2022

Dédicace

Je dédie ce travail à ma famille, pour l'amour qu'elle m'a toujours donné, ses encouragements et toute l'aide qu'elle m'a apportée durant mes études.

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices que mes parents ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

Trouvez ici, chère mère et cher père, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.

Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie vos vieux jours.

Je dédie ce travail à mes sœurs, frères et beaux-frères pour tous les sacrifices et le soutien qu'ils n'ont cessé de m'apporter tout au long de mes années d'études. Que Dieu vous apporte le bonheur, et vous offre un avenir plein de succès.

Nulle dédicace ne pourrait exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude, tous les encouragements et soutien consenti à mon égard.

A tous les scientifiques et chercheurs qui combattent pour le développement de notre pays.

Remerciements

Au terme de ces années de thèse, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

Mes remerciements sont destinés en premier lieu à ma Directrice de thèse, madame LYOUSSI Badiaa, Je lui suis reconnaissante pour ses précieux conseils et son engagement tout au long de ce travail. Ses encouragements m'ont permis de surmonter les moments difficiles. Je lui exprime toute ma gratitude pour sa confiance, sa disponibilité et ses réponses à mes nombreuses sollicitations. C'est un privilège qu'elle m'a accordé en étant la directrice de cette Recherche.

Je remercie également Monsieur le président du jury Professeur BOUSHABA Abdallah de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury et d'examiner mon rapport de thèse.

Ma gratitude s'adresse également à professeur LAMCHOURI Fatima, professeur BENAJI Brahim et professeur BOUYAZZA Lahboub pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse, pour l'attention et le temps apportés à la lecture de ce travail.

Je remercie chaleureusement professeur BENZIANE Zineb Et professeur EL ARABI Ilham de m'avoir également fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail et pour leurs remarques précises en sens d'amélioration de ce travail. Mon entière et profonde gratitude s'adresse à monsieur MEZZOUR Mohammed, pour avoir accepté notre invitation, ses remarques et observations me seront d'une grande aide au niveau professionnel.

Plusieurs contributions ont permis d'enrichir cette recherche. Je voudrais, remercier professeur Miguel Vilas-Boas et madame Soraia I. Falcão ; « Institut polytechnique de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Bragança, Portugal », Professeur Nouri AL-WAILI « New York Medical Care for Nephrology, Queens, New York, USA » et monsieur Pedro Ferreira-Santos « CEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, Portugal » et leurs équipes pour leur précieuses contributions.

Je tiens à remercier Professeur HAMAS Nawal et Docteur KETTANI TAYEB pour la réalisation d'une part des analyses de ces études.

Il m'est impossible d'oublier mes amis et collègues avec qui j'ai partagé une agréable expérience. Merci à Maryam BAKOUR, Salma ELFETRI, Hassan LAAROUSSI, Driss OUSSAID, Nawal EL-MENYIY, Samah ELKAH et Omar ELHARROUSS. Merci pour les bons moments que j'ai partagés avec vous et pour

l'ambiance conviviale et dynamique que vous m'avez offert. Merci d'être là pour moi quand je perdais espoir.

Un très spécial et chaleureux remerciement s'adresse à monsieur BOURKI Zakaria pour son aide précieuse et ses encouragements inépuisables qui m'ont accompagné tout au long de mes années de thèse.

Un Merci également à ABOULGHAZI Abderrazak, Smail AZZA, Youssef El AMINE, Tarik ELARAJ Soukaina EL GUENDOUZ, et Ferdaouss EL HASSANI pour leur soutien et pour le partage de leur savoir.

Mes vifs et chaleureux remerciements vont aux professeurs et aux thésards du laboratoire SNAMOPEQ pour leur soutien le long de ces années de travail.
Un très grand merci aux apiculteurs et professionnels de l'apiculture pour leur contribution et la fourniture de matière première et la transmission de leur savoir-faire.
Je remercie également tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de ce travail.

Il m'est agréable de m'acquitter d'une dette de reconnaissance auprès de toutes les personnes du département de biologie Dhar Mahraz pour leur soutien, dont l'intervention au cours de mes années d'études, a favorisé son aboutissement.
A titre plus personnel, je tiens à témoigner ma reconnaissance à mes parents, mes frères et mes sœurs, et tous membre de ma famille chacun par son nom, qui ont toujours cru en moi et qui m'ont soutenu dans ce projet de thèse et tout au long de mes longues années d'étude.

Résumé

L'objectif du présent travail s'inscrit dans le cadre d'une standardisation et d'une valorisation du pollen monofloral frais Marocain par des études de caractérisation physicochimique et explorations pharmacologiques expérimentales afin de promouvoir son utilisation en thérapeutique. Dans ce travail, huit échantillons de pollen frais monofloral ont été récoltés chez des apiculteurs professionnels Marocains. Une étude palynologique par microscopie électronique à balayage a été utilisée pour l'identification de leur origine botanique. Le taux de protéines, de cendres, d'éléments minéraux, le pH, et l'humidité ont été déterminés. Le contenu en composés phénoliques et l'activité anti oxydante de ces pollens ont été réalisés par différents tests tels que le dosage du contenu en phénols, contenu en flavones et flavonols, capacité antioxydante totale, test d'activité anti-DPPH, test d'activité anti ABTS, et le test pouvoir réducteur. Trois échantillons ont été choisis pour réaliser l'étude de l'effet protecteur du pollen frais contre hématotoxicité, hépatotoxicité et néphrotoxicité induite par le méthotrexate chez le rat. L'effet diurétique chez les rats normotensifs et l'effet hépatoprotecteur et néphroprotecteur contre les lésions rénales aigues induites par l'ingestion de l'éthylène glycol ont été explorés. Les résultats ont révélé que les pollens examinés sont riches en protéines, en éléments minéraux et en polyphénols et flavonoïdes. L'analyse physicochimique a indiqué que notre pollen est un pollen de bonne qualité. La détermination de la composition chimique de deux échantillons a révélé la présence d'un grand éventail de composées phénoliques tels que la quercétine, la rutine, l'acide rosmarinique, le kaempférol, les dérivés de la spermidine et le résveratrol. Cette composition est associée aux effets protecteurs puissants observés chez les modèles de rats expérimentaux. Ces résultats ont montré que le pollen d'abeilles frais Marocain est qualifié comme pollen de « bonne qualité » qui répond aux standards internationaux et qui est doté de nombreuses propriétés thérapeutiques. Par ailleurs, nos résultats sont une contribution à la valorisation et à la standardisation de ce produit de terroir Marocain et qui pave la voie devant d'autres recherches phytochimiques, pharmacologiques et cliniques.

Mots clés : Maroc, pollen d'abeilles , polyphénols, flavonoïdes quercétine, Kaempférol, résveratrol, effet hépatoprotecteur, néphroprotecteur, hématoprotecteur, diurétique.

Abstract

The work presented in this thesis aims to standardize and valuate the Moroccan fresh monofloral bee pollen via physicochemical characterization and pharmacological studies, in order to promote its use in therapy. Eight samples of fresh monofloral fresh bee pollen were collected from professional Moroccan beekeepers. A palynological study by scanning electron microscopy was used to identify their floral origin. The protein and mineral contents, ash, pH, and humidity was determined. The content of phenolic compounds and the antioxidant activity of these samples were carried out via various tests such as the determination of the content of phenols, flavones and flavonols, total antioxidant capacity, test of anti-DPPH and anti-ABTS activities, and the reducing power test. Three samples were chosen to study the protective effect of fresh bee pollen against haematological, hepatic and renal toxicity induced by methotrexate in rats. The diuretic effect in normotensive rats and the nephroprotective effect against kidney stones induced by ethylene glycol were explored. The results revealed that the examined pollens have a high content of proteins, minerals, polyphenols and flavonoids. The physicochemical analysis has indicated that our bee pollen is of a good quality. The determination of the chemical composition of two samples revealed the presence of a wide variety of phenolic compounds such as quercetin, rutin, rosmarinic acid, kaempférol, spermidine derivatives and resveratrol. This composition is associated with the strong protective effects observed in experimental rat models. The results of these studies have shown that Moroccan fresh bee pollen is of a good quality that meets international standards and it has many therapeutic properties. This is a contribution to the enhancement and standardization of this Moroccan local product and provide a fertile background for many further research topics for physicochemical and pharmacological studies.

Keywords: Morocco, bee pollen, polyphenols, quercetin flavonoids, Kaempférol, resveratrol, hepatoprotective effect, nephroprotective effect, hematoprotective effect, diuretic effect.

ملخص

يندرج هذا العمل في إطار تقييم وتثمين حبوب اللقاح المغربية الطازجة أحادية الزهرة وذلك عن طريق القيام بمجموعة من الدراسات التوصيفية الفيزيائية والكيميائية والدراسات الدوائية التجريبية قصد تعزيز استخدامها في العلاج.

تم جمع ثمان عينات من حبوب اللقاح الطازجة أحادية الزهرة من نحالين مغاربة مهنيين، وتم تحديد أصلهم النباتي بواسطة المجهر الإلكتروني الكاسح، كما تم تحديد نسبة البروتينات والرماد وكمية المعادن ودرجة الحموضة والرطوبة لهذه العينات.

تم قياس نسبة المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة لحبوب اللقاح من خلال اختبارات مختلفة مثل تحديد محتوى الفينولات، محتوى الفلافون والفلافونول، القدرة الكلية المضادة للأكسدة، اختبار النشاط المضاد للجذور الحرة (DPPH)، ABTS اختبار القدرة الاختزالية. بعد ذلك تم اختيار ثلاث عينات من حبوب اللقاح الطازجة لدراسة تأثيرها الوقائي ضد السمية الدموية والكبدية والكلوية المفتعلة بواسطة مادة الميثوتريكسات (دواء يستخدم في العلاج الكيميائي لأمراض السرطان) عند الفئران. تمت دراسة التأثير المدر للبول عند الفئران ذات الضغط الطبيعي ودراسة تأثير "الوقاية من أمراض الكلى" ضد الحصاة الكلوية المسبَّبة بواسطة مادة الإيثيلين غليكول.

أظهرت النتائج أن حبوب اللقاح التي تمت دراستها غنية بالبروتينات والمعادن ومضادات الأكسدة مثل متعددات الفينول والفلافونويد. كما أشارت التحاليل الفيزيائية والكيميائية إلى أن حبوب اللقاح الموجودة بالمغرب هي ذات جودة عالية. من جانب آخر، كشف التركيب الكيميائي لعينتين من حبوب اللقاح عن وجود مجموعة متنوعة من المركبات الفينولية مثل الكيرسيتين، الروتين، حمض الروزمارينيك، الكايمبفيرول، مشتقات السبيرميدين، الريسفيراترول. هذه المكونات مرتبطة بالتأثيرات الوقائية القوية التي لوحظت عند الفئران التجريبية.

أكدت مجموع نتائج هذه الدراسات أن حبوب اللقاح المغربية الطازجة هي حبوب ذات جودة عالية تلبي المعايير الدولية ولها العديد من الخصائص العلاجية والوقائية. كما ستساهم هذه الدراسة في تعزيز وتثمين هذه المنتوجات المحلية المغربية وفتح الباب واسعا أمام أبحاث كيميائية وصيدلانية وسريرية مستقبلية.

الكلمات المفتاحية: المغرب، حبوب لقاح النحل، عديدات الفينول، كيرسيتين، فلافونويد، كايمبفيرول، ريسفيراترول، وقاية الكبد، وقاية الكلى، وقاية الدم، مدر للبول.

Liste des Figures

Figure 1: Structure interne des anthères siège de formation de pollen 4
Figure 2: Structure schématique de la double paroi du grain de pollen 5
Figure 3: Structure générale du grain de pollen 6
Figure 4: Différentes unités de dispersion des grains de pollen 7
Figure 5: Différentes polarités du grain de pollen 7
Figure 6: Différentes tailles de pollen 8
Figure 7: Différentes formes du grain de pollen selon une vue polaire et équatoriale 9
Figure 8: Exemple de différentes apertures du grain de pollen 10
Figure 9: Dimorphisme du grain de pollen ; différents types d'ornementations 11
Figure 10: Pelotes de pollen d'abeilles 11
Figure 11: relation entre fleur et abeille 12
Figure 12: Gros plan de : (A) poils adaptés pour la récolte de la poussière de pollen. (B) abeille Apis mellifera recouverte de pollen de fleur 13
Figure 13 : Trappe à pollen 14
Figure 14: Charte de couleur de pollen d'abeilles selon son origine botanique 14
Figure 15: chaine de pollen ; de la collection par les abeilles à la formation du pain d'abeilles 15
Figure 16: Coupe transversale d'un grain de pollen et de sa structure multicouche 17
Figure 17: Structure des acides phénoliques du pollen d'abeilles 30
Figure 18: Structure basique des flavonoïdes 30
Figure 19: Structure des différents flavonoïdes du pollen d'abeilles 31
Figure 20: Structure des principaux flavonoïdes du pollen d'abeilles 31
Figure 21: Structure chimique du résveratrol 32
Figure 22: Localisation Géographique des différentes ruchers sur la carte du Maroc 55
Figure 23: Micrographies au microscope électronique à balayage (MEB) 61
Figure 24: Analyse en composantes principales ACP 68
Figure 25: Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique dans le tube rénal proximal 74
Figure 26: Mécanisme d'action du mannitol dans le tube rénale proximal 75
Figure 27: Mécanisme d'action du furosémide au niveau de la branche ascendante de Henlé 75
Figure 28: Mécanisme d'action des thiazidique au niveau du tube contourné distal 76

Figure 29: Mécanisme d'action des diurétiques d'épargne potassique au niveau du tube collecteur cortical *77*
Figure 30: Mécanisme d'action des antagonistes des récepteurs de la vasopressine *78*
Figure 31 : Profil chromatographique de l'échantillon de pollen frais obtenu à 280 nm par LC/DAD/ESI-MS^n *83*
Figure 32: Schéma de fragmentation ESI-MS2 des dérivés de spermidine identifiés dans le pollen d'abeilles frais Marocain *92*
Figure 33: Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet antihypertenseur des différents composés phénoliques du pollen d'abeilles *96*
Figure 34: Oxalate de calcium vu par microscopie électronique à balayage (SEM)..... *101*
Figure 35: Différentes formes des calculs formés du phosphate de calcium (CaP)..... *102*
Figure 36: Différentes formes du calcul de l'acide urique *103*
Figure 37: Examen au microscope optique des échantillons d'urine recueillis, au grossissement de 10 × 10X au jour 30 montrant des cristaux multiples dans le groupe traité par EG. *113*
Figure 38 : Examination histopathologique des coupes de reins des rats des diffèrent groupes par microscope optique a un grossissement de 10 × 10X..... *114*
Figure 39: Structures chimiques de (A) acide folique et (B) méthotrexate *121*
Figure 40: Mécanisme d'action proposé du pollen d'abeilles frais contre les toxicités du MTX *147*
Figure 41: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur l'histopathologie du rein *150*
Figure 42 : Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur l'histopathologie du foie *151*

Liste des Tableaux

Tableau 1: Valeur énergétique du pollen d'abeilles frais *16*
Tableau 2: Différentes vitamines isolées à partir du pollen apicole *25*
Tableau 3: Tableau récapitulatif des différentes méthodes utilisées pour la détermination des différentes molécules actives du pollen *32*
Tableau 4: Récapitulatif des différentes méthodes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles *35*
Tableau 5: Récapitulatif des différentes molécules antioxydantes présentent dans le pollen et leurs effets pharmacologiques. *44*
Tableau 6 : Origine géographique, race d'abeille et période de récolte des échantillons de pollen d'abeilles *55*
Tableau 7: Analyse palynologique des échantillons de pollen d'abeilles *60*
Tableau 8 : Analyse du pH, cendres, humidité et protéines du pollen d'abeilles monofloral . *63*
Tableau 9: Teneur en éléments minéraux du pollen d'abeilles frais monofloral (mg/kg) *64*
Tableau 10: Teneur en antioxydants et activités de l'extrait éthanolique de pollen d'abeilles monofloral *66*
Tableau 11: Composés bioactifs identifiés et quantifiés dans l'échantillon du pollen d'abeilles frais par LC/DAD/ESI-MS^n *84*
Tableau 12: contenu en polyphénols, flavones et flavonols, et activité antioxydante totale ... *85*
Tableau 13: Débit urinaire (mL /24h) après administration orale quotidienne de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée (moyenne ± SEM) *86*
Tableau 14: Effet de l'administration orale des trois dose de l'EAPF du furosémide et de l'eau distillée sur le taux urinaire de la créatinine, de l'urée, du sodium, du potassium et des chlorures chez le rat (moyenne ± SEM) *87*
Tableau 15: Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur la clairance de la créatinine (mL/min) chez des rats normaux (moyenne ± SEM). *88*
Tableau 16: Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur les électrolytes plasmatiques chez des rats normaux (moyenne ± SEM) *88*
Tableau 17 : Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique, la clairance osmolaire et la clairance de l'eau libre chez des rats normaux (moyenne ± SEM) *89*

Tableau 18: Effet des interventions sur le taux sanguin d'urée, de créatinine et de protéines au jour 30 ..... *108*
Tableau 19: Effet des interventions sur le taux sanguin des électrolytes au jour 30 ..... *109*
Tableau 20: Effet des interventions sur les enzymes hépatiques au jour 30 ..... *109*
Tableau 21: Effet des interventions sur le volume et le pH urinaires *110*
Tableau 22: Effet des interventions sur les électrolytes urinaires au jour 30 ..... *111*
Tableau 23: Effet des interventions sur la créatinine urinaire, urée, protéines, acide urique et clairance de la créatinine au jour 30 ..... *112*
Tableau 24: Activité antioxydante et contenu phénolique *115*
Tableau 25: Composition minérale du pollen d'abeilles frais *132*
Tableau 26: identification et quantification des composés phénoliques dans l'extrait de pollen d'abeilles frais *133*
Tableau 27: Contenu en polyphénols, flavonoïdes totaux et activité antioxydante de l'EEPF *134*
Tableau 28: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les paramètres hématologiques *136*
X.4 Tableau 29: Effet des différents traitements sur le poids corporel, le poids des organes et leur poids relatifs *138*
Tableau 30: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur les paramètres biochimiques rénaux *140*
Tableau 31: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les marqueurs du stress oxydatif dans le rein *142*
Tableau 32: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les paramètres hépatiques *144*
Tableau 33: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur le profil lipidique et la glycémie *145*
Tableau 34: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur les marqueurs du stress oxydatif dans le foie *147*
Tableau 35: Comparaison de l'effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur les paramètres du stress oxydatif dans le rein et le foie *149*

Liste des abréviations

ABCA1 : ATP binding cassette subfamily A1 transportor

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ACP : Analyses en composantes principales

AICAR : Amino-imidazole-carboxamido-ribonucléotide

AJR : Apport journalier recommandé

ALT : Alanine aminotransférase

AR : Arthrite rhumatoïde

AST : Aspartate aminotransférase

BCC : Bloqueurs des canaux calciques

BHT : Hydroxytoluène butylé

CaOx : Oxalate de calcium

CaP : Phosphate de calcium

CAT : Catalase

C_{H2O} : Clairance de l'eau libre

COD : Oxalate de calcium dihydraté

COM : Oxalate de calcium monohydraté

C_{osm} : Clairance osmolaire

COX : Cyclooxygénase

DHFR : Dihydrofolate réductase

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAA : Equivalent d'acide ascorbique

EAG : Equivalent d'acide gallique

EQ : Equivalent de quercétine

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

EG : Éthylène glycol

ENaC : Canal épithélial de Na^+

eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale

FTIR : Spectroscopie infrarouge transformée de Fourier

GB : Globule blanc

GGT : Gamma glutamyl-transférase

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Globule rouge

GSH : Glutathion

HAP : Hydroxylapatite

Hb : Hémoglobine

HDL : High density lipoprotein

HTA : Hypertension artérielle

Hte Hématocrite

IAC : Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

IL-1 : Interleukine-1

LC / DAD / ESI-MSn : Chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation « Electrospray »

LDL : low density lipoprotein

LRA : Lésion rénale aiguë

LT : Leucotriène B_4

MC : Maladie de Crohn

MCH : Hémoglobine corpusculaire

MCHC : Concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire

MCV : Volume corpusculaire moyen

MDA : Malondialdehyde

MEB : Microscope électronique à balayage

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MRC : maladie rénale chronique

MTX : Méthotrexate

MTX : Méthotrexate

NC: Néphropathies cristallines

NET : Nécrolyse épidermique toxique

NO : Nitrique oxyde

NO : Oxyde nitrique

OAT : Organic anions transportor

OCP : Phosphate d'octa-calcium

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAL : Phosphatase alcaline

$P_{créa}$: Créatinine plasmatique

pH : Pouvoir d'hydrogène

PLT : Plaquettes

P_{osm} : Osmolarité plasmatique

PR : Pouvoir réducteur

RCH : Rectocolite hémorragique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

ROS : Reactive oxygen speices

RVP : Résistance vasculaire périphérique

SJS : Syndrome de Stevens-Johnson

SNS : Système nerveux sympathique

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone

TAC : Total antioxidant capacity

TBA : Acide thiobarbiturique

TC : Total cholesterol

TC_{H2O}: Réabsorption de l'eau libre

TG : Tri-glycerides

TLR : Toll-like receptors

TNF-α : Tumor necrosis factor-α

$U_{créa}$: Créatinine urinaire

U_{osm} : l'osmolarité urinaire

UPLC-DAD : chromatographie liquide ultraperformante couplé à un détecteur à barrette de diodes

UV-Vis : Ulta violet-visible

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

XRD : Diffraction des rayons X

Table des matières

Dédicace

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des Tableaux

Liste des abbréviations

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Revue De Littérature 3

Le Pollen d'abeilles de la fleur a l'Homme : Origine , Composition phyto-chimique & Propriétés Thérapeutiques 3

I. Introduction 3

II. Pollen de la fleur 4

II.1 Définition 4

II.2 Morphologie et Structure 4

II.3 Classification 6

II.3.1 Unité de dispersion 6

II.3.2 Polarité et symétrie 7

II.3.3 Taille et forme 7

II.3.4 Aperture 9

II.3.5 Ornementations 10

III. Pollen apicole : de la fleur à la ruche 11

III.1 Définition et Origine 11

III.2 Relation fleur-abeille 12
IV. Pollen apicole : de la ruche à l'Homme 13
IV.1 Récolte du pollen par l'Homme 13
IV.2 Pollen d'abeilles frais 15
IV.3 Digestibilité du pollen d'abeilles 17
IV.4 Composition chimique du pollen d'abeilles 18
IV.4.1 Macronutriments 18
IV.4.1.1 Eau 18
IV.4.1.2 Protéines 18
IV.4.1.3 Acides aminés 19
IV.4.1.4 Glucides 20
IV.4.1.5 Fibres alimentaires 21
IV.4.1.6 Lipides 21
IV.5 Micronutriments 22
IV.5.1.1 Minéraux 23
IV.5.1.2 Vitamines 24
Vitamines hydrosolubles 25
Vitamines liposolubles 26
IV.5.2 Caroténoïdes 26
IV.6 Autres constituants du pollen d'abeilles 27
IV.6.1 Les probiotiques 27
IV.6.2 Probiotiques de pollen 27
IV.6.3 Composés volatils du pollen d'abeilles 29
V. Profil phénolique et pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles 29
V.1 Composés phénoliques 29
V.2 Pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles 34
VI. Propriétés thérapeutiques du pollen d'abeilles contre les pathologies liées au stress oxydatif 39
VI.1 Propriétés antioxydantes du pollen d'abeilles 39
VI.2 Propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiantes 40

VI.3 Propriétés hépatoprotectrices 40
VI.4 Propriétés néphroprotectrices 41
VI.5 Propriétés antibactériennes du pollen d'abeilles 41
VI.6 Propriété immunomodulatrice du pollen d'abeilles 42
VI.7 Propriétés hémato-protectrices 42
VI.8 Propriétés anticancéreuse du pollen d'abeilles 43
VI.9 Autres propriétés du pollen d'abeilles 51
VII. Conclusion 52
Chapitre 2 . Pollen d'abeilles monofloral Marocain : Origine Botanique , Caractérisation Physicochimique et activités antioxydantes 53
I. Préface 54
II. Matériel et méthodes 55
II.1 Échantillonnage 55
II.2 Étude palynologique par microscopie électronique à balayage (MEB) 55
II.3 Extraction du pollen 56
II.4 Pouvoir d'hydrogène pH 56
II.5 Humidité 56
II.6 Cendres 56
II.7 Teneur en protéines 57
II.8 Contenu en minéraux 57
II.9 Contenu en polyphénols totaux 57
II.10 Contenu en flavones et flavonols 57
II.11 Activité antioxydante totale 57
II.12 Activité antiradicalaire anti DPPH 58
II.13 Pouvoir Réducteur 58
II.14 Activité antiradicalaire anti ABTS 58

II.15 Analyses statistiques 59
III. Résultats et Discussion 59
III.1 Identification botanique du pollen d'abeilles par microscopie électronique à balayage 59
III.2 pH 62
III.3 Humidité 62
III.4 Teneur en cendres 62
III.5 Teneur en protéines 63
III.6 Teneur en minéraux 63
III.7 Teneur en phénols, flavones/flavonols 65
III.8 Capacité antioxydante totale (TAC) et activités antioxydantes (DPPH, RP, ABTS) 65
III.9 Analyse ACP 67
III.10 Conclusion 69
Chapitre 3 : Composition Chimique et Activité Antioxydante du Pollen Frais Marocain & Exploration de son Effet Diurétique Chez le Rat Normotensif 70
I. Préface 71
II. L'hypertension artérielle en chiffres 71
III. Étiologie de l'hypertension 71
IV. Traitement de l'hypertension 72
IV.1 Traitements non pharmacologiques 72
IV.2 Traitements pharmacologiques 72
V. Matériel et Méthodes 79
V.1 Caractérisation chimique par chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation « Electrospray » (LC / DAD / ESI-MS^n) 79
V.1.1 Extraction des composés bioactifs et préparation de l'EAPF 79
V.2 Estimation du contenu phénolique total 79

V.3 Estimation de la teneur en flavones et flavonols 79
V.4 Estimation de l'activité antioxydante totale (TAC) par dosage du phosphomolybdate 79
V.5 Détermination de l'activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 79
V.6 Détermination du pouvoir réducteur 79
V.7 Produits chimiques de référence 80
V.8 Analyse LC / DAD / ESI-MSn 80
V.9 Protocol expérimental 81
V.9.1 Préparation de l'EAPF 81
V.9.2 Approbation éthique 81
V.9.3 Animaux d'expérience 81
V.9.4 Médicament de référence 82
V.10 Analyses statistiques 82
VI. Résultats 82
VI.1 Caractérisation chimique par LC/DAD/ESI-MS^n 82
VI.2 Activité antioxydante de l'EAPF 85
VI.3 Effet de l'AEFBP sur le débit urinaire 85
VI.4 Effet de l'EAPF sur l'excrétion urinaire des électrolytes 86
VI.5 Effet de l'EAPF sur la clairance de la créatinine 88
VI.6 Effet de l'EAPF sur les électrolytes plasmatiques 88
VI.7 Effet de l'EAPF sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre 89
VII. Discussion 90
VII.1 Caractérisation chimique par LC / DAD / ESI-MS^n 90
VII.2 Activités antioxydantes et diurétiques de l'EAPF 93
VIII. Conclusion 96

Chapitre 4 : Effet protecteur du pollen d'abeilles dans les lésions rénales aiguës, la protéinurie, la cristallurie et les lésions hépatiques aiguës induites par l'ingestion d'éthylène glycol chez le rat 97

I. Préface 98

II. Étiologie et Facteurs de risque de l'urolithiase 99

III. Nature chimique des calculs rénaux 100

IV. Types de calculs rénaux 101

IV.1 Oxalate de calcium (CaOx) 101

IV.2 Phosphate de calcium 102

IV.3 Acide urique 102

V. Lithogénèse ou formation des calculs rénaux 103

VI. Lithiase et lésions rénales aigues LRA 104

VII. Matériel et méthodes 105

VII.1 Collecte et extraction du pollen d'abeilles frais 105

VII.2 Induction de la lithiase par l'éthylène glycol 105

VII.3 Médicament de référence 105

VII.4 Protocol expérimental 106

VII.4.1 Animaux d'expérience 106

VII.5 Analyses biochimiques 106

VII.5.1 Collecte et analyse des échantillons d'urine 106

VII.5.2 Analyse du sang 107

VII.6 Étude microscopique des cristaux urinaires 107

VII.7 Histopathologie des reins 107

VII.8 Détermination du contenu phénolique total 107

VII.9 Teneur totale en flavonoïdes 107

VII.10 Capacité antioxydante totale 107

VII.11 Activité antiradicalaire anti-DPPH 107

VII.12 Pouvoir réducteur (PR) 108
VII.13 Activité antiradicalaire anti-ABTS 108
VII.14 Analyse statistique 108
VIII. Résultats 108
VIII.1 Effet des interventions sur la fonction rénale et les électrolytes sériques 108
VIII.2 Effet des interventions sur les enzymes hépatiques 109
VIII.3 Effet des interventions sur le volume et le pH urinaires 110
VIII.4 Effet des interventions sur le calcium, le phosphore et le magnésium urinaires ... 110
VIII.5 Effet des interventions sur l'excrétion urinaire de sodium, potassium, chlorures .. 111
VIII.6 Effet des interventions sur la créatinine urinaire, l'urée, les protéines, l'acide urique et la clairance de la créatinine 112
VIII.7 Microscopie urinaire et étude histopathologique rénale 113
VIII.8 Tests d'activité antioxydante et contenu phénolique 115
IX. Discussion 115
X. Conclusion 118
Chapitre 5. Composition Chimique, du Pollen Frais Marocain & Exploration in vitro et in vivo, de son Effet Antioxydant et Protecteur Contre l'Hématotoxicité, l'Hépatotoxicité, et la Néphrotoxicité Induites par le Méthotrexate Chez le Rat 119
I. Préface 120
II. Mécanisme d'action du méthotrexate 121
II.1 Effet du méthotrexate sur le folate 121
II.2 Effet du méthotrexate sur l'adénosine et la production des cytokines 121
II.3 Effet du méthotrexate sur la cyclooxygénase/lipoxygénase 122
II.4 Effet immunosuppresseur du méthotrexate 122
II.5 Effet du méthotrexate sur la production des ROS 122
III. Utilisations cliniques du méthotrexate 123
III.1 Méthotrexate pour le traitement du cancer 123

III.2 Méthotrexate pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (AR) 123
III.3 Méthotrexate pour traitement du psoriasis 124
III.4 Méthotrexate pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales 124
IV. Toxicités du méthotrexate 125
V. Matériel et méthodes 126
V.1 Collecte et extraction du Pollen 126
V.2 Analyses chimique de l'EEPF 127
V.2.1 Détermination de la teneur en cendres 127
V.2.2 Détermination du contenu minéral 127
V.2.3 Identification des composés phénoliques par chromatographie liquide ultraperformante couplé à un détecteur à barrette de diodes (UPLC-DAD) 127
V.2.4 Dosage du contenu total en polyphénols 127
V.2.5 Dosage du contenu total en flavonoïdes 128
V.2.6 Activité antiradicalaire anti- $ABTS^{+}$ 128
V.2.7 Activité antiradicalaire anti-DPPH 128
V.2.8 Détermination du pouvoir réducteur ferrique (FRAP) 129
VI. Protocole expérimental 129
VI.1 Approbation éthique 129
VI.2 Répartition des animaux expérimentaux 129
VI.3 Médicament de référence 130
VI.4 Prise de poids corporel et poids des organes (foie, rein) 130
VII. Analyse biochimique 130
VII.1 Évaluation de la fonction hématologique 130
VII.2 Évaluation de la fonction néphro-hépatique et profil lipidique 130
VII.3 Dosage du malondialdehyde (MDA) dans le rein et le foie 130
VII.4 Dosage des enzymes antioxydantes dans les reins et le foie 131
VIII. Examen anatomopathologique 131
IX. Analyses statistiques 131

X. Résultats et discussion 131
X.1 Analyses chimiques, pouvoir antioxydant et profil phénolique de l'EEPF 131
X.2 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction hématologique 134
X.3 Effet des différents traitements sur le poids corporel, le poids des organes et leur poids relatifs 137
X.4 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction rénale 138
X.4.1 Effet des différents traitements sur les paramètres biochimiques rénaux 138
X.4.2 Effet des différents traitements sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau du rein 140
X.5 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction hépatique 142
X.5.1 Effet des différents traitements sur les paramètres biochimiques hépatiques 142
X.5.1.1 Effet des différents traitements sur les enzymes hépatiques 142
X.5.1.2 Effet des différents traitements sur le profil lipidique et la glycémie 144
X.5.2 Effet des différents traitements sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau du foie 145
X.5.3 Comparaison de l'effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur les paramètres du stress oxydatif dans le rein et le foie 148
X.6 Effet des différents traitements sur l'architecture histologique du rein et du foie . 149
X I. Conclusion 151
Conclusion et perspectives 153
Références bibliographiques 155

Introduction générale

Le pollen d'abeilles est un produit de la ruche d'origine végétale collecté par les abeilles *Apis mellifera* L qui utilisent leurs sécrétions salivaire ou du nectar pour agglutiner les grains entre eux et les agglomérer sous forme de pelotes [1].

La découverte et l'utilisation du pollen d'abeilles remonte au enceins temps où les anciens Égyptiens le décrivaient comme «une poussière vivifiante». Dans la Grèce antique, les boulettes de pollen, portées sur les pattes de l'abeille, étaient considérées comme faites de cire, Hippocrate et Pythagore ont recommandé la consommation à leurs patients parce qu'ils croyaient en son potentiel thérapeutique [2].

Les bienfaits pour la santé humaine associés au pollen d'abeilles sont liés à sa composition nutritionnelle qui comprend des protéines, des glucides, des lipides et éléments minéraux nécessaires pour la survie de l'Homme. En plus, la composition du pollen d'abeilles en composés actifs tels que les polyphénols les flavonoïdes et bien d'autres molécules antioxydantes lui confère la propriété « nutraceutique » ou « alicament » [3]. Cependant, La principale difficulté pour l'utilisation du pollen d'abeilles en thérapeutique réside dans la grande variation de sa composition, et donc de son activité biologique, qui dépendra de son origine botanique. Sur cette base, la communauté scientifique s'est posé la question : est-ce que le pollen d'abeilles pourrait être utilisé sans risque ?

Pour répondre à cette question, le monde scientifique s'est divisé en deux groupes, certains ont porté sur des allégations nutritionnelles et thérapeutiques étayées par des preuves scientifiques, d'autres ont évoqué des questions de contrôle de la qualité et de validation des méthodologies qui permettent aux producteurs de pollen d'abeilles d'avoir des connaissances suffisantes pour fournir au marché des produits de haute qualité qui peuvent être utilisés de façon sécurisée et permettent d'avoir des effets thérapeutiques adéquats. La qualité du produit commence à être influencée par les abeilles lors de la collecte du pollen, puis la récolte par les apiculteurs et les technologies utilisées pendant le stockage, la raison pour laquelle on est encore loin pour que le pollen puisse prendre sa place méritée dans la phytomédecine moderne. Pour répondre à cette problématique des études de caractérisation et de standardisations doivent être menées sur des différents pollens d'abeilles et de différents pays du monde dans le but de développer une législation globale afin d'avoir un contrôle de qualité standard harmonisé. D'où émane l'objectif de ce travail de thèse qui repose sur la valorisation et le fondement de standards pour le pollen d'abeilles Marocain en prenant en considération les critères de qualité internationales afin de

d’être dans le même rang des législations. En outre une valorisation pharmacologique est nécessaire pour démontrer les propriétés thérapeutiques du pollen d’abeilles Marocain.

Pour la réalisation de cet objectif nous avons commencé par rassembler les échantillons de pollen chez des apiculteurs professionnels de différentes régions du Maroc, avec un certain savoir sur les bonnes pratiques de récolte du pollen d’abeilles. Un screening physicochimique de huit échantillons de pollen monofloral a été réalisé au laboratoire pour les évaluer en matière de qualité selon les différents standards de qualité internationaux de ce produit. La microscopie électronique et l’identification des composés actifs a été faite pour tracer la carte de plantes pollinifères butinées par ces abeilles et pour démontrer les activités biologiques testées. Dans le même contexte, trois activités biologiques ont été réalisées ; l’activité diurétique et antilithiasique du pollen frais ainsi que son effet protecteur contre la néphro, hémato, et hépatotoxicité induite par le méthotrexate qui est un agent utilisé en chimiothérapie.

Ce manuscrit comporte 5 grands chapitres ; le premier est une revue de littérature dans laquelle nous avons collecté toutes les données et les informations nécessaires pour la compréhension du « grain de pollen » depuis sa formation dans les organes reproducteurs de la plante jusqu'aux cibles appropriées, une histoire d’un petit grain microscopique capable de faire des miracles pour notre organisme. Le deuxième chapitre concerne l’étude de caractérisation physicochimique et l’étude palynologique de nos échantillons ainsi que l’évaluation de leur pouvoir antioxydant. Le troisième chapitre est une étude d’identification des composés actifs du pollen d’abeilles frais ainsi qu’une évaluation de son effet diurétique chez les rats normotensifs. Le quatrième chapitre est une exploration de l’effet protecteur du pollen d'abeilles frais dans les lésions rénales aiguës, la protéinurie, la cristallurie et les lésions hépatiques aiguës induites par l'ingestion d'éthylène glycol chez le rat. Le cinquième chapitre une étude pharmacologique portant sur l’identification des biomolécules et l’évaluation de l’effet protecteur du pollen frais contre la toxicité hématologique, hépatique, et rénale induite par le méthotrexate (MTX) chez les rats. Une conclusion générale et perspectives servirons pour clôturer la présente étude.

Chapitre I : Revue De Littérature

Le Pollen d'abeilles de la fleur a l'Homme : Origine , Composition phyto-chimique & Propriétés Thérapeutiques

I. Introduction

Le grain de pollen est l'organe reproducteur mâle de la fleur, en d'autres termes, l'organe porteur des gamètes mâles ou de leur cellules progénitrices, chez les plantes supérieures, il est produit et dispersé dans le cadre du processus de reproduction des plantes [4]. Le pollen d'abeilles est le résultat final de l'agglutination de grains de pollen de fleurs récoltées par les abeilles ouvrières, maintenus ensemble avec du nectar et/ou du miel, et des sécrétions glandulaires, qui seront récoltés à l'entrée de la ruche [1]. C'est l'un des produits de la ruche les plus importants qui attire l'attention en tant qu'aliment fonctionnel, Il est réputé pour sa teneur élevée en composés bioactifs ayant des effets bénéfiques pour la santé et le bien-être physique et mental humain tel que les protéines, les sucres, et les minéraux [2]. De plus, le pollen d'abeilles présente une excellente source de composés antioxydants tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes et les vitamines A, C et E, conférant à ce produit un grand potentiel antioxydant, ce qui en fait la dernière tendance en matière de supplémentation alimentaire, il est communément appelé le « seul aliment parfaitement complet » [5].

Grâce à la forte charge d'antioxydants naturels, le pollen d'abeilles est l'aliment le plus riche en micronutriments. Les données scientifiques soulignent que le pollen d'abeilles est responsable d'une panoplie d'effets pharmacologiques tels que l'effet antioxydant [6], hypoglycémiant [7], anti-inflammatoire [8], antibactérien [9] et anticancéreux[10]. Récemment, le Conseil fédéral allemand de la santé a officiellement définit le pollen d'abeilles comme « médicament» [11].

La présente revue vise à fournir un aperçu général et complet des propriétés biologiques et alimentaires du pollen dès sa production par la fleur, jusqu'aux cellules cibles. Pour ce faire, et sans avoir s'approfondir dans les détails de la reproduction végétale, nous allons se focaliser sur les caractéristiques généraux communes chez la majorité des types de pollen qui vont nous aider par la suite à bien connaître l'origine du pollen d'abeilles. D'autre part une deuxième partie concernera le pollen apicole, ou encore le pollen d'abeilles de point de vu origine, processus de récolte par les abeilles et par l'Homme, sa composition phytochimique ainsi que ses propriétés thérapeutiques.

II. Pollen de la fleur

II.1 Définition

Les grains de pollen sont des cellules haploïdes ou ce que l'on appelle microgamétophytes synthétisés au niveau des sporophytes pendant la reproduction végétale. Ces gamétophytes peuvent être présents chez les angiospermes et les gymnospermes. Le pollen est produit à partir du tissu sporogène situé dans les sacs polliniques des anthères (figure1), souvent dans des fleurs différentes à partir des ovules, puis dispersé soit par le vent (anémophile) soit par un vecteur animal ou insectes (entomophile). Le pollen ainsi transporté arrive sur le stigmate (partie réceptrice situé sur l'organe sexuel femelle) d'une autre fleur pour former le tube pollinique qui va assurer le transport des gamétophytes vers l'ovule, à ce moment, une communication dite moléculaire est établie permettant ainsi la fécondation et la formation du grain [12–17].

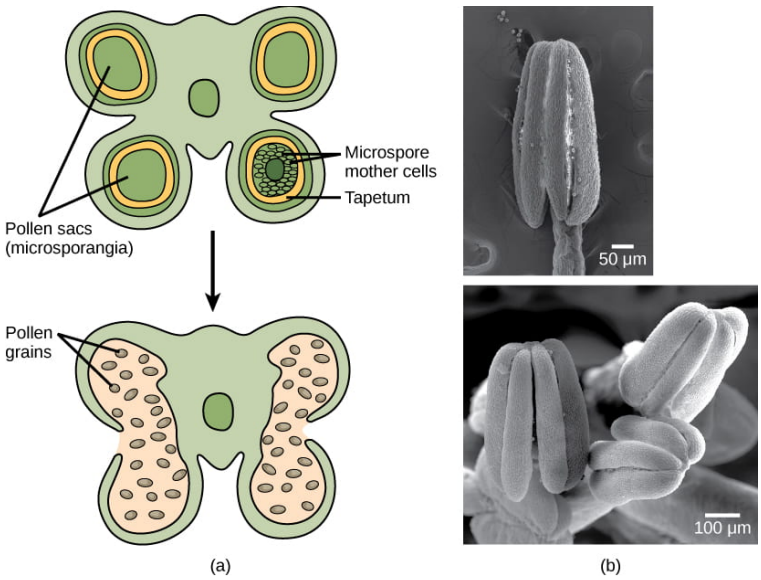


Figure 1: Structure interne des anthères siège de formation de pollen [18]

(a) Coupe transversale de l'anthère en deux stades de formation, (b) microscopie électronique à balayage des anthères

La palynologie est l'analyse du grain de pollen et des spores (étude de leur morphologie, ultrastructure, et structure des intines et des exines). C'est un processus lent et laborieux utilisé dans la classification des plantes bien que dans la reconstruction des conditions végétales et donc climatiques passées grâce à l'exine qui est une couche extraordinairement résistante aux conditions climatiques extrêmes ce qui peut préserver le pollen comme fossile [19].

II.2 Morphologie et Structure

Les grains de pollen sont des cellules microscopiques, tridimensionnelles de taille et de forme qui varient largement d'une plante à l'autre mais qui sont majoritairement sphériques ou

ovoïdales et qui possèdent une organisation générale commune. Ce sont des structures de reproduction caractérisées par une double paroi appelée sporoderm et composée de l'exine qui est une couche externe principalement constituée d'un polymère extrêmement résistant appelé « sporopollénine » avec des pores germinatifs appelés apertures. Les apertures sont des ouvertures au niveau des amincissements de l'exine où l'intine est généralement épaisse, elles assurent le passage du tube de germination, permettent l'accommodation des variations du volume dues aux changements hydriques, elles sont aussi un site de stockage et de libération des enzymes et de substances de reconnaissance relatives aux gamétophytes. [20]

Le grain de pollen de certaines plantes possède une troisième couche appelée « manteau pollinique » souvent de nature lipidique et aromatique qui intervient dans l'interaction entre pollen-pollinisateur (attraction, adhésion, et signalisation). L'exine assure trois fonctions principales : l'harmomégathie qui est un mécanisme d'adaptation du volume contre les déshydratations excessives, la protection mécanique contre les agressions externes (élasticité/rigidité), et la fonction réservoir assurée par les micro-canaux de l'exine où se passent les échanges hydriques. Ces processus assurent ainsi la survie du grain de pollen et donc la protection du matériel génétique. La couche interne de la double paroi où l'intine est une couche pecto-cellulosique beaucoup plus fine par rapport à l'exine, elle est impliquée dans l'émergence du tube pollinique et l'invasion de la paroi cellulaire du stigmate via les apertures (figure1, 2) [20–25].



Figure 2: Structure schématique de la double paroi du grain de pollen [24]

Sur le plan cytologique, le grain de pollen de la plupart des plantes à fleur est asymétriquement bicellulaire, il est constitué de deux cellules haploïdes de taille inégale. La première cellule est la plus grande appelée cellule végétative dotée d'un nucleus central communiquant avec un cytoplasme contenant des mitochondries, plastides, appareil de golgi, ribosomes, et des organites de stockage des polysaccharides, lipides et protéines nécessaires pour le développement des gamétophytes et son maintien jusqu'à germination. La cellule végétative renferme dans son cytoplasme une petite cellule dite générative ou gamétogène (cellule de

reproduction) délimitée par une membrane cytoplasmique mais qui est dépourvue d'organites cellulaires (figure 3) [4,13,26].

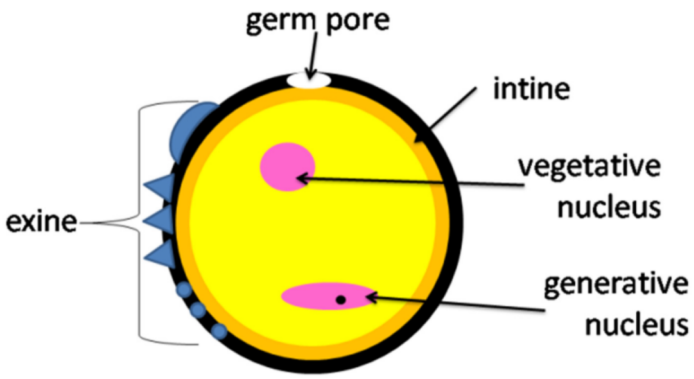


Figure 3: Structure générale du grain de pollen [27]

II.3 Classification

La classification des grains de pollen est un processus qualitatif, impliquant l'observation et la discrimination de ses caractéristiques. Cette classification repose principalement sur des méthodes manuelles qui dépendent fortement des experts, mais aussi sur des méthodes automatisées qui dépendent de la reconnaissance automatique des espèces de pollen via la vision par ordinateur en utilisant des approches de deep-learning, notamment la microscopie optique (MO) et la microscopie électronique à balayage (MEB) [28–32]. Bien que ces approches automatiques soient des méthodes rapides et qui font gagner beaucoup de temps, ces méthodes sont incapables de différencier des espèces étroitement apparentées, et ne peuvent pas fournir de résultats quantitatifs sur le nombre de grains de pollen contenus dans un échantillon. Les grains de pollen présentent des variations remarquables de taille, de forme, de nombre d'ouvertures et de texture de surface. Ces variations permettent d'identifier et de classer une plante au niveau de la famille et du genre, et souvent même au niveau de l'espèce, puisque chaque plante produit son propre pollen génétiquement distinct [33]. Cette caractérisation repose généralement sur la morphologie et la structure du grain de pollen et inclue les critères distinctifs suivants :

II.3.1 Unité de dispersion

Les grains de pollen produits à partir du tissu sporogène subissent des divisions méiotiques pour former des tétrades. A maturité, les grains de pollen ainsi formés ne restent pas associés et se dissocient en un seul grain appelé monade, parfois les dyades (deux unités), tétrades (quatre unités), octades (huit unités), polyades (plusieurs unités) ou pollinium (tout le contenu d'un anthère est uni dans une seule masse) sont observés.[22,34]

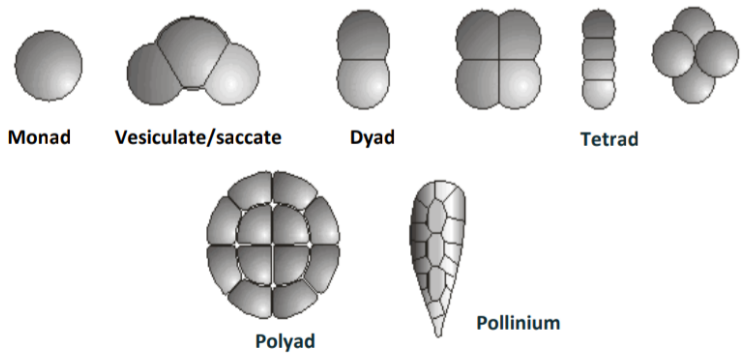


Figure 4: Différentes unités de dispersion des grains de pollen [34].

II.3.2 Polarité et symétrie

La polarité ou la position de l'aperture est un critère important dans l'identification et la description des grains de pollen, elle est déterminée au stade de développement méiotique où il est en tétrades avant leur séparation. Le grain de pollen est considéré comme un globe à deux pôles (le pôle proximal situé à côté du centre de la tétrade et le pôle distal à proximité de la partie extérieure de la tétrade). Sur cette base, le pollen peut être apolaire, isopolaire ou hétéropolaire en fonction de l'égalité ou l'inégalité des deux faces polaires. Un grain de pollen est dit symétrique s'il a un plan de symétrie qui divise le grain en deux parties opposées, équivalentes de point de vue taille et forme. Lorsque les plans de symétrie sont absents, le pollen est dit asymétrique (figure 5) [34].

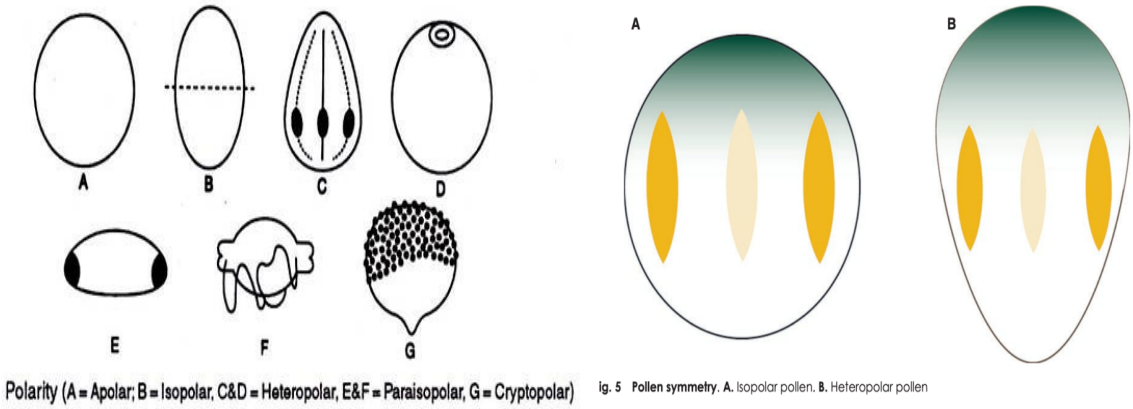


Figure 5: Différentes polarités du grain de pollen [12]

II.3.3 Taille et forme

La taille du pollen varie de moins de 10 µm à plus de 150 µm (Figure 6). Pour indiquer la taille du pollen, le plus grand diamètre est utilisé (150 µm), elle dépend du degré d'hydratation et de la méthode de préparation. En raison de cela, une gamme catégorisant la taille du pollen est

recommandée: très petite (<10 µm), petite (10–25 µm), moyenne (26–50 µm), grande (51–100 µm) et très grande (>100µm).[12, 34,35].

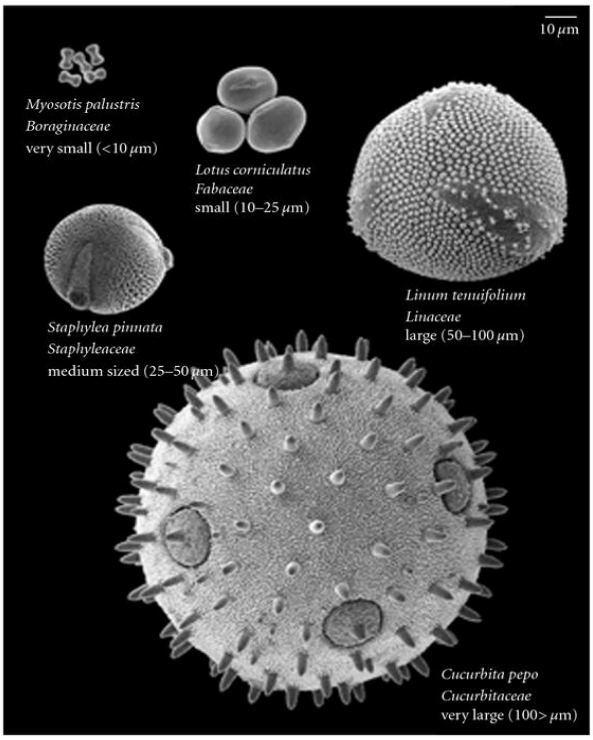


Figure 6: Différentes tailles de pollen [36]

La forme des grains de pollen varie d'une espèce à l'autre et s'avère utile pour l'identification des spores/pollens. Cependant, elle peut varier considérablement au sein d'un type de grain ou même au sein d'une espèce. En raison de l'effet harmomégathique, la forme du pollen peut changer, grâce à l'élasticité de l'exine et les replis des apertures. D'après G. Erdtman [19], la forme des grains de pollen peut varier de très plate avec un axe polaire court « peroblate » à très allongée avec un axe polaire deux fois plus long que l'axe équatorial. La forme du pollen peut être circulaire, elliptique, triangulaire, rectangulaire, quadrangulaire ou encore d'autres formes géométriques (figure 7) [12,34,37].

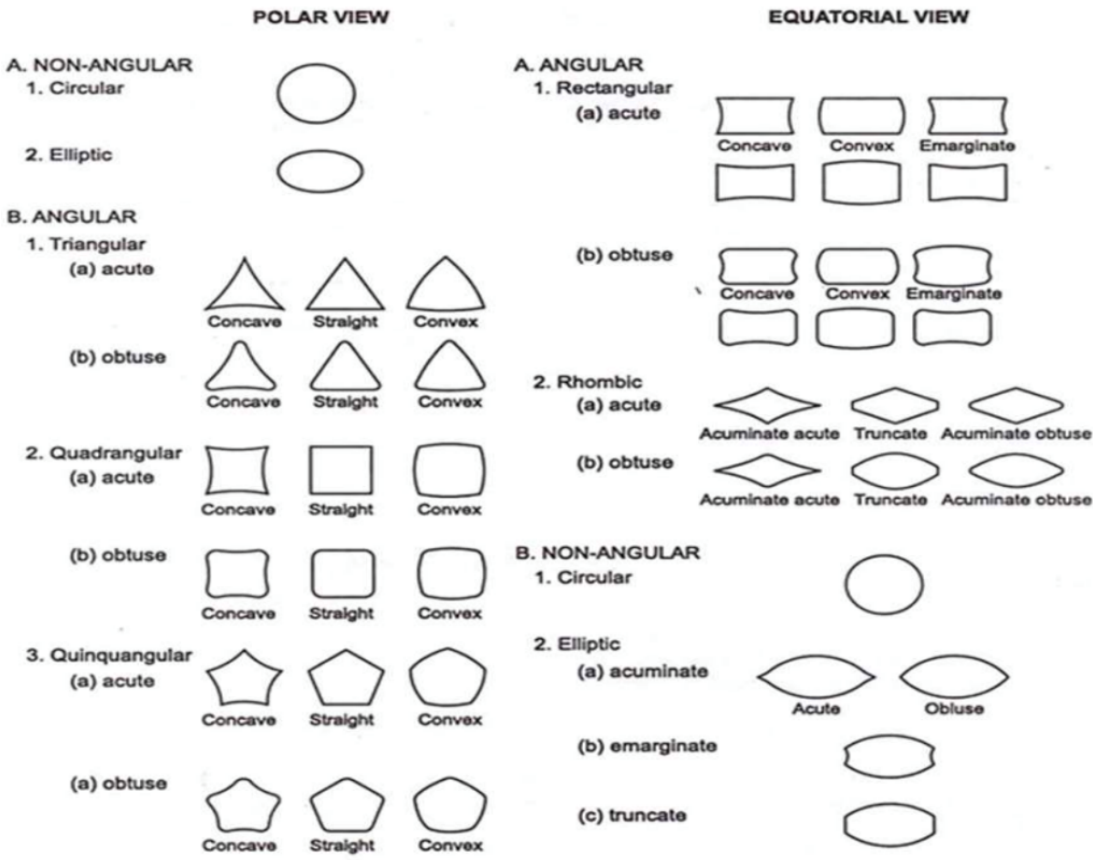


Figure 7: Différentes formes du grain de pollen selon une vue polaire et équatoriale [35]

II.3.4 Aperture

Comme vue précédemment dans la section structure, les apertures sont définies comme étant des ouvertures au niveau de l'exine, différentes de point de vue morphologique et/ou anatomique de son environnement où la couche d'exine est soit absente soit réduite en épaisseur (figure 8). Les apertures jouent un rôle crucial non seulement dans l'accommodation harmomégathique des changements de volume mais aussi elles sont des sites d'initiation des tubes polliniques pendant la germination, des sites d'absorption de l'eau ou de transfert de substances de reconnaissance [12,38–40] .

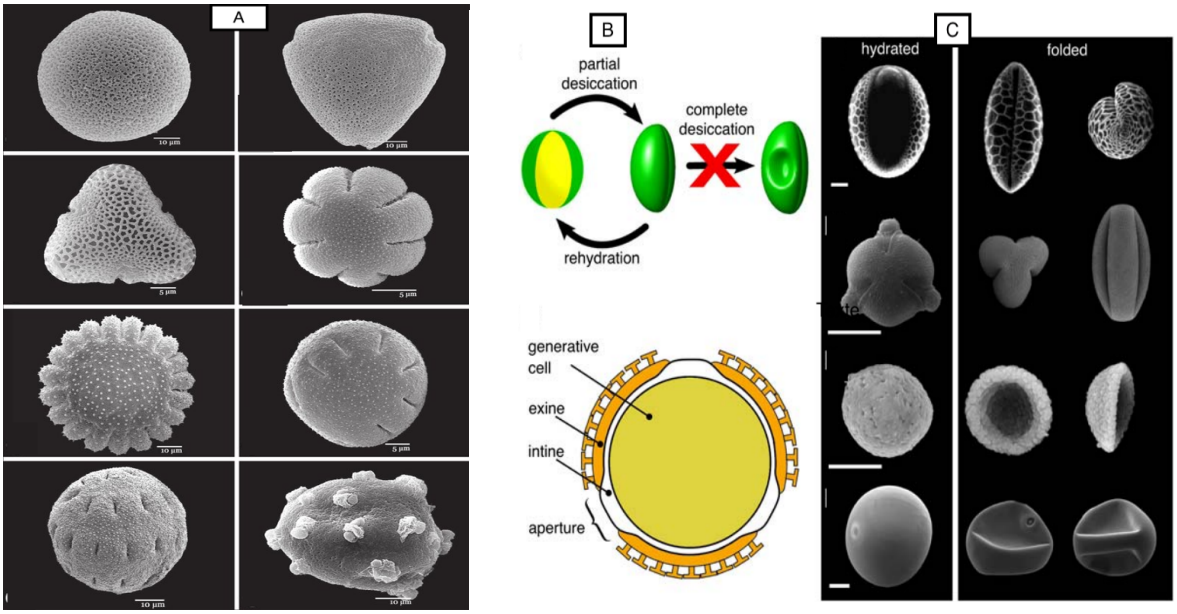


Figure 8: Exemple de différentes apertures du grain de pollen [20]

(A) exemple de variation du nombre et de position des apertures des *Rubiaceae*. (B) changement de forme et de taille des grains de pollen lors d'une dessiccation. (C) La forme du pollen hydraté est sphéroïdale Le pollen s'allonge lors de la dessiccation lorsque les ouvertures se ferment et se replient vers l'intérieur.

Les apertures varient considérablement en nombre, en forme et en taille, entres les différentes espèces de pollen voire même au sein de la même espèce. Le plus souvent, elles se présentent sous la forme d'une lune sphérique (colpus ou sulcus), d'une région circulaire (porus ou ulcus) ou d'une combinaison des deux (colporus). Cependant certains pollens se présentent avec une aperture absente et on l'appelle inaperturé, cette absence est probablement liée à l'exine relativement mince qui caractérise le pollen de quelques groupes [12,40,41].

II.3.5 Ornementations

Le mot « ornementation » et/ou sculpture s'appliquent aux caractéristiques de surface d'un grain de pollen. Il existe deux types différents d'ornementation de l'exine : le premier type correspond à la structure qui comprend toutes les formes et arrangements de la face interne de l'exine, tandis que le deuxième correspond à la sculpture qui comprend les caractéristiques géométriques externes de l'exine. Il existe plusieurs modifications de la texture externe de l'exine où le tectum (face externe de l'exine) peut être lisse (psilate) ou avec des excroissances de divers types (ornementations) comme des spinules, des épines, des pila, des verrues, des gemmes, des claves, des granules, etc., qui varient extrêmement en forme et en taille et qui jouent un rôle important dans la pollinisation.

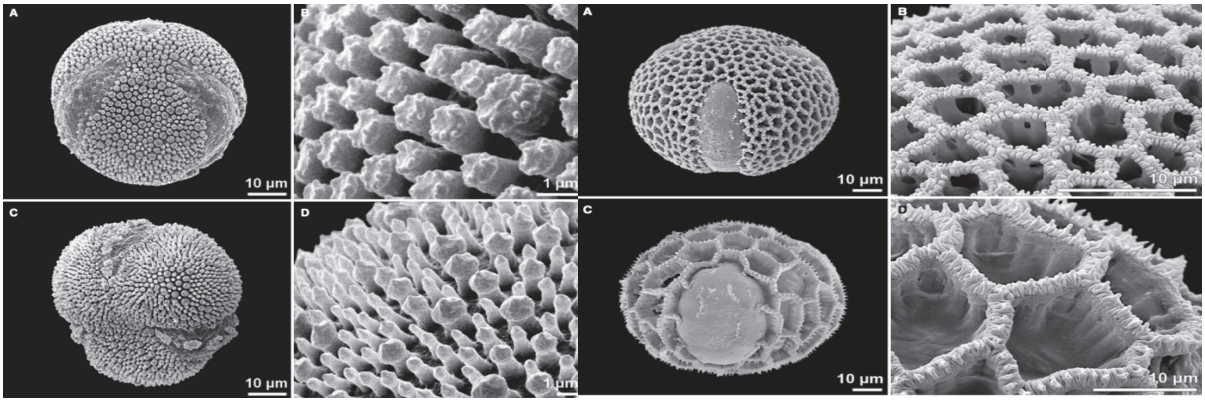


Figure 9: Dimorphisme du grain de pollen ; différents types d'ornementations. [42]

Une description précise des ornementations polliniques nécessite un grossissement optique précis et une résolution adéquate des points. La microscopie optique et la microscopie électronique à balayage sont utilisées simultanément pour cette fin.[12,23,42]

III. Pollen apicole : de la fleur à la ruche

III.1 Définition et Origine

Le pollen d'abeilles est un mélange de pollen de fleurs, de sécrétions d'abeilles et de nectar rassemblés ensemble dans des pelotes de pollen (Figure 10). Les nutriments nécessaires à la survie et au maintien de la santé des colonies d'abeilles proviennent de deux sources principales : le nectar et les grains de pollen. Le nectar est la matière première pour la production du miel ; il est principalement produit par les glandes nectarifères des plantes [43] tandis que les grains de pollen comme nous avons élucidé dans la partie « pollen et palynologie », sont les éléments producteurs des gamètes mâles des plantes. Ils se présentent sous forme de fines poussières de tailles microscopiques et de couleurs différentes selon les plantes indigènes[44].



Figure 10: Pelotes de pollen d'abeilles

Le nectar de fleurs fournit aux abeilles des composés de carbone et d'azote, et les grains de pollen fournissent d'autres besoins alimentaires tels que les lipides, les protéines, les vitamines

et les minéraux, le pollen est récolté par l'abeille *apis mellifera* pour le but de nourrir ses larves lors des premiers stades du développement et aussi pour le maintien de la colonie [45,46]

III.2 Relation fleur-abeille

La relation fleur-abeille est une relation mutualiste dans laquelle les fleurs effectuent une reproduction sexuée et les abeilles profitent d'un repas de nectar et de pollen [46]. Pour attirer les abeilles, les plantes utilisent différentes stratégies pour être pollinisées pour assurer leur reproduction. Parmi ces stratégies, on cite la coloration des pétales et le dégagement d'odeurs sous forme de phéromones [47]. En effet, les abeilles effectuent des milliers de visites aux fleurs afin de récolter la quantité de pollen et de nectar dont elles ont besoin[48].

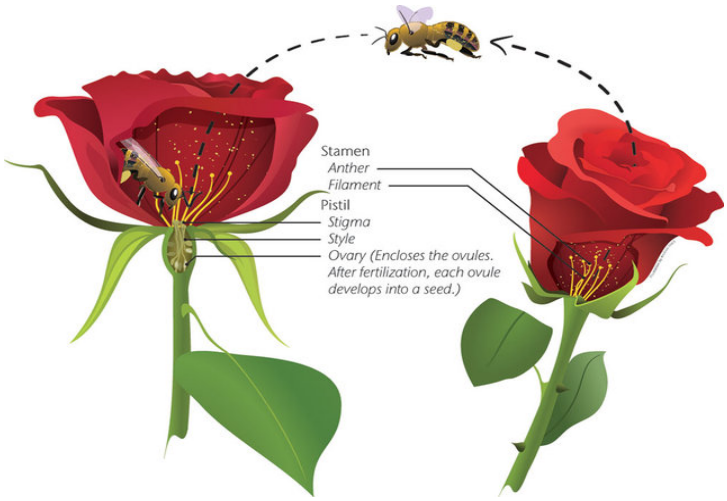


Figure 11: relation entre fleur et abeille [49]

La recherche de nourriture est une activité très importante et essentielle pour la vie des colonies d'abeilles. Le comportement de recherche de nourriture est un comportement développé chez les abeilles ouvrières à partir de l'âge d'une à deux semaines [50]. Les abeilles ouvrières butineuses effectuent des vols de reconnaissance pour se familiariser et à l'âge de 21 jours elles quitteront la ruche pour chercher et récolter autant d'éléments nécessaires à la nutrition tels que le nectar, le miellat, le pollen, ainsi que l'eau, , et la résine pour garantir l'asepsie de la ruche [51,52].

Le nectar et l'eau sont aspirés par pompage et capillarité à l'aide de la trompe de l'abeille butineuse. Ces liquides collectés sont stockés dans les récoltes des butineuses puis les abeilles les déchargent vers les autres ouvrières de la ruche [53]. Alors que le pollen est retenu soit passivement ou activement par la brosse de poils (scopae) située sur les pattes postérieurs de l'abeille (figure 12,A), puis déposés dans les paniers sous forme de boules, par l'ajout de salive et de nectar [48]. La majorité des abeilles ont développé des structures spécialisées pour

transporter le pollen vers leurs nids et ont modifié leurs comportements de toilettage pour transférer le pollen de leur corps vers la ruche [54].

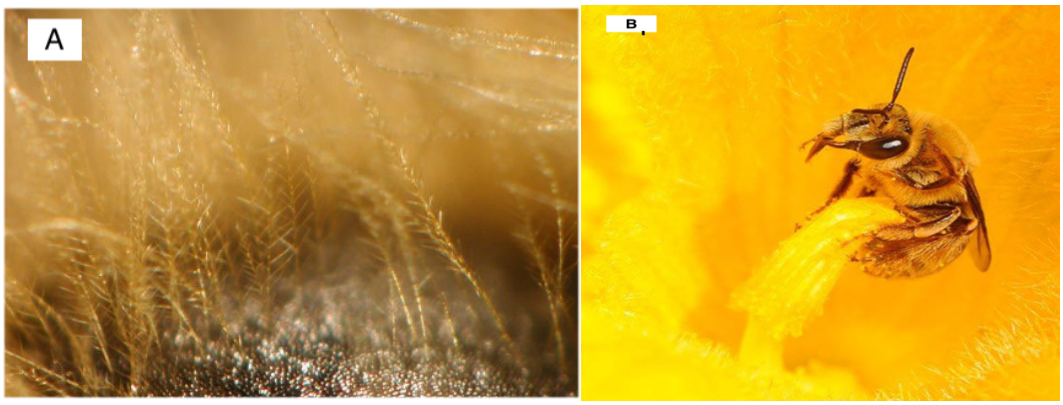


Figure 12: Gros plan de : (A) poils adaptés pour la récolte de la poussière de pollen. (B) abeille *Apis mellifera* recouverte de pollen de fleur [49]

Dès que l'abeille butineuse arrive à la ruche, elle enrobe les boules de salive, puis elle compacte les alvéoles avec une couche de boules de pollen et une couche de miel puis les coiffe d'une couche de cire [55]. A ce stade, les fermentations lactiques ont lieu grâce à l'intervention de bactéries qui se développent dans le milieu [46]. Ces bactéries subissent une série de réactions qui diminuent le pH du milieu, bloquent la germination du pollen et augmentent la facilité d'absorption et la valeur nutritionnelle du pollen [56]. Les bactéries qui interviennent dans le processus de fermentation sont : *Pseudomonas* qui consomme de l'oxygène et crée un milieu anaérobique, *Lactobacillus* qui transforme les glucides en acide lactique et enfin *Saccharomyces* qui assure le métabolisme du reste des sucres qui existent dans le milieu [56].

IV. Pollen apicole : de la ruche à l'Homme

IV.1 Récolte du pollen par l'Homme

La récolte du pollen est en quelque sorte une pratique relativement nouvelle qui date des années 1940 où le premier piège à pollen a été inventé en Allemagne et aux États-Unis. dix ans plus tard la commercialisation du pollen apicole pour des fins diététiques a commencé dans au moins dix-huit pays à travers le monde [57]. Actuellement, le pollen est collecté en plaçant des trappes à pollen à l'intérieur de la ruche et lorsque les abeilles arrivent avec leurs charges de pollen attachées aux pattes postérieures, elles doivent forcer leur passage par des grilles avec de petits trous d'environ 5 mm. En raison de la petite taille du piège, les abeilles perdent une partie de leurs charges polliniques, qui tombent dans des conteneurs spéciaux (figure 13). [58].



Figure 13 : Trappe à pollen [59]

Le pollen d'abeilles peut être présenté en différentes formes (voir partie : caractéristiques et classification du pollen) et couleurs, telles que le blanc, noir, marron, jaune, orange, jaune, bleu ou jaune-brun, selon les plantes butinées par les abeilles (figure 14) [1]. Une colonie d'abeilles peut fournir entre 50 g et 250 g de pollen quotidiennement et 15 à 40 kg de pollen par an, la production mondiale de pollen étant d'environ 1500 tonnes par an [60].



Figure 14: Charte de couleur de pollen d'abeilles selon son origine botanique [61]

Le pollen est dit monofloral lorsque la charge pollinique est issue d'une même plante (taxonomie) dans ce cas, les propriétés physiques et biochimiques de la plante sont préservées. Alors que les charges polliniques issues de différentes plantes sont dites pollen polyfloral.

Généralement, le pollen polyfloral est le plus souvent collecté et commercialisé par les apiculteurs [62].

Le pollen qui arrive à l'intérieur de la ruche sera mélangé avec du nectar, des enzymes digestives et du miel et puis emmagasiné dans les alvéoles où il subira une fermentation bactérienne pour former ce qu'on appelle le « pain d'abeille » (figure 15) [60,63–65]

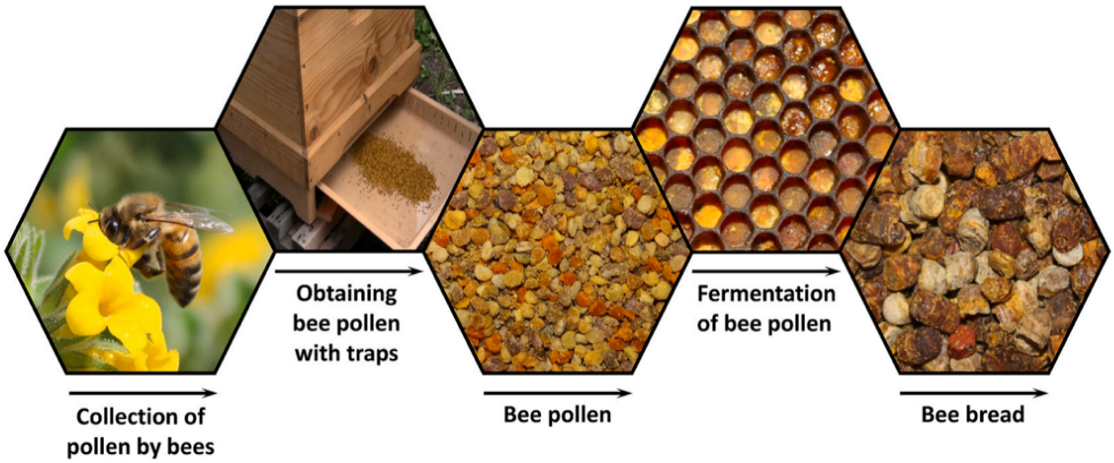


Figure 15: chaine de pollen ; de la collection par les abeilles à la formation du pain d'abeille [60]

IV.2 Pollen d'abeilles frais

Le pollen récolté à l'aide des trappes à pollen placées à l'entrée de la ruche est appelé « pollen frais » en raison de son taux d'humidité élevé : près de 20% à 30%. Cette humidité en fait un milieu de culture idéal pour les micro-organismes comme les bactéries et les levures, ce qui oblige les apiculteurs à le récolter quotidiennement, et à le conserver immédiatement au congélateur jusqu'à traitement ultérieur [1,63].

Pour préserver les propriétés biologiques et nutritives optimales du pollen frais, en gardant l'activité enzymatique maximale, essentielle pour ces effets nutritionnels bénéfiques, Patrice Percie du sert a inventé et breveté en 1994 la technique de congélation sous azote où le pollen est immédiatement congelé et conserver à -20°C sous nitrogène pour conserver une meilleure qualité nutritive [59,65,66].

Cette méthode de conservation nécessite un stockage sous réfrigération sous une température arrivant à -20°C, ce qui rend difficile la commercialisation du pollen frais de point de vue coût et dépenses. Pour minimiser cela, les apiculteurs ont cherché à réduire le taux de l'humidité par séchage à un certain niveau (6%) pour empêcher la détérioration microbienne du pollen et ainsi réduire significativement le volume et le poids ce qui contribue à une minimisation de coût du conditionnement, de stockage et de distribution [1,67].

Il existe différentes méthodes de séchage les plus répandues sont celles par four électrique où l'humidité peut s'écouler en continu, la température maximale ne doit pas dépasser 40°C et le temps de séchage doit être le plus court possible afin d'éviter les pertes de composés volatils. La deuxième méthode et celle de séchage par lyophilisation qui se fait dans des machines spéciales et représente une meilleure alternative au pollen chauffé. Au cours de ce processus, le pollen est gelé puis la pression environnante est réduite pour permettre à l'eau gelée de passer directement de la phase solide à la phase gazeuse.

Le pollen d'abeilles frais est riche en protéines, lipides, carbohydrates, vitamines, caroténoïdes, et en éléments minéraux (Tableau 1) [65].

Tableau 1: Valeur énergétique du pollen d'abeilles frais

Valeur pour 100 g	AJR	Ciste	Châtaignier	Saule	bruyère	Aubépine
Apport calorique	2000 kcals	353	320	316	354	418
protéines	50 g/J	14,2	19,6	19,6	15,5	23,7
lipides	70g/J	6,6	4,2	5,8	3,9	7
carbohydrates	260 g/J	58	52	47	64,5	54,8
Fibres	25g/J	12,8	14,4	14,4	13,1	10,3
Vitamine B1	1,1 mg/J	0,8	0,52	1,01	0,38	0,92
Vitamine B2	1,4 mg/J	0,76	1,17	0,86	0,86	1,23
Vitamine B3	16mg/J	4,6	6,7	7,1	4,79	0,5
Vitamine B5	6mg/J	0,86	1,24	1,19	0,9	0,5
Vitamine B6	1,4 mg/J	0,27	0,29	0,3	0,25	0,69
Vitamine B9	200 µg/J	124	371	844	128	2073
Vitamine C	80 mg/J	14,2	14,3	29,8	20,2	62,5
Vitamine E	12 mg/J	18,7	4,2	11,8	9,28	2,18
Sodium (Na)	8000 mg/J	26	30	31	31	30
Potassium (K)	2000 mg/J	370	504	513	484	NA
Calcium (Ca)	800 mg/J	138	100	100	28	138
Magnésium (Mg)	375 mg/J	26,5	50,1	71,4	60,1	85
Fer (Fe)	14 mg/J	NA	NA	NA	NA	6,1
Zinc (Zn)	10 mg/J	2,26	6,47	4,76	3,22	4

Cependant, Des études récentes ont montré que les vitamines C, E, A sont perdues après séchage du pollen d'abeilles à 42 °C et à 32 °C leur taux diminue de de 31 %, Plusieurs autres

études ont démontré que la méthode de séchage et de stockage peuvent influencer la composition et la valeur nutritive du pollen [1,63,67,68].

IV.3 Digestibilité du pollen d'abeilles

Comme nous avons vu dans la partie « morphologie et structure », le grain de pollen est constitué de deux couches ; l'intine qui est constituée essentiellement de la sporopollénine de nature solide et flexible et l'exine qui est composée de cellulose et de pectine et de structure plus faible que l'exine (Figure 16).

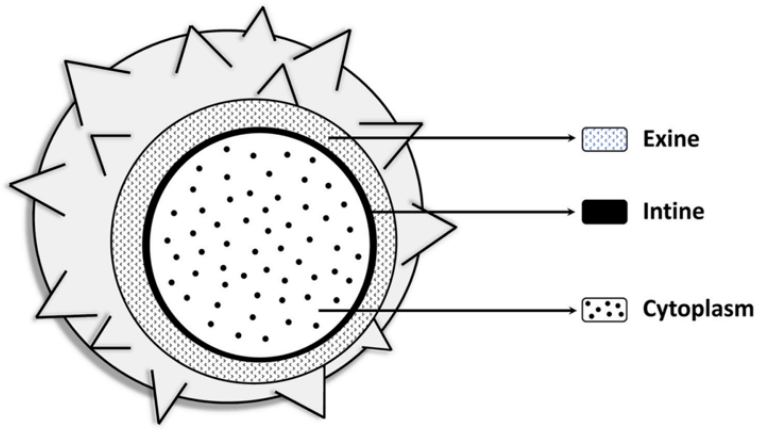


Figure 16: Coupe transversale d'un grain de pollen et de sa structure multicouche [60]

Cette structure multicouche garantit au grain de pollen une grande résistance aux bactéries et préserve également le contenu du grain des facteurs environnementaux tels que la température, les changements de pH ou les rayons ultraviolets [20]. Cette protection est également efficace contre la digestion des espèces monogastriques y compris l'Homme et l'abeille en raison de l'absence d'enzymes spécifiques, au niveau de leur tractus gastro-intestinal. [60,69].

Contrairement au pollen de fleur, Le pollen collecté par l'abeille est mieux digéré par l'Homme. L'abeille pendant son voyage de collecte, elle colle les grains de pollen avec du nectar. Ainsi les sucres de ce nectar vont traverser les deux couches du grain grâce à la différence de pression osmotique, cette différence favorise son explosion et la libération de son contenu quand il est placé dans l'eau ce qui augmente la biodisponibilité de ses composées [65,70].

Pour favoriser la digestibilité et par conséquence augmenter la teneur en molécules bioactives du pollen, plusieurs études ont été menées sur différents types de pollen pour évaluer l'effet des différents traitements sur sa digestibilité. L'objectif de ces études était d'appliquer différents prétraitements tels que alcalin, thermique sec et thermique humide, bactérien, physique (sonication) ou par hydrolyse enzymatique, (des enzymes gastriques humaines telle que

l’enzyme pancréatique) afin d'évaluer l'effet de chaque prétraitement sur la teneur de protéines, de sucres, la capacité antioxydante et du contenu en composés phénoliques.

Les résultats de ces études varient selon le type de pollen étudié ainsi que la nature chimique des composés, mais aussi confirment tous que ces traitements (spécifiquement thermique et enzymatique), augmentent la biodisponibilité des nutriments (protéines, sucres, protéines, minéraux et composés phénoliques) contenus dans le grain de pollen grâce à la perturbation structurale de sa double paroi résistante, [71–76].

IV.4 Composition chimique du pollen d’abeilles

Le pollen d’abeilles est l'un des super-aliments magiques en raison de sa composition extrêmement large en composés nutritionnels et en microéléments. Cependant, cette composition peut être affectée par l'origine botanique, la saison de récolte et les méthodes de stockage (durée de lyophilisation) [68]. Concernant cette grande variabilité, la composition nutritionnelle et phytochimique a été étudiée, résumée et standardisée [1,59,66]. Dans cette section, nous avons rassemblé les principaux macro et micronutriments contenus dans le pollen récolté par les abeilles.

IV.4.1 Macronutriments

IV.4.1.1 Eau

Plusieurs études ont réussi à quantifier la teneur en eau dans le pollen d’abeilles ,les résultats obtenus sont largement variables et dépendent des conditions de stockage (pollen d'abeille frais ou séché), de son origine botanique, et géographique [77].

Pour le pollen fraichement récolté, la teneur en eau varie entre 20 et 30 % [1].Cependant, cette humidité élevée est considérée comme un environnement favorable à la croissance bactérienne et fongique [78,79]. Cela conduit à l'obligation du processus de congélation du pollen d’abeilles immédiatement après la récolte[80]. D'autres chercheurs préfèrent le traitement à l'azote du pollen d’abeilles frais pour préserver les propriétés microbiologiques et nutritionnelles optimales [65]. La teneur en eau maximale autorisée dans le pollen d’abeilles séché dépend du pays et ne doit pas dépasser 4 % pour la législation brésilienne, 6 % pour la Pologne et la Suisse, 8 % pour l'Argentine et 10 % pour la Bulgarie [1,66,77,81–83]. Ainsi, le taux d'humidité peut être utilisé comme critère de qualité du pollen d’abeilles.

IV.4.1.2 Protéines

La production de protéines pour la consommation humaine, la définition du besoin en protéines, l'évaluation de sa qualité pour répondre aux besoins humains et la gestion des conséquences des

variations d'apports protéiques dans les régimes alimentaires sont des enjeux majeurs de santé publique. Par conséquent, il est nécessaire d'assurer un apport quotidien suffisant en protéines de bonne qualité biologique, puisque le corps humain est incapable de les stocker. Ainsi le pollen d'abeilles connu pour sa haute teneur en protéines peut assurer une alimentation parfaite en matière de besoins en protéines. De plus, le pollen est la principale source de protéines pour les abeilles, il fournit les éléments nécessaires à leur longévité, au développement de leurs organes, à la croissance des larves et à la taille de leur corps [84,85]. Les protéines fournissent également des substances essentielles pour la production de la gelée royale dans la ruche [86]. La teneur en protéines est largement variable selon les espèces végétales et la zone géographique de récolte et varie entre 10 et 40 % du poids sec [1,87].

IV.4.1.3 Acides aminés

Les acides aminés sont cruciaux non seulement pour la synthèse des protéines mais aussi pour la biosynthèse des hormones ainsi que d'autres molécules ayant un rôle biologique. Sur le plan nutritionnel, on distingue deux sortes d'acides aminés, à savoir les acides aminés essentiels que l'organisme humain ne peut pas synthétiser, et les acides aminés non essentiels que notre corps a toute la machinerie pour les synthétiser. Dans le même contexte, le pollen d'abeilles collecté est souvent considéré comme « l'aliment naturel le plus parfait » car il fournit une excellente source de tous les acides aminés essentiels nécessaires aux abeilles et à la nutrition humaine [88,89]. Cette teneur varie fortement d'une espèce à l'autre et dépend de l'origine botanique et géographique, des conditions climatiques et de la disponibilité des nutriments dans la plante [87,90,91]. Par conséquent, la quantité d'acides aminés peut être utilisée comme indicateur de l'adéquation des processus, de stockage et de séchage [2,92].

La teneur totale en acides aminés dans le pollen d'abeilles a été quantifiée par de nombreux chercheurs, elle variait généralement entre 108,1 et 287,7 mg/g de pollen d'abeilles [93]. Concernant le profil en acides aminés, De-Melo et Almeida-Muradian ont rapporté vingt-cinq acides aminés dont huit sont essentiels (valine, leucine, isoleucine, lysine, phénylalanine, thréonine, histidine, méthionine) [2]. Le tryptophane est généralement indétectable en raison de la méthode d'hydrolyse employée dans la détermination des acides aminés. Cependant, le tryptophane a été détecté dans le pollen d'abeilles Chinois, Slovène, Espagnol et Italien à l'aide de méthodes spécifiques de chromatographie liquide à haute performance [94–96]. Les acides aminés restants ne sont pas essentiels tels que l'acide aspartique, l'alanine, la glycine, la glutamine, l'arginine, l'asparagine, l'acide glutamique, la sérine, la tyrosine, la cystine, la cystéine, l'acide γ-aminobutyrique (GABA), l'ornithine, la proline et l'homosérine [2]. Il a été

rapporté que la proline est l'acide aminé le plus abondant dans le pollen d'abeilles séché issu de nombreux pays, tandis que l'acide glutamique est le principal acide aminé dans le pollen d'abeilles frais [2,94,97].

IV.4.1.4 Glucides

Le pollen d'abeilles est composé de pollen mélangé avec du nectar et des sécrétions salivaires de l'abeille. Les glucides constituent la fraction majeure du pollen d'abeilles (13 % à 55 %), ce sont principalement des polysaccharides et des matériaux de la paroi cellulaire [1]. les glucides peuvent être affectés par l'origine botanique et géographique, les méthodes de récolte et le processus de conditionnement, comme une température élevée lors du séchage du pollen d'abeilles frais [98].

La teneur en sucres est le paramètre de qualité le plus important dans les études de caractérisation du pollen d'abeilles et ne doit pas être inférieure à 40 % [1]. Néanmoins, les sucres sont généralement négligés ou inclus dans les glucides totaux qui regroupent également les fibres alimentaires et l'amidon [99]. La composition en sucres du pollen d'abeilles a été évaluée par de nombreuses études soit en tant que sucres réducteurs [68,100–103] ou sous forme de sucres individuels [94,104–107]. Toutes ces études ont montré une prédominance du glucose et du fructose en tant que monosaccharide qui représentait la majeure partie de la fraction de sucre. Le saccharose, le maltose, le tréhalose, le turanose et le mélézitose ont été identifiés dans d'autres études [104,108]. La teneur en sucres et leur profil peuvent être considérablement influencés par le nectar ajouté par les abeilles lors du conditionnement et du stockage du pollen collecté par les abeilles [68,109]. La source florale, le processus de séchage et les méthodes d'extraction peuvent également affecter considérablement la teneur en sucres [98,103,106].

Le mannitol est un polyol précédemment identifié et isolé à haute teneur dans le pollen collecté par les abeilles dépourvues de dard telles que la *Melipona subnitida* de Jandaíra-Brésil, *Tetragonula biroi Friese* des Philippines et *Trigona* de Malaisie [91,110,111]. Selon ces auteurs, la quantité importante de mannitol ne dépend pas de l'origine florale et supposent que les précédentes espèces d'abeilles sans dard sont capables de convertir le glucose et le fructose principalement présents dans les fleurs en mannitol via leurs enzymes salivaires. Sur cette base, les sucres peuvent être considérés comme un paramètre supplémentaire pour établir des normes de qualité pour le pollen d'abeilles.

IV.4.1.5 Fibres alimentaires

Les fibres alimentaires décrivent la fraction soluble et insoluble des fibres provenant des aliments d'origine végétale, qui comprennent l'hémicellulose, la cellulose, la lignine, les oligosaccharides, les pectines, les gommes et les cires, ces composés sont résistants aux enzymes digestives, ils ne sont donc ni hydrolysés ni absorbés dans le tractus intestinal [112,113]. De nombreuses études récentes ont soutenu le rôle physiologique crucial des fibres alimentaires dans le corps humain, en effet elles sont impliquées dans la gestion du diabète de type 2 par la promotion sélective de certains microbiotes intestinaux [114,115]. Un régime riche en fibres s'est avéré efficace dans de nombreuses pathologies telles que les troubles liés à l'obésité, les maladies cardiovasculaires, la constipation, les maladies inflammatoires de l'intestin et les cancers du côlon [116–120]. À ce sujet, le pollen d'abeilles peut constituer une bonne source de fibres alimentaires, en particulier de fibres brutes. Malgré l'importance du pollen d'abeilles dans l'alimentation humaine, peu d'études de caractérisation se sont concentrées sur la détermination de la teneur en fibres alimentaires du pollen d'abeilles. Selon Campos et al. 2008, les fibres alimentaires totales doivent être comprises entre 0,3 et 20 g/100 g de poids sec de pollen [1]. La teneur en fibres alimentaires a été rapportée par quelques études. Par exemple, une étude récente sur le pollen d'abeilles slovène a montré une fourchette de 10 à 21,4 g/100 g du poids sec de avec 73 à 82 % de fibres brutes [104]. Des chercheurs brésiliens ont rapporté une moyenne de 3,6 ± 1,4 g/100 g de poids sec de pollen [101]. Le pollen d'abeilles Colombien a été caractérisé et les résultats ont montré une moyenne de 14,5 ± 3,5 g/100 g de poids sec [121], tandis qu'El-Kazafy a enregistré que différents pollens d'abeilles d'Egypte présentaient une plage de 0,15±0,01 à 1,70±0,02 g/100 g de poids sec de pollen [97]. La teneur en fibres alimentaires peut varier selon l'origine botanique et les méthodes utilisées lors de l'hydrolyse.

IV.4.1.6 Lipides

L'Homme utilise de nombreuses voies de biosynthèse pour synthétiser les lipides mais certains lipides sont essentiels et ne peuvent pas être apportés par biosynthèse et doivent être consommés dans l'alimentation quotidienne. Les acides gras essentiels (notamment les acides gras type oméga-3) sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques et jouent un rôle important dans la prévention des maladies inflammatoires et cardiovasculaires et des tumeurs hormono-dépendantes [122,123]. En effet, le pollen d'abeilles peut être une excellente source de ces composés car ils sont cruciaux pour la production de gelée royale [124]. La fraction lipidique est la plus attractive pour les abeilles, c'est pourquoi les plantes ayant des pollens avec une

grande concentration de lipides sont plus visitées [87]. Selon Campos et al, la teneur en lipides est comprise entre 1 et 13 g/100 g [1]. Alors que De-Melo et Almeida-Muradian, ont signalé que la fraction lipidique totale peut atteindre 22g/100g de poids sec de pollen [2]. Dans le même contexte, Thakur et De-Melo et al. ont rapporté une énorme variation de la teneur en lipides dans le pollen d'abeilles monofloral de différents pays ; tels que le pollen d'abeilles *Brassica napus* du Brésil, de Chine, d'Inde et de Grèce qui ont montré une teneur totale en lipides de 7,4 %, 6,6 %, 12,38 % et 7,76 % respectivement, le pollen d'abeilles de Ciste d'Italie, d'Espagne et de la Grèce a montré une teneur totale en lipides de 1,9 %, 7,2 % et 3,80 % respectivement. Le pollen d'abeilles de *Cocos nucifera* d'Inde et du Brésil présentait 10,43 % et 4,6 à 5,1 % de la teneur totale en lipides [2,124].

Le profil lipidique du pollen d'abeilles est à peine étudié alors que la plupart des études de recherche se sont concentrées sur la teneur en protéines, glucides et antioxydants. Selon Ares et al., les caroténoïdes, les stéroïdes et les acides gras sont les principaux constituants de la fraction lipidique totale du pollen d'abeilles [125,126]. Une étude menée par Li et al. sur trois échantillons de pollen d'abeilles monofloral en provenance de Chine a suggéré la présence de neuf classes de lipides dont les triglycérides et les acides gras [127].

Le profil des acides gras du pollen d'abeilles varie entre les acides gras saturés qui comprennent principalement les acides mystérique, stéarique et palmitique, et les acides gras insaturés qui comprennent les acides oléique, linolénique (oméga-3) et linoléique (oméga-6) . Cette fraction est la plus dominante dans le pollen d'abeilles [94,124,126,128–130]. D'autres classes de lipides tels que les phospholipides, les triterpènes (acides oléanoléique et ursolique) et les stérols végétaux (β-sitostérol) ont été isolés du pollen d'abeilles en plus petite quantité [86,126,131]. Toutes ces études ont rapporté que la teneur en lipides du pollen d'abeilles étudié dépend de l'origine botanique, de la saison de récolte, du séchage, du stockage et des méthodes d'apiculture.

IV.5 Micronutriments

Les micronutriments comprennent des minéraux et des vitamines qui ne participent pas à l'équilibre énergétique, mais sont essentiels à toutes les réactions chimiques nécessaires au maintien de la vie. Les micronutriments sont nécessaires en petites quantités, à l'organisme pour sa croissance et son développement de la naissance à la vieillesse. Dans leurs rapports, la plupart des organisations de l'alimentation et de la santé ont estimé que plus de deux milliards de personnes dans le monde souffrent d'une carence en micronutriments due à un apport insuffisant ou à une mauvaise absorption des vitamines et des minéraux. En général, la carence en

micronutriments est considérée comme un problème de santé mondial pour toutes les tranches d'âge. Pendant la grossesse, cette carence a un effet dévastateur sur la santé de la mère et de son fœtus, notamment l'anémie, l'hypertension, le diabète gestationnel, les troubles thyroïdiens, les complications obstétricales et l'échec de la croissance et du développement du fœtus [132–136]. Au cours de l'enfance, l'insuffisance en micronutriments peut affecter le développement mental et physique des enfants et augmenter la vulnérabilité et l'exacerbation des maladies, telles qu'une altération de la défense de l'hôte et des infections, des troubles du développement, l'autisme, des troubles oculaires et une perte générale d'énergie [137–139]. La population âgée est également vulnérable aux carences en micronutriments et peut entraîner de nombreuses maladies liées à l'âge telles qu'un léger déclin cognitif, un risque élevé de diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires, des infections respiratoires aiguës, en particulier une infection à coronavirus, et des déficiences de la fonction immunitaire [140–143]. Il est maintenant évident que le maintien de l'équilibre des macros et micronutriments peut assurer une bonne protection contre les pathologies précitées, et qui peut être garantie par la consommation d'une grande variété d'aliments riches en micronutriments.

IV.5.1.1 Minéraux

L'alimentation humaine, contient une vingtaine de minéraux qui représentent un caractère essentiel classés en macroéléments et microéléments également appelés oligo-éléments. La carence en bioéléments dans un organisme entraîne de nombreux troubles métaboliques et peut causer de graves anomalies du développement et peut augmenter la morbidité et la mortalité.

Le pollen d'abeilles est une bonne source de minéraux indispensables au développement des abeilles et de l'Homme aussi et représente 2% à 6% de son contenu avec environ 25 éléments présents, ce qui fait de cet aliment un bon complément nutritionnel alternatif.

Le potassium (K) étant le principal élément minéral présent dans le pollen en quantité importante (400 – 2000 mg/100g de pollen) 15g de pollen couvre jusqu'à 25% de l'apport journalier recommandé (AJR) de cet élément (2000 mg/jour). Le phosphore (P) est le deuxième élément minéral présent dans le pollen (0.80–6 mg/100g de pollen) qui couvre 16% de l'AJR (1000 mg/jour) pour 15 g de pollen. Le troisième élément important est le magnésium (Mg ; 20 – 300 mg/100g de pollen) qui couvre jusqu'à 23% de l'AJR de cet élément (350 mg/jour). Le calcium (Ca) aussi est largement présent dans le pollen (20 – 300 mg/100g de pollen) et qui couvre 7% de l'AJR (1100 mg/jour) en calcium. Ces éléments sont connus par leur rôle crucial dans la construction du tissu osseux en maintenant une pression osmotique adéquate du sang ainsi que des fluides cellulaires. Le Fer (Fe), Zinc (Zn), cuivre (Cu) et Manganèse (Mn) sont

aussi des microéléments présents en quantité importante dans le pollen et 15g couvrent jusqu'à 37%, 79%, 36% et 85% de l'AJR respectivement. Ces oligo-éléments jouent un rôle important dans la formation du sang et aussi dans la croissance, le développement et la reproduction.[1, 2, 5, 63, 63, 124,144–147].

Ils existent d'autres minéraux dits éléments trace tels que le cobalt (Co) le sélénium (Se), Molybdène (Mo) et le bore (B) qui ont été identifiés dans des pollens de différents pays. Un apport suffisant en ces éléments trace est nécessaire pour favoriser la santé des os et du cerveau, ils jouent un rôle clé dans le maintien de la structure des vitamines, la reproduction, le métabolisme des hormones thyroïdiennes, la synthèse de l'ADN et la protection contre les dommages oxydatifs et les infections [2,148–150].

Le sodium (Na) est un macroélément présent dans le pollen apicole mais sa teneur reste inférieure à 2 g/kg avec un ratio K/Na élevé ,ce ratio rend cet aliment utile pour les régimes avec un bon équilibre électrolytique. [2].

IV.5.1.2 Vitamines

Les vitamines sont une classe de nutriments ou de composés organiques essentiels pour l'organisme (non synthétisés par les humains) à l'exception des vitamines D, K et de la biotine (B_7), où la vitamine D est synthétisée dans l'organisme par irradiation des stérols de la peau par les rayons UV, la biotine et la vitamine K sont présentes dans certains aliments (K_1) mais aussi peuvent être synthétisées par la flore intestinale humaine (K_2). Les vitamines dites essentielles doivent donc être ingérés à partir de l'alimentation pour prévenir les troubles métaboliques liées aux carences vitaminiques car elles jouent un rôle majeur dans la synthèse des cofacteurs vitaux, des enzymes et des réactions métaboliques à base de coenzymes [151–153].

Le pollen d'abeilles est considéré comme étant une « bombe à vitamine» en raison de la présence de presque toutes les vitamines avec une moyenne de 0,02 à 0,7 % de son contenu, avec une quantité beaucoup plus importante de vitamines hydrosolubles que liposolubles. [126,154]. Le Tableau 2 résume les différentes vitamines identifiées dans différents échantillons de pollen d'abeilles avec les différentes espèces florales et origines géographiques.

Tableau 2: Différentes vitamines isolées à partir du pollen apicole

Vitamines identifiées	Origine géographique	Origine florale	Méthodes utilisées	Références
A, B1, B2, B5, B6, B7, B12, C, E, et K2	Turquie	*Pollen* monoforal de *Rhododenronponticum*	HPLC-FLD HPLC-UV	[155]
β-Carotène Vit. C	Portugal	*Pollen polyfloral: Rubus spp., Castanea, sativa, Cytisus spp., Quercus spp, Echium spp, Prunus spp., Leontondon spp., Eucalyptus spp., Erica spp., Cistusspp., Trifolium spp.*	Essai par (NH4)2SO4 pour β-Carotène AOAC pour la vitamine C	[156]
B2, B3, B6, B9	Italie	Pollen polyfloral : *Prunus ; Erica* ; *Brassicaceae ; Rubus* ; *Viburnum Viburnum* ; *Trifolium pratense ; Asteraceae T.* ; *Eucalyptus ; Rosa Sp.*	Spectroscopique Fluorescence (analyse de bulk)	[157]
B1, B2, B6	Brésil	Pollen polyfloral : *Arecaceae ;Cecropia ; Cestrum ;Cyperaceae ;Eucalyptus ; Ilex ;Myrcia ; Piper ; Vernonia ; Trema*	HPLC	[158]
B3 (Niacin); B6 (Pyridoxine) B9 (Folic acid) B12 (Cobalamine)	Arabie Saoudite	Pollen monofloral : *Alfalfa ; Date palm ; Rape ; Summer squash; Sunflower*	HPLC	[128]
C; E; Provit. A (β-carotene)	Brésil	ND	Vit C : AOAC Vit E : HPLC β-carotène: OCC	[159]

- ***Vitamines hydrosolubles***

le groupe B (thiamine (B1), riboflavine (B2), PP ou niacine (B3), acide pantothénique (B5), pyridoxine (B6), biotine (B7) et acide folique (B9) et la cobalamine (B12)) représente la classe des vitamines hydrosolubles la plus identifiée dans le pollen apicole (Tableau 2) [65,128,157,158,160] . La vitamine C ou L-acide ascorbique est faiblement identifiée en raison de sa détérioration par les prétraitements thermiques [80].

Les vitamines solubles dans l'eau, comme le type complexe B, ne sont pas normalement stockées en quantités importantes dans l'organisme, ce qui nécessite un apport quotidien de ces vitamines ;le pollen d'abeille pourrait être une des sources potentielles de ces vitamines. Ce groupe de vitamines joue un rôle clé dans l'immunité de l'hôte, la dermatologie, la production d'énergie cellulaire (B1, B2), elles facilitent la production d'acides aminés, améliorent leur

métabolisme (B6) et aident l'organisme à convertir les glucides en glucose (B3 ou PP). l'insuffisance en vitamines hydrosolubles due à la malnutrition peut être à l'origine de certaines pathologies métaboliques, et aussi nerveuses [153,161,162].

- ***Vitamines liposolubles***

Le pollen d'abeilles contient des vitamines liposolubles telle que la vitamine D, K, E et A (β-Carotène) avec des quantités faibles et variables en fonction de l'origine botanique et de la saison du collecte [58,60,124].

La famille des vitamines E est communément appelée tocochromanols (tocophérols et tocotriénols), le pollen contient en particulier le groupe des tocophérols (α tocophérol, β-tocophérol, γ-tocophérol et δ tocophérol) avec une dominance du α et γ-tocophérol [106,163], la vitamine K_2 (Menaquinone-4) , et deux types de la vitamine A (β-carotène, rétinol) ont été aussi détectés par Bayram et *al.*[155]. Malgré que il y a pas d'études d'identification de la vitamine D, répertoriée dans la littérature internationale, Campos, Komosinska-Vassev et Khalifa et al. ont cité la présence de la vitamine D dans leurs articles. [58, 164,165]. Les vitamines liposolubles jouent un rôle essentiel dans une multitude de processus physiologiques comme la vision, la santé des os, la fonction immunitaire et la coagulation [166].

IV.5.2 Caroténoïdes

Les caroténoïdes correspondent à un groupe très diversifié de polyènes de couleur jaune à rouge et sont responsables des couleurs dans de nombreux produits agricoles dérivés de plantes et jouent un rôle important dans la santé humaine [147]. Dans le pollen apicole la β-carotène est la plus identifiée dans cette classe. La β-carotène se transforme en vitamine A qui peut être ainsi nommé une provitamine A. La β-carotène est considérée comme vitamine antioxydante avec des effets bénéfiques sur la santé humaine (anti-tumorale, anti-leucémique, bénéfique contre les maladies cardiovasculaire , etc..) [167], d'autres travaux ont identifié d'autres caroténoïdes telles que, la lutéine et la cryptoxanthine, la zeaxanthine, la β-cryptoxanthine et l'α-carotène. les teneurs totales en carotène sont très variées en raison des différences climatiques et de l'origine botanique du pollen [94,168].

Comme dans le cas de tous les composés phytochimiques du pollen, la composition des vitamines varie selon l'origine botanique, la saison de récolte (conditions climatiques) et la méthode de séchage et de stockage. Cependant, il a également été rapporté que certains composés (vitamines A et C) pourraient être perdus lors du traitement thermique du pollen d'abeilles , car ces composés sont instables à haute température [1,2,63,106,125,159,160,164].

IV.6 Autres constituants du pollen d'abeilles

IV.6.1 Les probiotiques

Le mot « Probiotique» est une expression de l'ère moderne, qui signifie « pour la vie » et est utilisé pour nommer l'association bactérienne avec des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale [169].le comité d'expert de la FAO /OMS en 2001 les définissent comme "micro-organismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés en quantités suffisantes, améliorent la santé de l'hôte en ayant une action équilibrante sur la flore intestinale" [170] .

Avant de parler des probiotiques il faut d'abord comprendre que le tractus gastro-intestinal humain est colonisé par plus de 2 000 espèces distinctes de bactéries, en plus des archées, des champignons, des eucaryotes microbiens et des virus, qui existent dans une relation symbiotique les uns avec les autres et avec leur hôte humain. Cette collection hétéroclite de microbes est appelée microbiote, alors que leur matériel génétique est connu sous le nom de microbiome. Le microbiote intestinal agit comme un régulateur essentiel de la digestion via la synthèse, l'extraction et l'absorption de nombreux métabolites, tels que les lipides, les acides aminés, les vitamines et les acides biliaires. Il agit aussi comme agent antibactérien vivant contre la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries exogènes et pathogènes soit par changement des ressources du milieu soit par synthèse de substances bactéricides. Le microbiote intestinal joue un rôle primordial dans la maturation et le fonctionnement du système immunitaire [171–174,174]. Ainsi la dysbiose est un état où la flore intestinale elle-même est modifiée qualitativement et quantitativement. Elle est considérée comme facteur de nombreuses maladies chroniques et dégénératives telles que le syndrome du côlon irritable, l'intestin inflammatoire ou la polyarthrite rhumatoïde.[175].

Les probiotiques se sont avérés utiles pour l'Homme contre ; le diabète type 2, l'obésité, l'inflammation, les tumeurs, l'allergie, les affections nerveuses, les pathologies métaboliques comme le déséquilibre de la cholestérolémie et les infections parasitaires et virales [176–179]. De point de vue nutritionnel, seules les souches classées comme bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus* et *Bifdobacterium* sont significatives. Avec ce savoir, les probiotiques sont devenu un ingrédient important et viable dans les aliments fonctionnels, élargissant l'application des probiotiques dans les industries pharmaceutiques des suppléments alimentaires [169,176,180,181].

IV.6.2 Probiotiques de pollen

Tout au long de l'histoire, le pollen apicole a été considéré comme un aliment complet avec de nombreuses vertus thérapeutiques, pour cela il a toujours fait l'objet de plusieurs et diverses

études biochimiques et microbiologiques. Ces dernières concernaient non seulement la qualité microbiologique du pollen apicole mais aussi l'identification des bactéries responsables de la fermentation du pollen frais en pain d'abeille à l'intérieur des ruches, cette transformation est postulée comme étant le résultat d'une fermentation lactique par des bactéries et des levures. La première étude ayant pour but de comprendre le mécanisme de transformation du pollen frais en pain d'abeille a reporté que ce processus passe par quatre phases ; la première dure 12 heures se caractérise par le développement d'un groupe hétérogène de micro-organismes comprenant des levures. Dans la deuxième phase, les bactéries lactiques anaérobiques de la famille des *Streptococcus* utilisent les facteurs de croissance produits par les levures et les bactéries putréfiantes et abaissent le pH du pollen. La troisième phase se caractérisée par la disparition du *Streptococcus* et le développement de *Lactobacillus* qui produisent plus d'acide que le *Streptococcus*. La quatrième phase, qui a débuté à la fin du septième jour de la récolte, est caractérisée par la disparition des bactéries lactiques et de certaines levures en raison de la grande quantité de production d'acide lactique [182].

Patrice Percie du Sert propriétaire de « Pollenergie » propose dans son livre «les pollens apicoles» que les abeilles élèvent des ferments lactiques dans le nectar emmagasiné à l'intérieur de la ruche, ce nectar riche en bactéries va être utilisé pendant leur vol pour coller les grains de pollen sur leurs pattes antérieures, ce qui explique la présence des bactéries lactiques dans le pollen fraîchement récolté [65] . Plusieurs études ont démontré que Les abeilles mellifères et les bourdons semblent avoir une faune bactérienne intestinale simple qui comprend des bactéries acidophiles essentiellement la famille des *Lactobacillus* telles que les *Lactobacillus kunkeii, Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcu slactis*, *Pediococcus acidi lactici*, *Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus ingluviei* et *Weissella cibaria* [183–186,186,187]. Il est bien clair maintenant que cette faune bactérienne propre de l'abeille est à l'origine des ferments présents dans le pollen apicole frais.

Des études *in vitro* ont confirmé l'effet de ces souches isolées du pollen frais contre des bactéries pathogènes Gram-positif et Gram-négatif via la production de substances antibactériennes comme les acides organiques et les bactériocines qui peuvent être utilisées pour la lutte contre les pathologies infectieuses chez l'Homme [183,188,189]. Les souches isolées du pollen et du pain d'abeilles sont caractérisées par une bonne tolérance aux faibles pH et aux sels biliaires, l'hydrophobie élevée et l'auto-agrégation, font de ces bactéries de bons candidats pour une application en tant que nouveaux probiotiques dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique [190]. Une autre étude récente a pu isolé des bactéries dites « bactéries de

l'acide lactique fructophiles » qui se caractérisent par l'utilisation du fructose comme substrat de croissance et ne se trouvent que dans des niches d'abeilles riches en fructose [191].

IV.6.3 Composés volatils du pollen d'abeilles

Le contenu en composés volatils du pollen est très rarement étudié. Deux études récentes effectuées sur des échantillons de provenance de la région de la mer Baltique ; la lithuanie, la Chine et l'Espagne ont révélé la présence de presque 42 composés volatils différents, essentiellement le nonanal, dodecane, tridecane, hexane, 6-methyl-5-hepten2-one, acide méthylbutanoique, limonène et le Styrène [192,193], ces composés présents essentiellement dans les fleurs et agissent dans le comportement d'attraction des pollinisateurs [194]. Dans deux autres études (Grèce et Pologne) , les résultats montrent que le profil volatil du pollen d'abeilles était principalement dominé par les aldéhydes, suivi par des cétones, des terpénoïdes et des quantités mineures d'autres composés volatils comme le furfural [195,196]. Comme nous avons vu pour toute la composition du pollen d'abeilles (sauf dans le cas des probiotiques), la composition volatile du pollen d'abeilles dépend de son origine botanique ainsi les différences de compositions quantitatives et qualitatives des composés volatils démontrent la diversité d'origine florale des échantillons testés. Cependant, la situation géographique, les conditions climatiques et les espèces d'abeilles jouent également un rôle important dans la formation du profil aromatique du pollen d'abeilles [80,193] .

V. Profil phénolique et pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles

V.1 Composés phénoliques

En tant que produit naturel, le pollen d'abeilles a suscité un grand intérêt scientifique en raison de ses propriétés bénéfiques [197]. Fait intéressant, les composés bioactifs peuvent contrecarrer l'installation et/ou le développement de différentes maladies [198]. Par conséquent, la détermination du profil phénolique du pollen d'abeilles est considérée comme la première étape de la normalisation et de la standardisation de ce produit selon les critères de qualité dressés par les différentes législations internationales. L'analyse de la composition du pollen d'abeilles a révélé que la teneur en polyphénols présentait en moyenne 3% à 5% de leur composition et cela dépend de son origine botanique [199], le Tableau 3 regroupe les différentes molécules antioxydantes isolées à partir du pollen par différentes méthodes.

D'une part, les acides phénoliques du pollen d'abeilles représentent en moyenne 0,19 % de sa composition, leurs propriétés sont principalement liées à leur structure. Les acides phénoliques pourraient être divisés en acides benzoïque, acide phénylacétique et acide cinnamique. Le dernier groupe est d'un plus grand intérêt et exerce une bonne activité antioxydante par rapport

aux autres groupes [198]. Les principales molécules d'acides phénoliques sont l'acide chlorogénique, l'acide gallique, l'acide cinnamique, l'acide férulique [156], l'acide hydroxycinamique, l'acide coumarique (Figure 17).

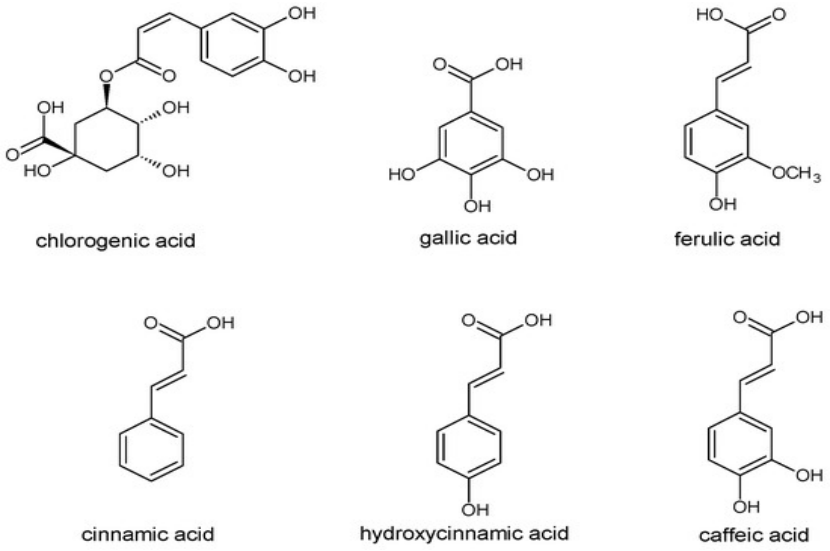


Figure 17: Structure des acides phénoliques du pollen d'abeilles
[200]

D'autre part, Les flavonoïdes constituent le groupe de composés le plus important parmi les polyphénols présents dans le pollen d'abeille avec une moyenne de 0.25 % et 1.4 % de sa composition totale. Leur structure chimique est caractérisée par la présence d'un cycle diphénylpropane (C6-C3-C6) avec un squelette benzo-γ-pyrone (Figure 18). Les flavonoïdes constituent un bon critère de qualité du pollen d'abeilles [201].

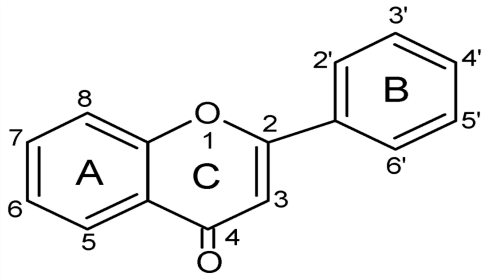


Figure 18: Structure basique des flavonoïdes [200]

Sept groupes de flavonoïdes ont été distingués en raison de leur structure chimique : les flavones, les flavonols, les flavanons, les flavanes, les isoflavones et rarement les anthocyanes et les chalcones (Figure 19).

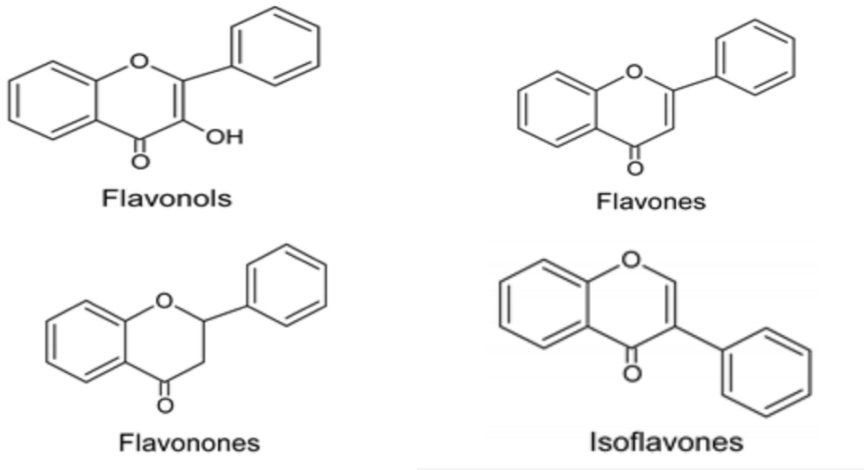


Figure 19: Structure des différents flavonoïdes du pollen d'abeilles [200]

Les flavonoïdes sont présents dans le pollen principalement sous forme de glycosides, c'est-à-dire des flavonoïdes associés à un sucre, tels que les glycosides de flavonol présents en plus grande quantité. Cependant la présence de liaisons glycosides diminuent l'activité antioxydante des flavonols à cause des effets stériques, la raison pour laquelle le contenu du pollen d'abeilles en flavonoïdes libres est un bon critère de qualité [202,203]. Les principaux flavonols identifiés dans le pollen d'abeilles sont ; la quercétine, le Kaempférol, et la rutine. Les principaux flavones sont représentés par l'apigénine, la chrysine et la lutéoline, les flavanons sont représentés par ; la naringenine et la pinochombrine. Tandis que la génistéine est le majeur isoflavones identifié dans le pollen d'abeilles [200]

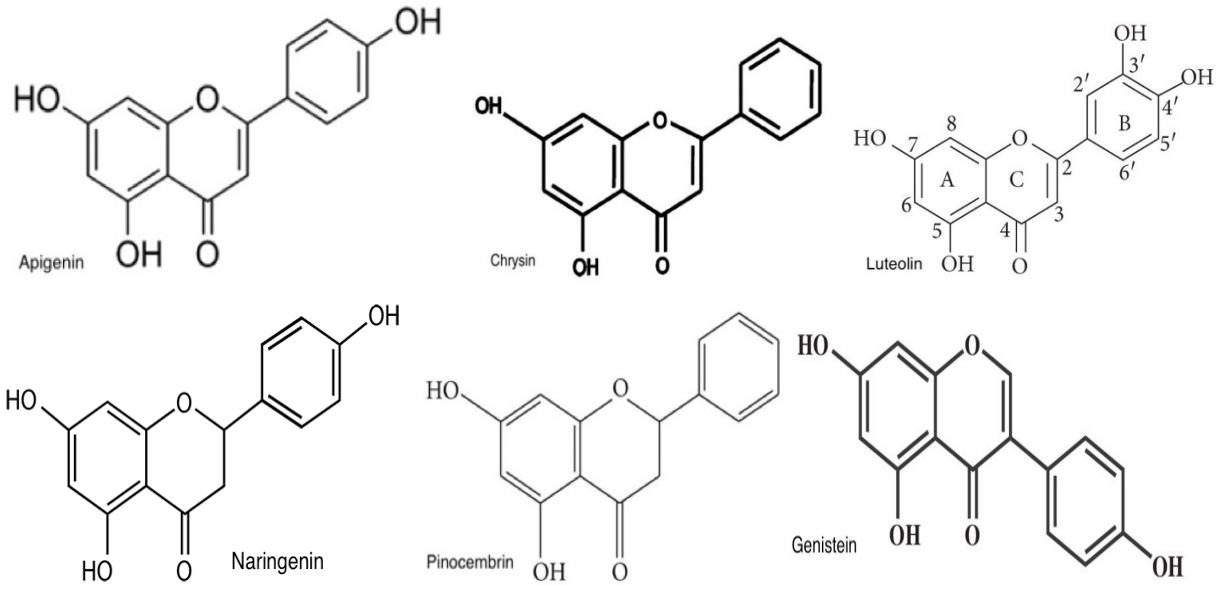


Figure 20: Structure des principaux flavonoïdes du pollen d'abeilles [200]

Ares et *al.* ont détecté le polyphénol le plus le fameux de la famille des stilbènes ; le résveratrol produit par les plantes comme métabolite secondaire de défense contre le stress biotique et

abiotique (Figure21) [204]. Le résveratrol et ses composés dérivés sont connus pour leurs effets hautement bénéfiques pour la santé humaine grâce à ses propriétés protectrices contre le vieillissement cellulaire, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antioxydantes et antimicrobiennes [205].

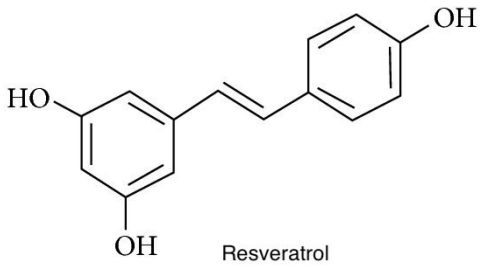


Figure 21: Structure chimique du résveratrol [205]

Tableau 3: Tableau récapitulatif des différentes méthodes utilisées pour la détermination des différentes molécules actives du pollen

Origine du pollen	Techniques	Composés phénoliques	Références
Turquie	HPLC-PDA	Acide gallique, acide 3,4-hydroxy-benzoïque, (+)-catéchine1,2-dihydroxy-benzène, acide syringique, acide caféique, rutine trihydratée, acide p-coumarique, acide trans-férulique, Apigénine 7 glucoside, resvératrol, quercétine , Acide trans-cinammique, Naringénine, Kaempférol, Isorhamnétine	[197]
Turquie	HPLC-DAD	Acide rosmarinique, Vitexine, Hyperoside, Pinocembrine, Trans-chalcone, Apigénine, Acide protocatéchuique, Galangine	[199]
Portugal	UHPLC-DAD-ESI-MS	acide coumaroylquinique, myricétine-O-rutinoside, lutéoline-O-dihexoside, quercétine-O-dihexoside, myricétine-O-hexoside, myricétine-O-(malonyl)rutinoside, isorhamnétine-O-dihexoside, quercétine-O-hexosyl-pentoside , quercétine-O-rutinoside isomère 1, quercétine-O-rutinoside isomère 2, lutéoline-di-O-hexosyl-rhamosíde, quercétine-O-(malonyl)rutinoside, isorhamnétine-O-rutinoside, hydroxybenzoyl myricétine, quercétine-O-(malonyl)hexoside, dérivé de quercétine, quercétine-O-rhamnoside, isorhamnétine-O-(malonyl)hexoside isomère 1, lutéoline-O-(malonyl)hexoside, myricétine,	[156]

		isorhamnétine-O-(malonyl)hexoside isomère 2, myricétine-O- acide dihydroféruloylprotocatéchuique, isomère 2 de l'acide myricétine-O-acétylhydroxybenzoylprotocatéchuique 1, myricétine-O-acétylhydroxybenzoylprotocatéchuique isomère 2, quercétine-O-acétylhydroxybenzoylprotocatéchuique isomère 1, myricétine-O-acétylhydroxybenzoylhydrobenzoïque isomère 1, -O-acétylhydroxybenzoyl acide hydrobenzoïque isomère 1, quercétine-O-acétylhydroxybenzoyl hydro acide benzoïque isomère 2, O-dihydroxybenzoylacétylmalonyl acide coumarique	
Chine	UPLC-ESI-QTOF-MS/MS	Isorhamnétine 3-O-diglucoside, sorhamnétine-3-O-coumaroyl glucoside, Isorhamnétine-3-O-6-O-acétyl-β-D-glucopyranosy, Kaempférol-3-O-néohespéridoside, N′ ,N″,N ‴-tricaffeoyl spermidine, N′ ,N″,N‴-Dicaffeoyl p-coumaroyl spermidine, N′ ,N″,N‴-Di-p-coumaroylcaffeoyl spermidine, N′ ,N″,N‴-Tri-p-coumaroyl spermidine	[201]
Chili	HAPLC-DAD	Acide syringique, acide coumarique, acide sinapique, acide férulique, acide cinnamique, acide abscissique, catéchine, myricétine, quercétine, apigénine, kaempférol, narigénine, rhamnétine	[202]
Brésil	HPLC	Acide gallique, acide 4-hydroxyphénylacétique, rutine, resvératrol, myricétine, Quercétine-3-O-glucopyranoside, kaempférol-3-O-glucoside, Kaempférol-3-O-rutinoside, Naringenine, Quercétine, Phlorétine, Kaempférol	[203]
Maroc	HPLC/DAD/ ESI-MS^n	Myricétine-3-O-rutinoside, Quercétine-diglucoside, Quercétine-3-O-rutinoside, Kaempférol-3-O-rutinoside, Isorhamnetin-3-O-rutinoside, Isorhamnetin-O-pentosylhexoside, Kaempférol-diglucuronide, Isorhamnetin-3- O-glucoside, Quercétine-3-O-rhamnoside, Acide ellagique, N1-p-coumaroyl-N5, N10-dicaffeoylspermidinea, N1, N10-di-p-coumaroyl-N5-caféoylspermidine, Lutéoline, Quercétine-3-méthyl-éther , N1, N5-di-p-coumaroyl-N10-caféoylspermidine, N1, N5, N10-tri-pcoumaroylspermidine, N1, N5, N10-tri-	[206]

		pcoumaroylspermidine, N1, N5, N10-tri-pcoumaroylspermidine, N1, N5, N10 -tri-pcoumaroylspermidine	
Romanie	HPLC-DAD	Acide gallique, acide protocatéchuique, acide p-hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide caféique, acide chlorogénique, acide p-coumarique, acide rosmarinique, myricétine, lutéoline, quercétine, kaempférol	[207]
Italie	UHPLC-ESI-QTOF-MS	Cyanidine 3-O-xyloside/arabinoside, Delphinidine 3-O-(60 '-p-coumaroyl-glucoside), Petunidine 3-O-arabinoside, Pelargonidine 3-O-glucoside, Delphinidine 3-O-glucoside, Delphinidine 3-O -glucosyl-glucoside, Delphinidine 3-O-rutinoside, Cyanidine 3-O-sophoroside, Naringin 60-malonate, Naringin 40-O-glucoside, Naringenin 7-O-glucoside, Apigénine 7-O-(60'-malonyl-apiosyl -glucoside), Tétraméthylscutellaréine, Lutéoline 7-O-glucuronide, Apigénine 6-C-glucoside, Kaempférol 3-O-glucuronide, Quercétine 3-O-rutinoside, Kamepférol 3,7-O-diglucoside, Quercétine 3-O-galactoside 7 -O-rhamnoside, Quercétine 3-O-rhamnosyl-galactoside, Kaempférol 3-O-sophoroside, 3,7-Diméthylquercétine, Dihydroquercétine, Formononétine, Génistine, Ester éthylique d'acide gallique, Acide syringique, Acide caféique 4-O-glucoside, Caffeoyl glucose, Feruloyl glucose, Acide caféique, Sésamol, Hydroxytyrosol 4-O-glucoside, Curcumine, Acide carnosique	[208]
Colombie	UHPLC-DAD	Acide caféique, acide férulique, acide S-N1,5,10-tri-férulique isorhamnétine, kaempférol, lutéoline, myricétine, acide p-coumarique, acide SP-N1,5,10,14-tétra-p-coumarique, pinobanskin, quercétine, spermidine, spermine, acide 4-méthylgallique, apigénine, amentoflavone, N1-caffeoyl-N5,10-di-p-coumaroyl-spermidine, N1,10-di-pcoumaroyl-N5-caffeoyl-spermidine.	[94]
Espagne	LC-ESI-MS	Esidues trans-resveratrol r, cis-resveratrol, resveratrol cis-piceid	[204]

V.2 Pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles

Le stress oxydatif est impliqué dans le développement de plusieurs pathologies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, le cancer, l'athérosclérose [209]. L'utilisation de produits

naturels tels que les produits de la ruche dont le miel, le pollen, la gelée royale et la propolis comme source de molécules antioxydantes a été soutenue et suggérée pour protéger les cellules humaines contre les effets dévastateurs du stress oxydant [210]. Pour explorer les activités antioxydantes du pollen d'abeilles plusieurs recherches ont été menées sur différents types de pollen de différentes origines géographiques en utilisant les techniques bien connues telles que les tests DPPH, ABTS, β-carotène, FRAP, ORAC, NO et TAC. Le Tableau 4 résume les études qui ont évalué l'activité antioxydante du pollen d'abeilles, et présente l'origine du pollen, le type d'extrait, les méthodes utilisées et les principaux résultats obtenus. Les résultats dans ce Tableau montrent bien que le pollen d'abeilles est doté d'un pouvoir antioxydant et antiradicalaire remarquable, ceci est important car le pollen d'abeilles serait bénéfique non seulement comme complément alimentaire mais aussi comme aliment fonctionnel.

Tableau 4: Récapitulatif des différentes méthodes utilisées pour l'évaluation du pouvoir antioxydant du pollen d'abeilles

Pays	Extraits	Méthodes	Résultats	Références
Maroc	Extrait aqueux	DPPH	IC_{50} =0,39±0,13 mg/mL	[206]
		Pouvoir réducteur du fer	IC_{50}=0,54±0,53 mg/mL	
		Capacité antioxydante Totale	56,92±0,21 mg EAA/g	
Algérie	Extrait méthanolique	Réduction des ions de molybdate	101,58 ug EAG/g	[211]
Brésil	Extrait éthanolique	DPPH	IC_{50}=140± 5 mmol TE/g	[212]
		ORAC	563± 15 mmol TE/g	
Brésil	Extrait hydro-éthanolique	FRAP	IC_{50}=131,47 ± 75,08 mg GA eq/g	[213]
		DPPH	Activité antioxydante= 72,46 ± 5,25%	
Brésil	Extrait lyophilisé	ABTS	IC_{50}=120,10 ± 0,21 mmol TEAC/g	(Almeida et al, 2017)
		DPPH	Activité antioxydante=54,42 ± 0,23%	

		FRAP	IC_{50}=60,64 ± 0,63 mmol of Fe^{2+}/g	
		dosage du β-carotène/acide linoléique	Activité antioxydante= 91,93 ± 0,22%	
Brésil	Extrait hydro-éthanolique	DPPH	IC_{50}=0,86 mg/mL	[214]
		FRAP	IC_{50}=123,4 mg EGA/100g	
		dosage du β-carotène/acide linoléique	Activité antioxydante= 83,3%	
Chine	Extrait aqueux	DPPH	IC_{50}=2,36 mg/mL	[215]
		Activité chélatrice du superoxydes	IC_{50}=2,29 mg/mL	
Chine	Extrait méthanolique	DPPH	IC_{50}=1,72 mg/mL	[215]
		Activité chélatrice du superoxydes	IC_{50}=3,48 mg/mL	
Chine	Extrait hydro-éthanolique	ABTS	IC_{50}=1,06 ± 0,02 mmol TE g-1	[216]
		DPPH	IC_{50}= 1,28 ± 0,03 mg/mL	
		Pouvoir réducteur	Activité antioxydante= 70,55%	
Chine	Extrait aqueux	DPPH	IC_{50}=119,9 eq/g	[217]
		Pouvoir réducteur	IC_{50}=69 mg/mL	
Égypte	Extrait éthanolique	DPPH	Activité antioxydante= 90%	[218]
	Éther de pétrole	DPPH	Activité antioxydante= 75%	
	Dichlorométhane	DPPH	Activité antioxydante= 63%	
	Extrait d'acétate d'éthyle	DPPH	Activité antioxydante= 79%	
Egypte	Extrait méthanolique	DPPH	Activité antioxydante=59%	[219]
		ABTS	Activité antioxydante=76,51%	

Grèce	Extrait aqueux	DPPH	IC_{50}= 233,3 ± 6,1 µg / mL	[220]
		ABTS	IC_{50}=56,2 ± 0,8 µg / mL	
Italie	Extrait aqueux/méthanolique	ORAC	839,5 ±49,5 µmol TE g-1 DW	[208]
		ABTS	IC_{50}=224,6±18,6 µmol TE g-1 DW	
		DPPH	IC_{50}=134,7 ±4,3 µmol TE g-1 DW	
Korèe	Extrait éthanolique	DPPH	IC_{50}=292,0 ± 13,05µg/mL	[221]
Portugal	Extrait hydro-éthanolique	DPPH	IC_{50}=2,62 ± 0,09 mg/mL	[222]
		Pouvoir réducteur	IC_{50}=6,51 ± 0,30 mg EAG/mL	
Portugal	Extrait méthanolique	DPPH	IC_{50}=3,0 ± 0,7 mg/mL	[223]
		Blanchiment du β-carotene	IC_{50}= 4,6 mg/mL	
Espagne	Extrait méthanolique	DPPH	IC_{50}=2,98±0,47mg/mg	[224]
		TBARS	IC_{50}= 0,35±0,02 mg/mg	
Turquie	Extrait méthanolique	FRAP	IC_{50}=11,77 ± 0,63-105,06 ±0,59 mmol Trolox/g	[225]
		DPPH	IC_{50}= 0,65–8,20 mg/mL	
		CUPRAC	33,1±0,4-91,8 ±1,8mmol Trolox/g pollen	
Turquie	Extrait éthanolique	ABTS	IC_{50}=0,373 ± 0,015-5,980 ± 0,100 mg TEAC/g	[64]
		DDPH	IC_{50}=1,293 ± 0,031-3,85 ± 0,030 mg TEAC/g	
Turquie	Fraction extractible	CUPRAC	6,25-64,88 µmol TE/g	[226]
		ABTS	IC_{50}=6,20-38,20 µmol TE/g	
		DPPH	IC_{50}=0,44-22,45 µmol TE/g	
	Fraction hydrolysée	CUPRAC	69,16-192,96 µmol TE/g	
		ABTS	IC_{50}=37,63-80,49 µmol TE/g	

		DPPH	IC_{50}=33,21-62,37 µmol TE/g	
	Fraction bioaccessible	CUPRAC	83,24-257,27 µmol TE/g	
		ABTS	IC_{50}=48,96-111,40 µmol TE/g	
		DPPH	IC_{50}=35,69-83,84 µmol TE/g	
Turquie	Extrait méthanolique	CUPRAC	0,02 ± 0,02 - 0,24 ± 0,04 mmol Trolox/g	[227]
		FRAP	IC_{50}=8,69 ± 1,64 - 84,89 ± 10,09µmol $FeSO_4,7H_2O$/g	
		DPPH	SC_{50} =0,47 ± 0,51 - 0,84 ± 0,17 mg/mL	
Pologne	Extrait éthanolique	DPPH	IC_{50}=57,515 ± 5,290 µl/mL	[198]
		ABTS	IC_{50}= 0,692 ± 0,012 mmol Trolox/g	
Pologne	Extrait digéré à la pepsine	DPPH	IC_{50}=178,093 ± 11,670 µl/mL	[198]
		ABTS	IC_{50}= 0,303 ± 0,003 mmol Trolox/g	
Pologne	Extrait digéré à la pepsine	DPPH	IC_{50}= 20,912 ± 0,821 µl/mL	[228]
		ABTS	IC_{50}= 1,752 ± 0,024 mmol Trolox/g	
		DPPH	Activité antioxydante=91,3%	
		Activité anti radicalaire anti Hydroxyle	Activité antioxydante=98,0%	
Malaisie	Extrait éthanolique	DPPH	Activité antioxydante=39%	[229]
Serbie	Extrait méthanolique	ABTS	Activité antioxydante=95,5%	[230]
		FRAP	IC_{50}=0,738	
Serbie	Extrait éthanolique	ABTS	Activité antioxydante=75%	[230]

		FRAP	IC_{50}= 0,485	
Slovaquie	Extrait éthanolique	DPPH	Activité antioxydante= 47,97±0,29-50,46 ± 0,43%	[231]
Slovaquie	Extrait méthanolique	ABTS	IC_{50}= 0,83 ± 0,10-2,08 ± 0,25 mg/l	[232]
		DPPH	Activité antioxydante entre 25,96 ± 1,61 et 93,69 ±5,80%	
	Extrait aqueux	DPPH	Activité antioxydante entre 19,66 ± 1,06 et 50,29 ± 3,05%	
Slovaquie	Extrait éthanolique	DPPH	Activité antioxydante= 70,05± 17,17%	[233]
		Pouvoir réducteur	3575,56±749,04µg,mL−1	
Thaïlande	Extrait éthanolique	DPPH	IC_{50}= 40,69± 3,01 mg EAG/g extract	[234]
Thaïlande	Extrait aqueux	DPPH	IC_{50}= 21,27± 2,63 mg EAG/g extract	[234]
Bosnie et Herzégovine	Extrait méthanolique	DPPH	IC_{50}=1,43 ± 0,00mg/g	[235]
		FRAP	IC_{50}= 4,111 ± 0,136 mmol Fe^{+}/g	
		ABTS	Activité antioxydante=86,13 ± 2,28%	

VI. Propriétés thérapeutiques du pollen d'abeilles contre les pathologies liées au stress oxydatif

L'utilisation du pollen d'abeilles en médecine est datée des anciens temps et est attestée par des livres des médecins arabes et juifs comme Ibn el-Beithar, et Maïmonide au début des années 1100, qui décrivaient le pollen comme aphrodisiaque , sédatif, efficace pour l'estomac, le cœur et les intestins [57,236].

VI.1 Propriétés antioxydantes du pollen d'abeilles

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes de défense antioxydants (balance : oxydants/antioxydants), qui conduit à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS interagissent avec différentes molécules cytoplasmiques, telles que les protéines, les lipides membranaires et l'ADN [237]. Par

conséquent, cette interaction induit de graves dommages cellulaires et participe au développement de nombreuses maladies chroniques telles que le diabète et ses complications associées, l'arthrite, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer [238]. Comme nous l'avons vu dans la partie « profil phénolique et capacité antioxydante du pollen d'abeilles » le pollen d'abeilles fait partie des produits naturels riches en antioxydants largement utilisés contre le stress oxydatif et les pathologies associées.

Il a été démontré que l'effet antioxydant du pollen d'abeilles est attribuée à sa teneur en métabolites secondaires, notamment la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les composés phénoliques [239]. Grâce à son groupe hydroxyle phénolique, les flavonoïdes contenus dans le pollen d'abeilles sont capables de piéger les ROS et les radicaux libres, et inactiver les électrophiles [224]. Dans le même contexte, nous avons résumé dans le Tableau 5, les études réalisées sur les effets des principaux composés phénoliques du pollen ainsi que leurs mécanismes d'action impliqués. les résultats de ces études ont montré que l'acide caféique, l'acide cinnamique, la rutine, la quercétine, la lutéoline et la pinocembrine, qui sont des molécules majeures du pollen, peuvent atténuer les dommages engendrées par les ROS et améliorer le statut du stress oxydatif [240–245].

VI.2 Propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiantes

Le diabète sucré est un trouble endocrinien caractérisé soit par une insuffisance de sécrétion d'insuline et/ou par son utilisation défectueuse [246]. L'action antidiabétique et anti-hyperglycémique du pollen d'abeilles a déjà été étudiée. Nema A *et al* ont montré que l'administration de pollen d'abeilles , à une dose de 100 mg/kg PC /jour pendant 4 semaines, réduisait la glycémie et prévenait le dysfonctionnement de l'axe testiculaire hypophysaire [7]. Dans d'autres études, le pollen d'abeilles a présenté une puissante action antidiabétique chez les patients atteints de diabète sucré non insulino-dépendant (DT2) [247]. Grâce à ses constituants bioactifs, le pollen d'abeilles exerce son effet antidiabétique en modulant la capture du glucose et en inhibant les activités α-amylase et α-glucosidase [248]. La rutine, l'apigénine, le Kaempférol, l'acide cinnamique, l'acide ellagique et l'acide protocatéchuique sont les principaux composés phénoliques suspectés être impliqués dans le mécanisme de management du diabète par le pollen d'abeilles (voir Tableau 5). [249–251,251,252].

VI.3 Propriétés hépatoprotectrices

Selon les données de la littérature, l'extrait de pollen d'abeilles possède un puissant effet hépatoprotecteur [253]. Cheng et ses collègues ont rapporté que l'administration de l'extrait de pollen d'abeilles augmentait l'activité de la catalase tissulaire, la SOD, et la GSH-Px et prévenait

les modifications histologiques du foie induites par le traitement au tétrachlorure de carbone (CCL-4) chez la souris, cela suggère l'effet potentiel du pollen d'abeilles contre les changements hépatocellulaires associés à l'exposition aux xénobiotiques. Cet effet est directement attribué à sa composition riche en antioxydants naturels tels que les phénols et les flavonoïdes [254]. Plusieurs composés phénoliques présents dans le pollen ont révélé une action hépatoprotectrice importante confirmée par des analyses biochimiques et des études histopathologiques (Tableau 5), notamment la naringine, l'acide ferulique, l'acide protocatéchuique, l'acide caféique et l'acide ellagique [255–259].

VI.4 Propriétés néphroprotectrices

En raison de sa richesse en molécules bioactives, le pollen d'abeilles possède une puissante action néphroprotectrice. Il a été constaté que l'extrait de pollen peut améliorer les paramètres biochimiques (créatinine et bilirubine), augmenter le système de défense antioxydant (SOD, CAT et GSH), diminuer les marqueurs du stress oxydatif (MDA et iNOS) et empêcher les modifications histologiques rénales causées par la cisplatine chez le modèle de rat [206,260]. L'effet néphroprotecteur du pollen d'abeilles semble être lié à son contenu en molécules actives ayant des propriétés protectrices au niveau rénal tel que l'apigénine, l'acide protocatéchique, la naringine, l'acide ferulique, l'acide ellagique, la pinocembrine et le Kaempférol (voir Tableau 5) [261–265].

VI.5 Propriétés antibactériennes du pollen d'abeilles

Grâce aux probiotiques, le pollen d'abeilles frais possède une activité antibactérienne importante contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Cette action antibactérienne est due à la capacité des bactéries acido-lactiques du pollen à désactiver les enzymes bactériennes, altérer la perméabilité membranaire, ou encore par destruction du matériel génétique bactérien. [65,266].

Non seulement les probiotiques, mais aussi les composés phénoliques du pollen d'abeilles possèdent un effet antibactérien important. Les études bactériologiques menées sur le pollen apicole ont toutes révélé une corrélation positive entre le contenu en composes phénoliques et l'activité antibactérienne du pollen. Les dérivées de la spermidine largement identifiées dans le pollen possèdent un effet antibactérien considérable. Les flavonoïdes isolés du pollen exercent une forte activité contre les bactéries Gram-positives, ce qui a conduit à associer une part importante de cette action à la présence de ces composés. Almeida et ses collaborateurs proposent que plus le degré d'hydroxylation est élevé, plus la toxicité contre les pathogènes est grande. [206,267,268] .

VI.6 Propriété immunomodulatrice du pollen d'abeilles

Les propriétés nutritionnelles du pollen, ainsi que sa capacité à la régulation des processus métaboliques, sont utilisées, entre autres pour les patients atteints d'infections des voies respiratoires supérieures telles que la pneumonie ou encore les sujets atteints de la leucémie, ils sont autorisés à consommer systématiquement du pollen comme agent immunostimulant pour une récupération plus rapide [269]. Les recherches sur la relation entre consommation du pollen et statut immunitaire ont été nombreuses. Dudov, ZeedanKh. et leurs équipes dans leur expérience sur des lapins nourris par le pollen d'abeilles ont démontré que ce dernier était un immunomodulateur puissant. Il a stimulé la réponse immunitaire humorale (augmentation significative de la production des anticorps) et a modifié la réaction d'hypersensibilité de type retardé [80,270,271]. SUN et *al.* a pu montrer que la nourriture des rats avec du pollen d'abeilles de colza a augmenté l'activité des phagocytes et a inhibé l''hypersensibilité immédiate [272]. D'autres chercheurs ont montré une amélioration des paramètres sanguins et une augmentation significative des organes lymphatiques (La bourse de Fabricius, thymus, rate,…) dans, les modèles expérimentaux [154,273,274].

Le pollen possède aussi des propriétés antiallergiques malgré le fait que le pollen dispersé dans l'air est connu pour provoquer des réactions allergiques. Dans des expériences immunologiques *in vitro* et *in vivo* il s'est avéré que le pollen d'abeilles peut provoquer une diminution de la production des IgE par inhibition des mastocytes médiées par les IgE (expériences sur des rats sensibilisés au IgE ou immunisés par l'ovalbumine), l'inhibition de la production des médiateurs inflammatoires (TNF), l'inhibition de la dégranulation des mastocytes ou encore l'inhibition de la migration cellulaire vers les poumons et l'activation des éosinophiles dans le cas du choc anaphylactique [58,275,276]

Ces observations ont été expliquées par la présence des composé phénoliques, des phytostérols et des composés volatils [80]. Le pollen apicole via ses flavonoïdes tels que Le kaempférol, la quercétine, les flavones et la lutéoline peut inhiber la production d'histamine, des médiateurs de l'inflammation (leucotriènes, prostaglandine, interleukines), des facteurs de stimulation des granulocytes/macrophages, diminuer le taux de calcium intracellulaire et inhiber la phosphorylation de la protéine kinase C dans les mastocytes humains. La mercytine inhibe la migration cellulaire vers la cavité pulmonaire [277,278].

VI.7 Propriétés hémato-protectrices

De part sa composition nutritionnelle et phénolique, le pollen d'abeilles est connu pour sa capacité à renforcer les vaisseaux sanguins, la rutine largement présente dans le pollen

augmente la flexibilité des vaisseaux sanguins et empêche leur déformation.[279]. Le contenu en micronutriments notamment le fer, le magnésium, l'acide folique, la vitamine C et la vitamine B du pollen d'abeilles, lui confèrent un effet prononcé sur le système hématopoïétique, dans le cas de l'anémie, particulièrement l'anémie ferriprive (rappelons le rôle du fer dans le maintien de l'hémoglobine et le transport de l'oxygène aux cellules cibles). Ainsi le pollen d'abeilles augmente le nombre de globules rouges et blancs et aussi améliore le taux d'hémoglobine [280–282]. Le contenu du pollen en acides gras libres (oméga-3,α-ALA), (précurseurs de la prostaglandine-3 impliqué dans le processus de l'agrégation plaquettaire) est associé au soutien de la fonction hématopoïétique[126].

VI.8 Propriétés anticancéreuse du pollen d'abeilles

Depuis très longtemps, les propriétés anticancéreuses du pollen d'abeilles ont été évaluées, et plusieurs études ont été réalisées dans ce contexte [10,283–285]. Dans ces études, les différents types de pollen examinés ont montré une capacité à inhiber les cellules cancéreuses utilisées *in vitro.* Prenons l'exemple du pollen apicole issu de la Corée du Sud qui ont montré un effet inhibiteur important contre les cellules de la lignée d'adénocarcinome de la prostate humain (PC-3), le carcinome pulmonaire humain (NCI-H727) et (A549) [221]. Une autre étude a montré une forte activité inhibitrice du pollen contre les cellules du cancer bronchique de la lignée ChaGo-K1 [286,287]. Le pollen apicole a été toujours utilisé par nos ancêtres pour calmer les douleurs dues à l'inflammation de la prostate non bactérienne lors d'une hyperplasie bénigne de la prostate chez les sujets âgés grâce à la diminution des niveaux de PGE_2, d'IL-8, de MDA et de NO, et l'augmentation des niveaux des enzymes antioxydantes endogènes (GSH, de GPx, de SOD et de CAT) [80,288].

Les effets antitumoraux du pollen impliquent sa richesse en flavonoïdes, principalement la quercétine, l'isorhamnétine, l'apigénine, la rutine, la chrysine et le Kaempférol connues pour leur effet antioxydant, anti-inflammatoire, et antiprolifératif. les flavonoïdes exercent une double action : dans les conditions normales; ils agissent comme des antioxydants naturels, et dans le cas pathologique ils sont de puissants pro-oxydants au niveau des cellules cancéreuses, ils déclenchent les voies apoptotiques et régulent négativement les voies de signalisation pro-inflammatoires [289–291]. Les polysaccharides sont des polymères jouant un rôle clé dans la réponse antitumorale des produits naturels [292]. Dans une étude réalisée par Wang et *al.* la fraction purifiée des polysaccharide du pollen monofloral a montré (*in vitro*) une activité antiproliférative contre les cellules cancéreuses du côlon humain HT-29 et HCT116 [10]. Les

caroténoïdes, la vitamine C et E son aussi impliqués profondément dans l'activité antitumorale et anticancéreuse du pollen d'abeilles [60].

Tableau 5: Récapitulatif des différentes molécules antioxydantes présentent dans le pollen et leurs effets pharmacologiques.

Molécules	**Dosage, voie d'administration et durée de traitement**	**Propriétés Pharmacologiques**	**Mécanismes impliqués**	**Références**
Acide caféique	6 mg/kg/jour, 45 jours par voie orale	Propriétés antioxydantes	↑Antioxydants non enzymatiques, ↓taux de peroxydation lipidique et ↓TBARS.	[244]
Acide cinnamique	20 mg/kg/jour, pendant 40 jours, par voie intrapéritonéale		↓Peroxydation lipidique, ↓production de ROS, ↑GSH, ↑SOD et ↑CAT.	[241]
Acide férulique	25 mg/kg/jour, pendant 10 jours, par voie orale		↓Peroxydation lipidique, ↓taux de ROS et ↓activité N-acétyl-β-glucosminidase.	[293]
Acide ellagique	10 and 30 mg/kg/jour pendant 40 jours, par voie orale		Améliore la concentration des niveaux d'antioxydants enzymatiques (SOD, CAT et GPx), et ↓ MDA, ↓TNF-α et ↓IL-1β.	[294]
Quercétine	50 mg/kg/jour, pendant 21 jours, par voie i,p		Augmente le niveau de GSH, l'activité SOD, GR, GP et CAT et diminue l'expression de TNFα, IL-1β et IL-6.	[242]
Kaempférol	100 mg/ kg/jour, pendant 6 semaines, par voie i,p.		Inhibe l'activité des voies de signalisation ASK1/MAPK (JNK1/2 et p38).	[295]
Galangine	8 mg/kg/jour, pendant 45 jours, par voie i.p		↓Peroxydation lipidique, ↑antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.	[296]

Chrysine	30 mg/kg/jour, par voie orale, pendant 14 jours.		↑GSH, ↓ TBARS, ↓XO et ↓NADPH	[297]
Acide Protocatechuique	100 mg/kg/jour, par voie i.p, pendant 7 jours.		Prévient la peroxydation lipidique et la formation de NO, améliore les enzymes antioxydantes.	[298]
Apigénine	0.625, 1.25, et 2.5 mg/mL.		↓stress oxydatif, ↑taux de GSH ↑activité de la SOD, ↓taux d'IL-6 et ↓NF-ϰB.	[299]
Lutéoline	100 et 200 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		↓MDA, ↑GSH, ↑SOD ↑GPX ↑Nrf2 et HO-1.	[240]
Rutine	50 et 100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 20 jours.		↑Production d'enzymes antioxydantes, ↓marqueurs de toxicité sérique et régulation négative de (COX, 2p38-, MAPK, i-NOS et NF-ϰB).	[243]
Naringenine	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 8 semaines.		Minimise le stress oxydatif et améliore les niveaux de CAT, SOD GSH et GPx.	[300]
Pinocembrine	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 7 jours.		Diminue le stress oxydatif, les marqueurs apoptotiques et inflammatoires.	[245]
Résveratrol	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 30 jours.		Équilibre le statut oxydant-antioxydant.	
Acid caféique	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 4 semaines.	Propriétés antidiabétiques et anti-hyperglycémiques	↓ IL-6, ↓ IL-1β, ↓ TNF-α, ↓ MCP-1, ↓HbA1c, ↓ UGA, ↓ sorbitol, ↓ fructose et ↑AMPKα2.	[301]
Acide ferulique	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 15 jours.		Régulation négative de la voie NF-ϰB.	[302]
Acide cinnamique	50 mg/kg/jour, par voie orale		↑sécrétion d'insuline, ↑glycolyse hépatique, ↑sécrétion de l'adiponectine ↑capture	[249]

	pendant 5 semaines.		du glucose, ↑fonctionnalité des cellules β pancréatiques et ↓glycation des protéines.	
Acide Ellagique	250 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		↑ sécrétion d'insuline, ↑ nombre de cellules β, ↑ antioxydants plasmatiques totaux et ↑ d'intolérance au glucose.	[303]
Quercétine	10 et 30 mg/kg/jour, i.p pendant 14 jours.		↑GLUTs, ↑IR-P, ↑ GLUT4, ↑ Capture de glucose, ↑synthese de cellules pancréatiques, ↑ activité glucokinase et ↓ activité α-glucosidase.	[304]
Kaempférol	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 12 semaines. 200 mg/kg/jour, par voie orale pendant 14 jours.		↓production hépatique de glucose, ↑ activité hexokinase, ↓ activité du pyruvate carboxylase hépatique et néoglucogenèse. ↑GLP-1 et libération d'insuline, ↑ taux intracellulaires d'cAMP et de Ca2+.	[250,305]
Galangine	4, 8 et 16 mg/kg/jour, par voie orale pendant 45 jours.		Inhibition de la DPP-4, ↓ du stress oxydant et ↑ du statut antioxydant.	[296]
Chrysine	40 mg/kg/jour, par voie orale pendant 16 semaines.		Inhibition de la voie du TNF-α, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et ↓taux de peroxydation du glucose et des lipides.	[306]
Acide protocatechuique	50 et 100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 7 jours.		↑sensibilité à l'insuline, ↓résistance à l'insuline, ↓ gluconéogenèse et ↑ capture du glucose.	[251]
Apigénine	1,5 mg/kg/jour, i.p pendant 28 jours.		Amélioration de la translocation des GLUT4.	[252]

Lutéoline	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 24 semaines.		Réduit le stress oxydatif et inhibe la voie STAT3.	[307]
Rutine	90 mg/kg/jour, par voie orale pendant 10 semaines.		Inhibition de la voie des polyols, du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique.	[308]
Naringenine	50 et 100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 6 semaines.		Amélioration du métabolisme du glucose et des lipides, et ↓ résistance à l'insuline.	[309]
Pinocembrine	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 10 jours.		↓ NF-ϰB et TNF-α.	[310]
Résveratrol	12 mg/kg/jour, par voie orale pendant 15 jours.		Régulation négative de la voie NF-ϰB.	[302]
Acide caféique	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 4 jours.	Propriétés hepato-protectrices	Régulation négative du CYP2E1 et protection de l'ADN contre les dommages oxydatifs.	[255]
Acide cinnamique	20 mg/kg/jour, par voie orale pendant 10 jours.		↓NF-kB et ↓iNOS	[311]
Acide ellagique	5 et 10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 10 jours.		Régulation positive de l'expression de Nrf2 et HO-1 et inhibition de la voie de signalisation NF-ϰB.	[256]
Quercétine	20, 40 et 80 mg/kg/jour, par voie orale pendant 7 jours.		Modulation de l'expression des récepteurs nucléaires (CAR, PXR) et des enzymes du cytochrome P450 (CYP1A2, CYP2E1, CYP2D22, CYP3A11).	[312]
Kaempférol	20 mg/kg, deux fois par jour, par voie orale pendant 28 jours.		↓ de l'activité de CYP2E1 et ↓ production des ROS.	[313]

Galangine	15, 30 et 60 mg/kg/jour, par voie orale pendant 15 jours.		Activation de Nrf2 et de la voie de signalisation de HO-1.	[314]
Chrysine	25 ou 50 mg/kg, par voie orale pendant 6 jours.		Diminution de l'expression du COX-2, et du iNOS.	[315]
Acide Ferulique	25, 50 et 100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 7 jours.		↓ l'expression TNF-α et IL-1β, régulation positive de p-JNK, p-p38 MAPK et Bcl-2.	[259]
Acide Protocatechuique	25 et 50 mg/kg/jour, i.p pendant 7 jours.		↓ ROS ↑ enzymes antioxydantes	[263]
Apigénine	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 3 semaines.		Améliore les mécanismes de défense antioxydante et diminue la peroxydation lipidique.	[258]
Lutéoline	100 mg/kg/jour, i.p pendant 7 jours.		Modulation de la voie Nrf2/HO-1 et du stress oxydatif.	[316]
Rutine	20 mg/kg/jour, par voie orale pendant 15 jours.		↑Profil antioxydant et régulation de l'activité Na+/K+ ATPase.	[317]
Naringenine	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 10 jours.		↑ taux d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, ↓ niveaux de NO, TNF-α et IL-6.	[257]
Pinocembrine	50 et 75 mg/kg/jour, i.p pendant 10 jours.		Modulation de la voie de Nrf2/HO-1 et NQO1.	[264]
Résveratrol	50 et 100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		Modulation de la voie SIRT1 et p53.	[318]
Acide caféique	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 14 jours.	Propriétés néphroprotectrices	Améliore les systèmes de défense antioxydants et réduit la peroxydation lipidique.	[319]
Acide Ferulique	50 mg/kg/jour, par voie orale		Modulation des voies de AGEs, MAPKs (p38 and	[320]

	pendant 8 semaines.		JNK) et NF-ϰB, et ↓ stress oxydant.	
Acide cinnamique	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 7 jours.		↑ GSH, SOD, CAT et GPx	[321]
Acide ellagique	10 mg/kg/jour, par voie orale pendant 30 jours.		Stimule l'expression du protéine SIRT1, ↓P53, ↓ROS et ↑ antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.	[262]
Quercétine	10 mg/kg/jour, i.p pendant 10 semaines.		↑ antioxydants et ↓peroxidation lipidique.	[322]
Kaempférol	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		Inhibe la voie inflammatoire médiée par RhoA/Rho Kinase.	[265]
Chrysine	30 et 100 mg/kg, ip pendant 26 jours.		↑ Niveaux de iNOS, PKC, AGE et RAGE.	[323]
Acide protocatechuique	25 et 50 mg/kg/jour, i.p pendant 7 jours.		↓ ROS ↑ enzymes antioxydantes.	[263]
Apigénine	3 mg/kg/jour, i.p pendant 7 jours.		Réduit les niveaux de COXI et COXII, MDA et augmente le niveau de GSH.	[261]
Lutéoline	10 et 20 mg/kg/jour, par voie orale pendant 4 semaines.		Inhibition de la voie RIP140/NF-κB.	[324]
Rutine	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 14 jours.		Supprime l'activation de NF-ϰB et la signalisation TGF-β1/Smad3.	[325]
Naringenine	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 45 jours.		↓ Niveaux de stress oxydatif et de peroxydation lipidique.	[326]
Pinocembrine	50 et 75 mg/kg/jour, i.p pendant 10 jours.		Modulation des voies Nrf2/HO-1 et NQO1.	[264]

Résveratrol	20 mg/kg/jour, par voie orale pendant 40 semaines.		Modulation de la voie de signalisation NF-ϰB.	[327]
Acide caféique	50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 21 jours.	propriétés anti-inflammatoires	inhibition de la voie de signalisation NO, prostaglandine E2 et NF-ϰB.	[328]
Acide ferulique	100 mg/kg/jour, par voie orale pendant 6 semaines.		Inhibition de la voie NADPH oxydase et NF-ϰB.	[329]
Acide cinnamique	60 mg/kg/jour, par voie orale pendant 21 jours.		Régulation négative des voies de signalisation NLRP3, NF-ϰB et ASK1/MAPK.	[330]
Acide ellagique	1, 3, 10 et 30 mg/kg, i.p pendant 5 heures.		Suppression de la voie NF-ϰB et de l'activité NO, TNF-α, IL-6, COX-2 et PGE2.	[331]
Quercétine	1 mg/kg/jour, par voie orale pendant 15 jours.		Régulation négative de la voie NF-ϰB.	[332]
Kaempférol	2 et 4 mg/kg/jour pendant 10 jours.		Diminue la synthèse de l'IL-1β, du TNF-α, de l'IL-18 et de l'IL-6.	[333]
Galangine	50 mg/kg par jour, par voie orale pendant 4 jours.		Inhibe l'expression de l'iNOS, de la COX-2 et des cytokines pro-inflammatoires.	[334]
Chrysine	40 mg/kg/jour, par voie orale pendant 16 semaines.		inhibition de la voie de signalisation NO, prostaglandine E2 et NF-ϰB.	[335]
Acide protocatechuique	20 mg/kg/jour, par voie orale pendant 8 semaines.		↓IL-1β, de l'↓IL-6 et du TNF-α.	[336]
Apigénine	20 et 40 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		↓TNF-α et ↓ IL-6.	[337]

Lutéoline	100 mg/kg, i.p pendant 6 heures.		↑HO-1, ↑IL-10, ↓TNF-α et ↓IL-6.	[338]
Rutine	30 mg/kg/jour, par voie orale pendant 14 jours.		Inhibition de la voie p38-MAPK.	[339]
Naringenine	5, 10 et 20 mg/kg/jour, pendant 16 jours.		Régulation positive de la voie Nrf-2/HO-1 et de l'expression de l'ARNm ↓NF-kB.	[340]
Pinocembrine	50 mg/kg/jour, i.p pendant 24 jours.		Régulation négative de la voie de NF-kB.	[341]
Résveratrol	10 ou 50 mg/kg/jour, par voie orale pendant 28 jours.		Inhibition de l'activité de COX-1 and COX-2.	[342]

VI.9 Autres propriétés du pollen d'abeilles

Le pollen d'abeilles possède un large spectre d'effets pharmacologiques et représente un axe prometteur pour les chercheurs qui s'intéressent aux effets thérapeutiques des produits naturels notamment les produits de la ruche. D'autres études ont montré que, grâce à sa richesse en probiotiques, protéines, macro et micronutriments et composés phénoliques, Le pollen apicole riche en probiotiques est démontré pour ces effets positifs sur le développement morphologique (épaisseur de l'épithélium) et fonctionnel (absorption) de l'intestin grêle aboutissant à un bon fonctionnement du système gastro-intestinal [300,343].

Le pollen d'abeilles est connu pour son effet modulateur potentiel sur l'activité sécrétoire (libération du facteur de croissance IGF-I et des hormones stéroïdes progestérone et oestradiol) et l'activité apoptotique de l'ovaire chez le rat. Chez la femme ménopausée atteinte d'un cancer du sein, le pollen d'abeilles peut améliorer les symptômes ménopausiques associés au traitement antihormonal, il s'avère aussi bénéfique pour les femmes qui souffrent des troubles hormonaux liés à la post-ménopause [344,345].

Les composés phénoliques et les ferments lactiques du pollen d'abeilles peuvent prévenir le syndrome métabolique dans sa composante « obésité », via la diminution du gain du poids corporel et hépatique, la diminution de la glycémie à jeun et l'atténuation de l'accumulation des lipides dans le sérum et le foie, ceci est expliqué par la régulation du microbiote et l'atténuation du stress oxydatif [58,346].

Dans plusieurs cultures, le pollen d'abeilles a été longtemps utilisé par les anciennes femmes pour entretenir leur beauté et pour blanchir leur peau. Vu que, plus de 70% de la composition du pollen d'abeilles est biologiquement active, (protéines, glucides, lipides/acides gras, composés phénoliques, et vitamines), les propriétés cosméceutiques du pollen apicole au laboratoire ont été étudiées et les chercheurs ont pu démontrer que le pollen peut booster les mécanismes de protection contre le vieillissement cutané (polyphénols, vitamine E, C), la sécheresse cutanée (sucres et acides gras), les rayons ultraviolets (caroténoïdes), les dommages oxydatifs (polyphénols) , l'inflammation et la mélanogenèse, qui sont impliqués dans un large éventail d'effets négatifs sur la peau humaine. Ceci attire l'attention des cosmétologues à introduire le pollen d'abeilles dans leurs produits de beauté en garantissant une meilleure qualité et fonctionnalité [347–349].

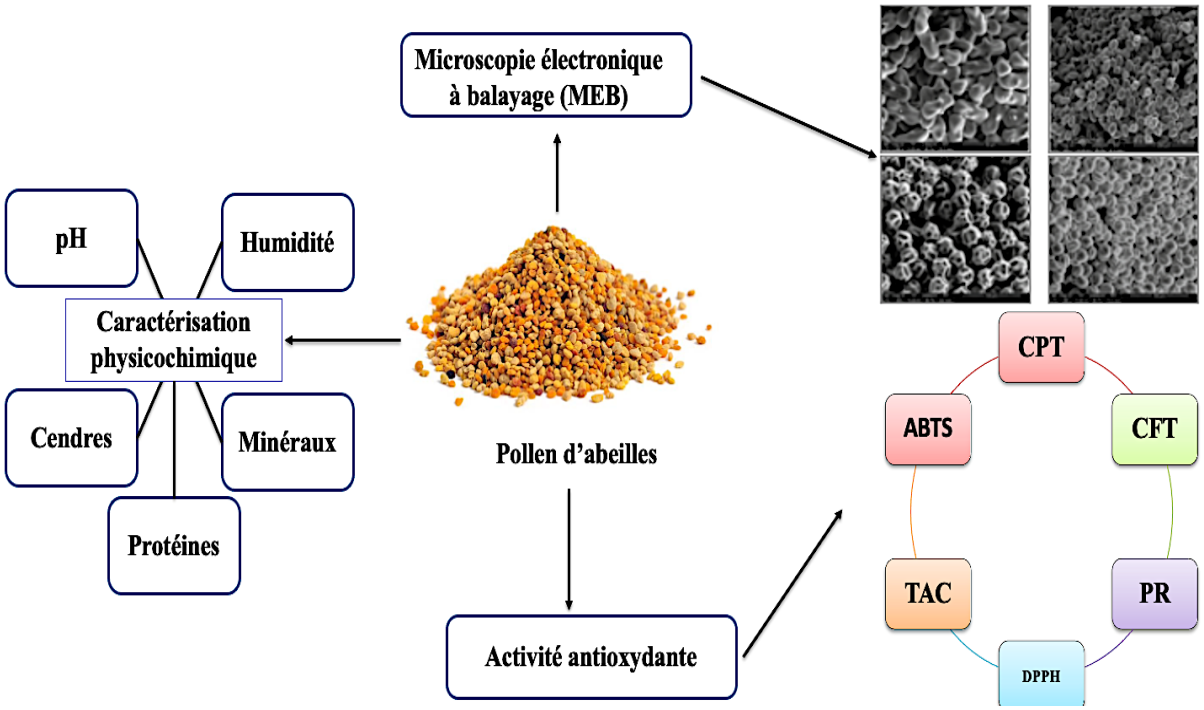
VII. Conclusion

En faisant le résumé des données de littérature, les grains de pollen sont des cellules végétales microscopiques produites par les plantes, et dispersés par plusieurs méthodes dans le cadre du processus de reproduction des plantes. Arrivant à la ruche ces grains de pollens deviennent accessibles pour la consommation humaine en raison de leur composition complète en macronutriments comme les protéines, les glucides, les lipides et en micronutriments comme les minéraux, les vitamines et les composés phénoliques. Cette riche composition confère au pollen d'abeilles un large éventail de propriétés pharmacologiques et biologiques, mais aussi elle limite son utilisation en phyto-médecine en raison de la grande variation de sa composition qui dépend de plusieurs facteurs comme l'origine botanique, les conditions de récolte de traitement et de conditionnement. Pour cela les critères de standardisation du pollen doivent être élargis pour inclure les taux de vitamines et les activités antioxydantes des différents types de pollen. D'une autre part, la richesse et la diversité de la composition du pollen nous mène à le considérer comme une excellente ressource naturelle pour son application avec succès dans la technologie et l'industrie alimentaire.

Chapitre 2 . Pollen d'abeilles monofloral Marocain : Origine Botanique , Caractérisation Physicochimique et activités antioxydantes

Résumé

Objectif : Cette étude a pour objectif de faire la caractérisation physicochimique et l'évaluation des propriétés antioxydantes du pollen Marocain frais. ***Matériel et méthodes*** : Dans cette étude, huit échantillons de pollen d'abeilles monofloral ont été collectés dans différents ruchers du Maroc. L'origine botanique des échantillons de pollen a été déterminée par microscopie électronique à balayage (MEB) et les paramètres physico-chimiques (pH, humidité, cendres et teneur en minéraux) ont été déterminés. Les teneurs totales en phénols, flavones/flavonols ont été évaluées et le potentiel antioxydant a été exploré en utilisant la capacité antioxydante totale, le DPPH, l'ABTS et le test du pouvoir réducteur. ***Résultats*** **:** Les valeurs du pH, d'humidité et de teneur en cendres variaient entre 4,19 ± 0,17 et 4,82 ± 0,36, 10,7 ± 0,04% et 26,8 ± 0,01%, et 1,81 ± 0,10% et 4,22 ± 0,08%, respectivement. Le potassium et le magnésium étaient les minéraux les plus abondants dans les échantillons de pollen d'abeilles ; les métaux lourds n'ont pas été détectés à l'exception de deux échantillons (P5 et P6) où une très faible quantité de plomb a été trouvée. La teneur en protéines de ces échantillons variait entre 19,86 ± 0,36 mg/100 g et 30,32 ± 0,12 mg/100 g de pollen d'abeilles. La teneur en phénols, la teneur en flavones/flavonols et la capacité antioxydante totale étaient de 21,87 ± 1,80 mg EAA/g, 2,37 ± 0,16 mg EAA/g et 6,23 ± 0,21 mg EAA/g, respectivement. Une activité de piégeage élevée des radicaux DPPH et ABTS a été trouvée dans P2 avec une CI_{50} inférieure de 0,245 ± 0,009 mg/mL et 0,19 ± 0,005 mg/mL, respectivement. L'EC_{50} inférieure était de 0,133 ± 0,036 mg/mLtrouvée dans P1 pour le test de du pouvoir réducteur. ***Conclusion :*** La présente étude est considérée comme la première étape vers la standardisation du pollen d'abeilles Marocain.



I. Préface

Actuellement, plusieurs législations définissent le pollen d'abeilles comme étant un 'aliment' ou encore un 'médicament' grâce sa richesse en nutriments essentiels à la survie de l'être humain (sucres, protéines, minéraux, vitamines, etc.) et en composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques, etc.). Cette diversité de composition lui attribue une multitude d'effets thérapeutiques tels que l'effet tonique, antioxydant, antianémique, anticancéreux…etc. [11,63]. Dès qu'il est devenu « alicament » qui désigne aliment + médicament), plusieurs pays comme le Brésil, la Bulgarie, la Pologne et la Suisse ont établit des normes nationales sur leur pollen. D'autres pays comme l'Espagne, ont concentré leurs efforts sur la révision des différentes valeurs fournies et les différentes méthodes utilisées pour l'analyse du pollen en vue de proposer des critères généraux et par conséquent établir une norme mondiale harmonisée pour le pollen [1].

Le Maroc est un pays méditerranéen classé deuxième au monde en termes de plantes et de biodiversité florale avec près de 7000 plantes [350]. L'apiculture est l'un des piliers essentiels du développement de la branche agricole avec une production annuelle de 7960 Tonnes de miel en 2019 et un chiffre d'affaire de 1100 millions de Dirhams (Ministère de l'agriculture 2021) [351], or les autorités de ce secteur ne se concentrent que sur la production du miel, tout en négligeant les autres produits de la ruche comme la gelée royale, la propolis et le pollen d'abeilles (absence de données/chiffres officiels sur la production nationale de ces produits). Ceci est confirmé par Bakour et *al.* dans leur étude réalisée au Nord-central du Maroc où ils ont indiqué que la quasi-totalité de la production apicole dans cette région concerne uniquement le miel (représenté par 89,23% des apiculteurs) alors que seulement 10,77% des apiculteurs collectent le miel et les autres produits de leurs ruches [352]. À notre avis, cette situation est due à un manque de la demande du pollen au marché ce qui peut être expliqué soit par un manque de connaissances des vertus de ce produit chez le consommateur Marocain ou bien un manque des bonnes pratiques de sa collecte et de son stockage et conservation. L'insuffisance d'études scientifiques de caractérisation et de standardisation du pollen d'abeilles comme produit du terroir Marocain peut être un autre facteur favorisant la diminution de sa production et de sa consommation. D'où émane l'objectif de la présente étude qui sera : la caractérisation pour la première fois du pollen d'abeilles Marocain, selon son origine florale, ses propriétés physico-chimiques, son contenu en molécules bioactives, et son activité antioxydante. Ce travail sera la première brique pour le fondement des normes de qualité pour le pollen Marocain en se basant sur les standards des législations internationales.

II. Matériel et méthodes

II.1 Échantillonnage

Dans cette étude, huit échantillons de pollen d'abeilles ont été collectés par des apiculteurs professionnels à partir de différents sites géographiques du Maroc. Chaque échantillon a été analysé juste après sa récolte et le reste a été conservés au réfrigérateur jusqu'à utilisation ultérieure (Tableau 6, Figure 22), Toutes les ruches étaient exemptes d'utilisation de pesticides et de tout agent pathogène.

Tableau 6 : Origine géographique, race d'abeille et période de récolte des échantillons de pollen d'abeilles

	Race	Localisation	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Pluviométrie et température	Année de récolte
P1	*Apis mellifera intermissa*	LARACHE	35,1744° N	6,1474° W	40	1 à 141 mm 6 à 30,6°C	Juin 2015
P2	*Apis mellifera intermissa*	KHENICHAT	34°25‘47"N	5°39‘36"W	32	2 à 77,3 mm 12,4 à 25,7°C	Mai 2016
P3	*Apis mellifera intermissa*	HAD KOURT	34° 62′ N	5° 74′ W	103	2 à 70 mm 12 à 34 °C	Mai 2014
P4	*Apis mellifera intermissa*	KENITRA	34,2541° N	6,5890° W	23	0 à 114 mm 12,2 à 24,8 °C	Novembre 2017
P5	*Apis mellifera intermissa*	FES	34,0181° N	5,0078° W	410	1 à 78 mm 9,9 à 27,2 °C	Avril 2016
P6	*Apis mellifera intermissa*	SEFROU	33,8305° N	4,8353° W	850	3 à 66 mm 7,7 à 25,6 °C	Novembre 2017
P7	*Apis mellifera sahariansis*	ERFOUD	31,4366° N	4,2344° W	807	3 to14 mm 10,2 à 33,3 °C	Août 2017
P8	*Apis mellifera intermissa*	TAZA	34° 12' 36,00" N	4°00'36,00"W	550	2 à 91 mm 9,5 à 28,2 °C	Mai 2017

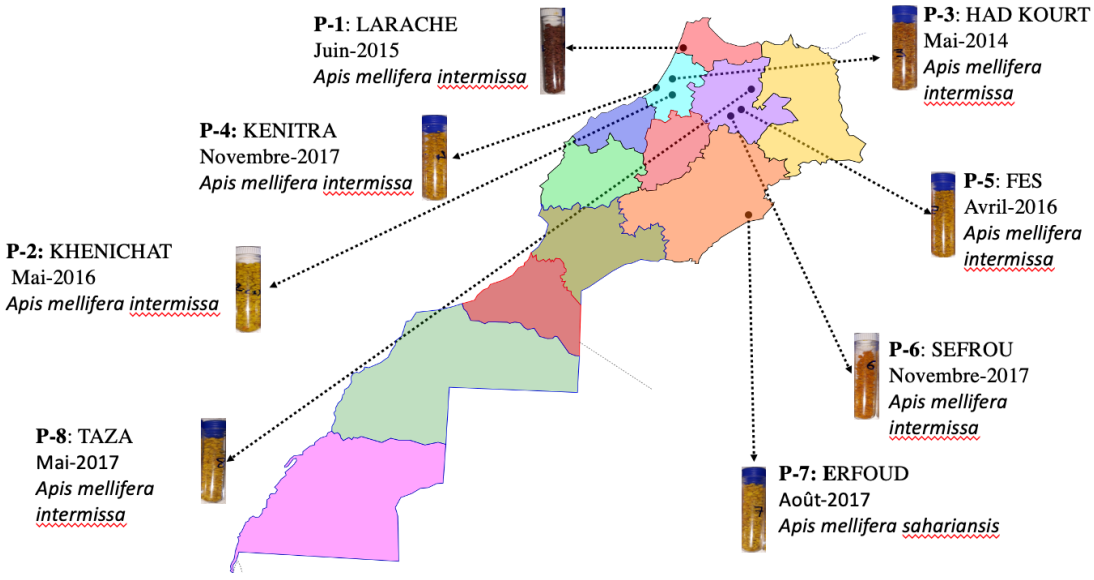


Figure 22: Localisation Géographique des différentes ruchers sur la carte du Maroc

II.2 Étude palynologique par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation en microscope électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour l'analyse palynologique selon le protocole décrit par Almeida et *al.* [353]. Brièvement, 2 g d'échantillons de pollen d'abeilles ont été utilisés pour l'analyse. Les charges de pollen ont été regroupées en sous-échantillons en fonction de leur coloration, chaque sous-échantillon a été placé sur un talon MEB et recouvert d'un ruban adhésif conducteur en carbone. Le pourcentage de chaque grain de pollen a été déterminé à partir d'un total de 350 grains de pollen. Selon Louveaux et al, les termes suivants sont utilisés pour classer les grains de pollen selon leur les pourcentages obtenus : « grains de pollen prédominants » (> 45 % du total) ; « grains de pollen secondaires » (16-45% du total); « pollen mineur important » (3-15 % du total) et « pollen mineur » (<3 % du total) [354].

Les observations par MEB ont été réalisées au centre régional d'innovation universitaire, de l'Université Sidi Mohammed Ben Abdellah de Fès.

II.3 Extraction du pollen

L'extraction a été réalisée par macération d'un gramme de pollen d'abeilles dans 10 mL d'éthanol à 70 % pendant 1 semaine sous agitation, puis la solution a été soniquée pendant 30 minutes par un vibrateur à ultrasons, puis filtrée sur papier filtre Whatman No1, L'extrait obtenu a été conservé à -20°C jusqu'au jour d'analyse [355].

II.4 Pouvoir d'hydrogène pH

La valeur du pH a été déterminée avec un pH-mètre à partir d'une solution de 10 g d'échantillons de pollen d'abeilles dissous dans 40 mL d'eau distillée, Les tests ont été effectués trois fois, et les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD [223].

II.5 Humidité

Trois g d'échantillon ont été pesés et chauffés à 65°C pendant 24 h, Le taux d'humidité a été obtenu par la différence entre le poids initial et le poids final, les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD [121].

II.6 Cendres

La teneur en cendres a été déterminée en utilisant la méthode gravimétrique après incinération dans un four à 550°C, jusqu'à poids constant le résidu a été pesé dans une balance analytique, La détermination de la teneur en cendres a été effectuée en triple et la moyenne a été exprimée en pourcentage ± SD [223].

II.7 Teneur en protéines

La teneur en protéines a été mesurée selon la méthode décrite par Lowry et *al.* [356]. La courbe étalon a été préparée par le standard BSA (Sérum Albumine Bovine), la concentration variait de 0,3 à 300 µg/mL, L'absorbance a été mesurée en 750 contre l'eau distillée comme blanc, l'équation de la courbe d'étalonnage de la BSA était la suivante :

$$y = 3{,}6702x + 0{,}0927,\ R^2 = 0{,}9825$$

L'expérience a été réalisée en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD g /100g de pollen frais.

II.8 Contenu en minéraux

Les minéraux ont été dosés en utilisant les cendres obtenues après incinération et en ajoutant 5 mL d'acide nitrique 0,1M. Le mélange a été chauffé jusqu'à évaporation complète. 10 mL du même acide ont été ajoutés et le mélange a été complété à 25 mL avec de l'eau distillée. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) a été utilisée pour la détermination de 11 éléments (Ca, Na, Fe, K, Mg, Cu, Zn, Al, Ni, Cd, Pb). Les résultats ont été calculés en mg de chaque élément par kg de pollen d'abeilles [223].

II.9 Contenu en polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques dans les échantillons de pollen d'abeilles a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu selon singleton et al. [357]. 50 µL d'extrait hydroéthanolique de pollen d'abeilles ont été mélangés avec 250 µL de réactif de Folin–Ciocalteu (0,2 N), et 200 µL de (75 g/L) Na_2CO_3, L'absorbance a été mesurée à 760 nm après 2 h d'incubation, L'expérience a été réalisée en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD équivalent mg d'acide gallique/g de pollen frais.

II.10 Contenu en flavones et flavonols

La teneur en flavones et flavonols a été quantifiée selon la méthode décrite par Miguel et *al*. [358]. Brièvement, à 50 µl d'échantillon ou d'étalon, nous avons ajouté 200 µl d'$AlCl_3$ (2%), Après 1 heure, l'absorbance a été mesurée à 420 nm, La quercétine a été utilisée comme étalon et la teneur en flavones et flavonols a été exprimée en mg d'équivalent de quercétine par g de pollen frais (mg EQ/g), Les tests ont été effectués en triple et les résultats sont donnés en moyenne ± SD .

II.11 Activité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale (TAC) a été déterminée selon la méthode colorimétrique au molybdate d'ammonium décrite par Prieto et *al.* [359]. En bref, 50 µl d'extrait hydro-

éthanolique de pollen d'abeilles ont été ajoutés à 1 mL de solution du réactif du molybdate (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Le mélange incubé dans un bloc thermique à 95°C pendant 90 min. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 700 nm contre le blanc. L'acide ascorbique a été utilisé comme étalonnage standard, et les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme de pollen d'abeilles.

II.12 Activité antiradicalaire anti DPPH

L'activité de piégeage radicalaire de l'extrait hydro-éthanolique de pollen d'abeilles contre le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été mesurée selon la méthode de Kumazawa et *al* [360].50 µL de l'extrait de pollen ont été ajoutés à 825 µL de solution de DPPH, les mesures d'absorbance ont été lues à 517 nm, après 1 h d'incubation, L'IC_{50} a été calculée sur la base du graphique obtenu par le pourcentage d'inhibition, en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(A0 - A1 \mid A0) \times 100] \quad (1)$$

Les tests ont été effectués en triple et les résultats sont donnés en moyenne ± SD,

II.13 Pouvoir Réducteur

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode décrite par Moreira et *al*. [361]. L'extrait hydro-éthanolique de pollen d'abeilles (50 µL) a été mélangé avec 200 µL du tampon phosphate de sodium 0,2 M (pH 6,6) et 200 µL de ferricyanure de potassium à 1 %, Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min, et 200 µL d'acide trichloracétique à 10 %, 200 µL d'eau distillée et 120 µL de 0,1 % de chlorure ferrique ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. La concentration de l'extrait fournissant 0,5 d'absorbance (CE_{50}) a été calculée à partir du graphique de l'absorbance par rapport à la concentration de l'extrait dans la solution, L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif, Les tests ont été effectués en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD.

II.14 Activité antiradicalaire anti ABTS

L'activité de piégeage du radical $ABTS^+$ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) a été mesurée selon la méthode décrite par Miguel et *al.* [362]. En bref, le radical $ABTS^+$ a été généré par la réaction d'une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec du $K_2S_2O_8$ (2,45 mM) dans l'obscurité pendant 16 h, et en ajustant l'absorbance à 734 nm 0,7 à température ambiante. 50 µL de l'extrait hydro-éthanolique du pollen ont été ajoutés à 825 µL de solution d'$ABTS^+$ et l'absorbance a été mesurée à 734 nm. 5 min après le mélange initial, en utilisant de l'eau comme blanc, l'IC_{50} a été calculée en utilisant le pourcentage d'inhibition de l'ABTS suivant la formule (2) :

$$\% \text{ inhibition} = [(A0 - A1 \mid A0) \times 100] \quad (2)$$

Les tests ont été effectués en triple et les résultats sont donnés en moyenne ± SD.

II.15 Analyses statistiques

Le prisme Graph pad 5 a été utilisé pour l'analyse statistique, des comparaisons d'échantillons de pollen d'abeilles ont été effectuées par ANOVA suivie d'un test de Tukey, et l'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide du Past 3.

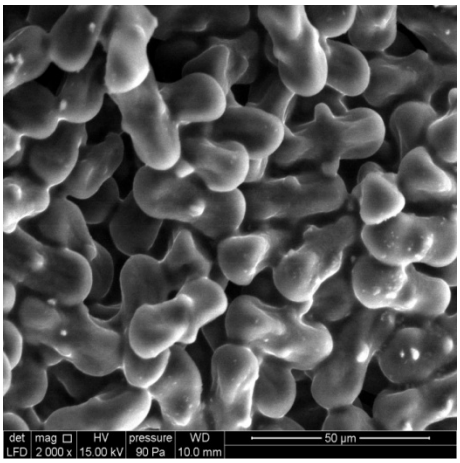
III. Résultats et Discussion

III.1 Identification botanique du pollen d'abeilles par microscopie électronique à balayage

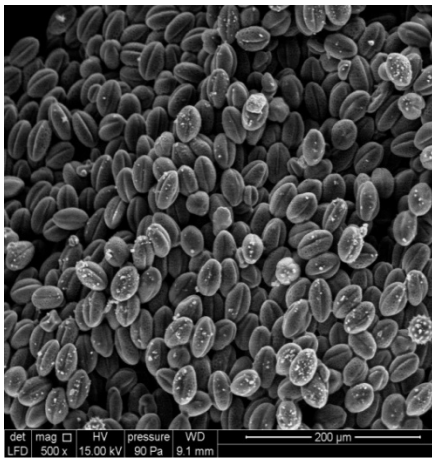
L'analyse par microscopie électronique à balayage des échantillons de pollen d'abeilles est présentée dans la Figure 23 et le Tableau 7. Elle a montré que l'origine botanique de chaque échantillon de pollen d'abeilles, selon ses grains de pollen prédominants était la suivante: L'origine botanique de l'échantillon de pollen d'abeilles de LARACHE était *Coriandrum sativum* (*Apiaceae*) (70%), celle de l'échantillon de pollen d'abeilles de KHENICHAT était *Ulex europaeus* (*Fabaceae*) (73%), celle de l'échantillon de pollen d'abeilles de HED KOURT était *Scorzonera cana* (*Asteraceae*) (77%). L'origine botanique de l'échantillon de KENITRA était *Trifolium pretense* (*Fabaceae*) (76%), celle de l'échantillon de FES était *Ulex europaeus* (*Fabaceae*) (64%), celle de l'échantillon de SEFROU était *Reseda luteola* (*Resedaceae*) (60%). L'origine botanique de l'échantillon d'ERFOUD était *Spiraea salicifolia* (*Rosaceae*) (68%), celle de l'échantillon de TAZA était *Lamium galeobdolon* (*Lamiaceae*) (59%). L'identification du pollen d'abeilles a été réalisée en comparant la morphologie, les tailles et les ornementations des exines du pollen d'abeilles étudié à celles décrites ailleurs [363–369]. Louveaux et al. ont rapporté que lorsque le pourcentage de grains de pollen est > 45% du total des grains, l'échantillon est donc classé comme monofloral [354]. Ainsi, tous les échantillons étudiés ont été classés comme monofloraux, Carpes et *al.* ont montré que la qualité nutritionnelle des grains de pollen rend les abeilles attractives pour une seule source florale [370].

Tableau 7: Analyse palynologique des échantillons de pollen d'abeilles

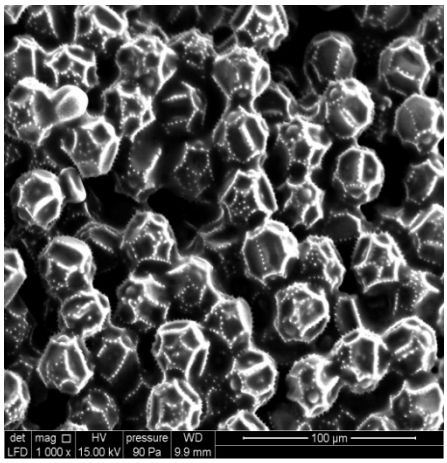
Echantillons	Grains de pollen prédominants	Grains de pollen secondaires	Grains de pollen Mineurs importants	Grains de pollen Mineurs
	(>45%)	**(16-45%)**	**(3-15%)**	**(<3%)**
P1	*Coriandrum sativum* (70%) (Apiaceae)- Coriandre	*Cistaceae*(20%)	*Asteraceae*(7%)	*Cactaceae; Salicaceae; Rutaceae; Rosaceae; Fabaceae; Ericaceae*
P2	*Ulex europaeus* (73%) (Fabaceae)- Ajonc	*Lamiaceae*(17%)	*Rosaceae*(8%)	*Moraceae; Oleaceae; Asteraceae*
P3	*Scorzonera cana* (77%) (Asteraceae)- Scorsonère	*Rhamnaceae* (18%)	*Boraginaceae*(4%)	*Lamiaceae; Poaceae*
P4	*Trifolium pretense* (76%) (Fabaceae)- Trèfle violet	*Lamiaceae* (19%)	*Cistaceae*(5%)	*Boraginaceae;Rosaceae*
P5	*Ulex europaeus* (64%) (Fabaceae)- Ajonc	*Capparaceae*(20%)	*Lamiaceae* (4%) *Rosaceae* (10%)	*Ranunculaceae; Papaveraceae*
P6	*Reseda luteola* (60%) (Resedaceae)- Mignonette sauvage	*Fagaceae* (29%)	*Myrthaceae*(9%)	*Malvaceae; Apiaceae*
P7	*Spiraea salicifolia*(68%) (Rosaceae)- Spirée à feuille de saule	*Apiaceae* (19%)	*Brassicaceae*(6%) *Fabaceae*(5%)	*Asteraceae; Lamiaceae*
P8	*Lamium galeobdolon* (59%) (Lamiaceae)- Lamier jaune/ Ortie jaune	*Ericaceae*(25%)	*Asteraceae*(14%)	*Rutaceae; Liliaceae; Ranunculaceae*



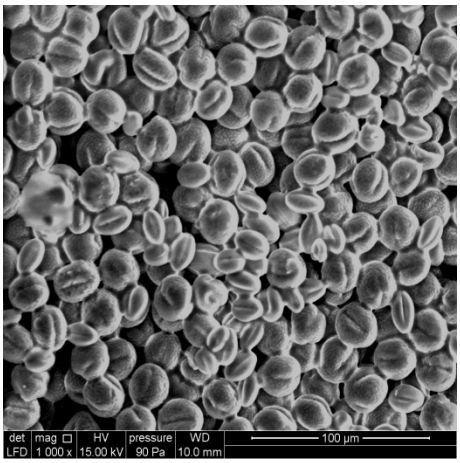
P1*:Coriandrum sativum* (Apiaceae)



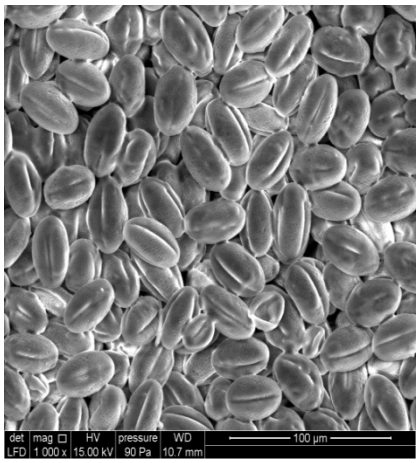
P2:*Ulex europaeus* (Fabaceae)



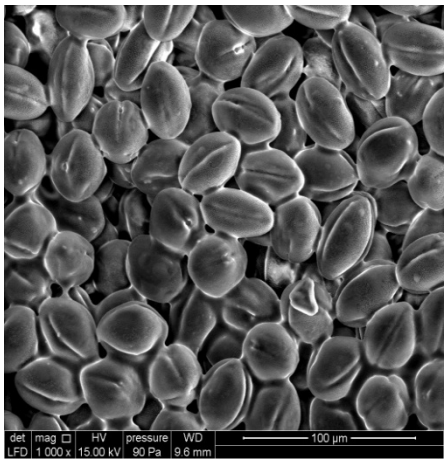
P3: *Scorzonera cana* (Asteraceae)



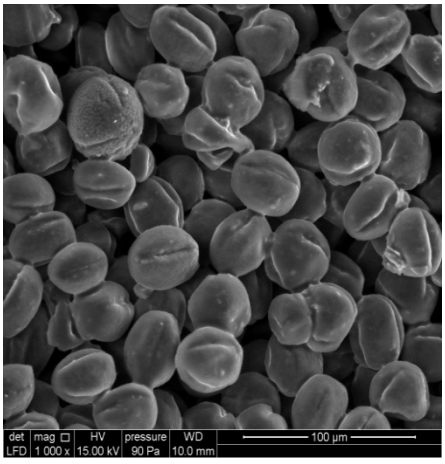
P4: *Trifolium pretense* (Fabaceae)



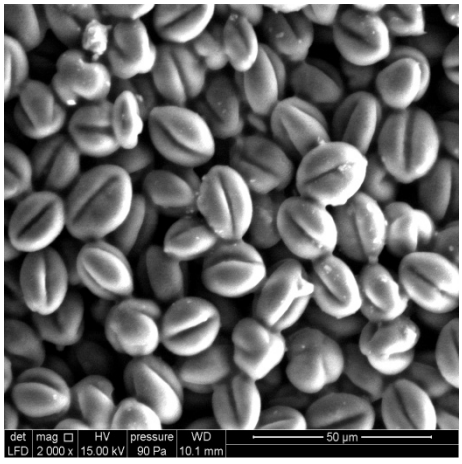
P5: *Ulexe uropaeus* (Fabaceae)



P6: *Reseda luteola* (Resedaceae)



P7: *Spiraea salicifolia*(Rosaceae)



P8: *Lamium galeobdolon* (Lamiaceae)

Figure 23: Micrographies au microscope électronique à balayage (MEB)

III.2 pH

Le pH est un paramètre de qualité simple et facile à évaluer, un pH très bas indique une détérioration bactérienne du pollen d'abeilles en raison de sa forte humidité [1]. Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre tous les échantillons concernant le pH, les valeurs allaient de 4,19±0,17 dans P4, à 4,82±0,36 dans P2 (Tableau 8), cette valeur était similaire à celle trouvée dans le pollen d'abeilles colombien qui ont montré des valeurs de pH comprises entre 3,8 et 5,4 [121]. Nos pollens d'abeilles répondent à la réglementation argentine qui fixait une gamme de pH de 4 à 6[81].

III.3 Humidité

Les résultats de l'humidité sont présentés dans le Tableau 8, L'humidité présente des valeurs comprises entre 10,7 % pour l'échantillon P8 et 26,8 % pour l'échantillon P4, Ces valeurs sont comparables aux résultats présentés dans l'étude Roumaine [371], nos échantillons ont montré une moyenne d'humidité supérieure à celle trouvée par Bobis et *al.*et par Radev [77,372] . Selon Graca et al et Bogdanov[1,66], le pollen d'abeilles frais doit contenir entre 20% et 30% d'eau, cette condition nous a permis de classer nos échantillons comme suit : P1, P3, P4, P5, P6 sont des pollens d'abeilles frais, tandis que P2, P7 et P8 commencent à se déshydrater.

Le pollen d'abeilles frais a une valeur biologique et nutritionnelle plus importante que le pollen d'abeilles séché, tandis que la teneur élevée en eau du pollen d'abeilles frais en fait un milieu de culture idéal pour les micro-organismes, et pour préserver la bonne qualité du pollen d'abeilles, il doit être récolté quotidiennement et stocké sous azote jusqu'à consommation. En revanche, pour le pollen d'abeilles sec, le pourcentage d'humidité doit être inférieur à 6%, pour être conservé pendant15 mois [66].

III.4 Teneur en cendres

Pour les échantillons analysés, la quantité de cendres a montré une différence significative et variait de 1,81 ± 0,10 % dans P6 à 4,02 ± 0,04 % dans P1 (Tableau 8). Nos résultats étaient similaires aux résultats montrés dans ceux du pollen d'abeilles sud-africain [373]. Ces résultats sont conformes aux spécifications réglementaires brésiliennes et argentines qui fixaient un maximum de 4 %[374,375] et la réglementation suisse rapportant une fourchette de 2 et 6 % pour ce paramètre[144]. La teneur en cendres est un paramètre de qualité qui peut être impacté par le type de sol, l'origine botanique et la capacité de la plante à accumuler des minéraux [376,377].

III.5 Teneur en protéines

Le pollen d'abeilles fournit les nutriments nécessaires au développement des organes de l'abeille. C'est la seule et principale source de protéines naturellement disponible pour les abeilles mellifères. Dans cette étude, la teneur totale en protéines des échantillons analysés a été résumée dans le Tableau 8. Les résultats ont montré que les valeurs variaient entre 19,86 ± 0,36 g/100 g dans P7 et 30,32 ± 0,12 g/100 g dans P8. Nos résultats sont en accord avec les standards décrits par Campos et al, et par Bogdanov qui fixaient la teneur en protéines à 10 à 40 g/100g de poids sec de pollen d'abeilles [1,66,144].

Tableau 8 : Analyse du pH, cendres, humidité et protéines du pollen d'abeilles monofloral

Echantillons	pH	Cendre %	Humidité %	Protéines (g/100g)
Standards	4 – 6 **[81]**	≤ 6% **[1]**	20-30 % **[1]**	1-40 **[1]**
P1	4,66 ±0,01[a]	4,22 ±0,08[a]	21,21±0,01[d]	24,55±0,54[c]
P2	4,82 ±0,36[a]	2,91±0,03[d]	19,2±0,03[f]	22,75±0,51[e]
P3	4,70 ±0,1[a]	3,2±0,05[c]	22,4±0,06[c]	27,57±0,42[b]
P4	4,19 ±0,17[a]	4,02±0,04[b]	26,8±0,01[a]	25,51±0,56[c]
P5	4,32 ±0,39[a]	2,96±0,03[d]	20,1±0,07[e]	28,04±0,24[b]
P6	4,38±0,25[a]	1,81±0,10[f]	23,01±0,03[b]	22,33±0,42[e]
P7	4,24±0,15[a]	2,3±0,04[e]	18,9±0,04[g]	19,86±0,36[d]
P8	4,72 ±0,12[a]	2,95±0,07[d]	10,7±0,04[h]	30,32±0,12[a]

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes

III.6 Teneur en minéraux

Concernant la composition minérale, onze éléments ont été étudiés, et les résultats ont été représentés dans le Tableau 9. Le potassium était l'élément le plus abondant dans tous les échantillons avec une quantité moyenne qui variait de 485,37±9,30 mg/kg dans P3 à 4594,25±18,26 mg/kg en P5, suivi par le magnésium (68,73±5,30 dans P3 mg/kg à 793,35±13,64 mg/kg dans P5), le sodium (91,85 ± 0,61 mg/kg dans P8 à 397,22 ± 4,12 mg/kg dans P1), le fer (17,07 ± 2,80 mg/kg à 68,86 ± 4,24 mg/kg dans P1), l'aluminium (16,43 ± 2,39 mg/kg dans P6 à 126,3 ± 7,33 mg/kg dans P1), le zinc (15,28 ± 0,94 mg/kg en P3 à 38,83 ±

4,36 mg/kg en P6), le calcium (2,24±1,03 mg/kg dans P3 à 22,73±2,57 mg/kg dans P5) et le cuivre (2,09±0,36 mg/kg à 7,18±0,5 mg/kg dans P8). Ces résultats suivent le même ordre que les résultats trouvés dans les études de la Turquie, la Colombie et l'Argentine [81,105,121].

La teneur en minéraux dépend de l'origine botanique et géographique [86]. Concernant les métaux lourds, tous les échantillons sont libres sauf deux (P5, P6) où nous avons trouvé respectivement 0,0049±0,0002 mg/kg et 0,0033±0,0003 mg/kg de plomb, ces valeurs restent dans les limites acceptables de la qualité du pollen d'abeilles qui exigent une teneur de plomb inférieure à 50 g/100g de pollen [1].

Tableau 9: Teneur en éléments minéraux du pollen d'abeilles frais monofloral (mg/kg)

	Ca	Na	Fe	K	Mg	Cu	Zn	Al	Ni	Cd	Pb
P1	10,18±1,55^{b}	397,22±4,12^{a}	68,86±4,24^{a}	1827,28±14,34^{e}	228,09±11,32^{d}	3,72±0,80^{ab}	30,4±4,24^{a}	126,3±7,33^{a}	ND	ND	ND
P2	21,31±3,35^{a}	145,45±3,39^{e}	63,51±4,61^{a}	1011,5±15,80^{f}	169,10±9,87^{de}	5,71±0,56^{a}	35,69±3,98^{a}	35,94±5,60^{cd}	ND	ND	ND
P3	2,24±1,03^{d}	95,08±2,82^{e}	17,07±2,80^{c}	485,37±9,30^{h}	68,73±5,30^{g}	2,09±0,36^{abc}	15,28±0,94^{ab}	49,13±2,70^{c}	ND	ND	ND
P4	3,07±0,18^{bc}	106,36±4,10^{e}	64,47±5,69^{a}	746,5±10,33^{g}	113,07±7,19^{f}	2,39±0,21^{abc}	27,11±2,72^{a}	80,62±7,65^{b}	ND	ND	ND
P5	22,73±2,57^{a}	170,55±4,92^{d}	52,54±2,18^{ab}	4594,25±18,26^{b}	793,35±13,64^{a}	4,66±0,28^{ab}	32,75±4,31^{a}	34,76±5,65^{cd}	ND	ND	0,0049±0,0002
P6	7,08±0,27^{b}	307,55±6,16^{b}	61,55±1,55^{a}	4685,5±13,13^{a}	423,95±13,10^{c}	6,44±0,40^{a}	38,83±4,36^{a}	16,43±2,39^{cde}	ND	ND	0,0033±0,0003
P7	9,33±2,99^{b}	244,36±5,72^{c}	50,44±2,88^{ab}	4026,5±16,97^{c}	484,15±11,27^{b}	3,45±0,67^{abc}	36,33±4,41^{a}	30,45±4,42^{cd}	ND	ND	ND
P8	3,48±0,43^{bc}	91,85±4,61^{e}	22,37±1,73^{c}	2657,5±16,42^{d}	197,68±7,14^{d}	7,18±0,5^{a}	26,33±2,68^{a}	24,94±3,95^{cd}	ND	ND	ND

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes

III.7 Teneur en phénols, flavones/flavonols

Les polyphénols ou composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux présents dans toutes les parties des plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, grains et bois), tandis que les phénols alimentaires sont impliqués dans les bienfaits potentiels pour la santé humaine [378]. Plus de 8000 polyphénols sont identifiés dans les plantes, les classes les plus représentatives sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, et les lignanes, Ces phyto-composés présentent un large éventail d'activités biologiques, et offrent une large protection contre de nombreuses pathologies chroniques impliquant le stress oxydatif comme le cancer , diabète, affections cardiovasculaires et vieillissement [379]. Le principal groupe commun de polyphénols dans l'alimentation humaine sont les flavonoïdes connus pour leurs activités antioxydantes par le biais d'un mécanisme de piégeage ou de chélation[380]. Le pollen d'abeilles présente une large gamme de composés phénoliques tels que la quercétine, les acides vanillique, les acides protocatéchiques et de nombreux autres composés phénoliques [125]. Sa teneur en phénols varie en fonction de ses origines botaniques et géographiques ainsi que du type de sol, des conditions climatiques et des activités de l'apiculteur [381].La quantité totale de phénols et de flavones/flavonols des huit échantillons de pollen d'abeilles analysés a été présentée dans le Tableau 10 et a montré une variation significative entre tous les échantillons. La teneur totale en composés phénoliques variait entre 8,070±1,037 mg EAG/g dans P7 et 32,387±0,148 mg EAG/g dans P6. Ces résultats étaient significativement plus élevés que ceux trouvés dans le pollen d'abeilles collecté en Roumanie, Espagne et Portugal avec une valeur moyenne de 12,69±0,21 mg EAG/g, 12,24±2,0 mg EAG/g et 16,4±2,0 mg EAG/g respectivement [223,382,383]. La teneur en flavones/flavonols variait entre 0,202±0,044 mg EQ/g dans P6 et 6,30±0,37 mg EQ/g dans P3, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par Tavdidishvili et *al.* [384].

III.8 Capacité antioxydante totale (TAC) et activités antioxydantes (DPPH, RP, ABTS)

La capacité antioxydante totale a été évaluée par le test au phosphomolybdène tandis que l'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes : les tests DPPH, ABTS et RP (Tableau 10), les résultats du DPPH ont montré des valeurs IC_{50} comprises entre 0,245 ± 0,009 mg/mL dans P2, et 0,832 ± 0,069 mg/mL dans P7, ce qui était inférieur à celles obtenues dans une étude espagnole (valeur moyenne = 3,0 ± 0,7 mg/mL)[223]. L'activité antioxydante déterminée par la méthode du pouvoir réducteur (RP) a montré l'inhibition maximale dans P1 (CE_{50} = 0,133 ± 0,036 mg/mL), et la plus faible inhibition dans P6 (CE_{50} = 0,790 ± 0,175 mg/mL), ces valeurs étaient beaucoup plus élevées que celui de l'acide ascorbique utilisé comme standard (0,031 ±

0,070 mg/mL). Les résultats du test ABTS ont montré une variation de la CI50 de 0,190 ± 0,005 mg/mL à 0,896 ± 0,051 mg/mL. Concernant la capacité antioxydante totale (TAC), tous les échantillons ont montré une différence significative, et les valeurs variaient entre 3,98 ± 0,16 mg EAA/g dans P1 et 9,69 ± 0,34 mg EAA/g dans P3. Les résultats des activités antioxydantes de nos échantillons semblent être plus forts que ceux en provenance de Brésil [385]

Tableau 10: Teneur en antioxydants et activités de l'extrait éthanolique de pollen d'abeilles monofloral

Echantillons	DPPH IC_{50} (mg/mL)	PR EC_{50} (mg/mL)	ABTS IC_{50} (mg/mL)	TAC (mg EAA/g)	Flavones & flavonols (mg EQ /g)	Phénols totaux (mg EAG/g)
P1	$0,78 \pm 0,012^{d}$	$0,133 \pm 0,036^{a}$	$0,896 \pm 0,051^{f}$	$3,984 \pm 0,163^{c}$	$2,233 \pm 0,275^{c}$	$13,730 \pm 2,816^{abc}$
P2	$0,245 \pm 0,009^{b}$	$0,380 \pm 0,089^{abc}$	$0,190 \pm 0,005^{b}$	$4,650 \pm 0,532^{c}$	$1,626 \pm 0,055^{c}$	$22,954 \pm 3,112^{ab}$
P3	$0,283 \pm 0,004^{b}$	$0,431 \pm 0,026^{abc}$	$0,204 \pm 0,006^{b}$	$9,693 \pm 0,343^{a}$	$6,303 \pm 0,374^{a}$	$27,985 \pm 3,042^{a}$
P4	$0,450 \pm 0,060^{c}$	$0,204 \pm 0,127^{ab}$	$0,237 \pm 0,047^{b}$	$6,103 \pm 0,163^{b}$	$4,871 \pm 0,110^{b}$	$22,744 \pm 1,334^{ab}$
P5	$0,663 \pm 0,086^{d}$	$0,731 \pm 0,085^{d}$	$0,314 \pm 0,009^{bc}$	$5,472 \pm 0,335^{b}$	$1,011 \pm 0,132^{cd}$	$18,342 \pm 2,816^{ab}$
P6	$0,795 \pm 0,016^{d}$	$0,790 \pm 0,175^{d}$	$0,414 \pm 0,023^{d}$	$4,140 \pm 0,057^{c}$	$0,202 \pm 0,044^{f}$	$32,387 \pm 0,148^{a}$
P7	$0,832 \pm 0,069^{df}$	$0,458 \pm 0,198^{abc}$	$0,576 \pm 0,045^{e}$	$6,827 \pm 0,024^{b}$	$1,875 \pm 0,363^{c}$	$8,070 \pm 1,037^{abc}$
P8	$0,753 \pm 0,075^{d}$	$0,238 \pm 0,091^{ab}$	$0,597 \pm 0,035^{e}$	$9,027 \pm 0,090^{a}$	$0,918 \pm 0,044^{cde}$	$28,824 \pm 0,148^{a}$
BHT	$0,021 \pm 0,01^{a}$	-	-	-	-	-
Acide gallique	-	-	$0,019 \pm 0,001^{a}$	-	-	-
Acide Ascorbique	-	$0,031 \pm 0,070^{a}$	-	-	-	-

Les valeurs de la même colonne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes

III.9 Analyse ACP

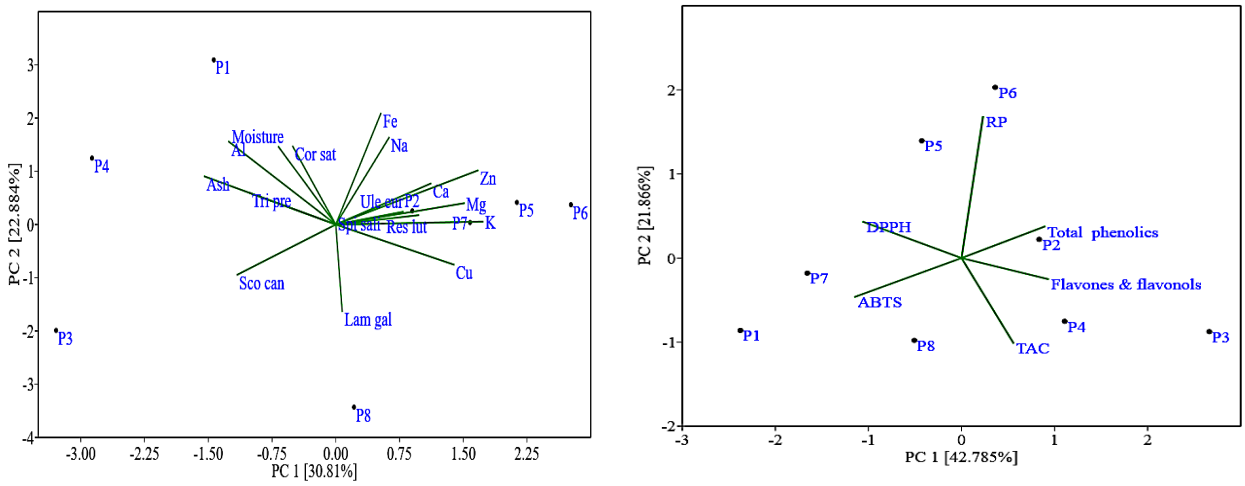
Les résultats de l'homogénéité des échantillons de pollen d'abeilles basés sur l'analyse palynologique, la teneur en minéraux, en humidité et en cendres ont été représentés dans la Figure 24-a. La première composante explique (30,81 %), et représente dans sa partie positive : Fe, Na, Ca, Zn, Mg, K, Cu et les résultats des analyses palynologiques des grains de pollen *d'Ulex europaeus, Spiraea salicifolia, Lamium galeobdolon* et *Reseda luteola*, tandis que le taux des cendre, l'humidité, l'Al et le pourcentage des grains de pollen de *Coriandrum sativum*, *Trifolium pretense* et *Scorzonera cana*, étaient dans la partie négative. La deuxième composante principale explique (22,884%) des résultats obtenus et représente dans la partie positive : cendres, Al, humidité, Fe, Na, Zn, Ca, Mg, K, et les résultats des analyses palynologiques des grains de pollen de *Trifolium pretense, Coriandrum sativum, Ulex europaeus*, *Spiraea salicifolia* et *Reseda luteola*.

Par ailleurs, dans les parties négatives, nous avons trouvé des pourcentages de grains de pollen de Cu et *Lamium galeobdolon, Scorzonera cana*. Les résultats représentés sur la Figure 23-a ont montré que K, Mg, Cu, Zn, corrélaient négativement avec les cendres. Les minéraux : Ca, Zn, Mg, K et Cu sont corrélés entre eux positivement tandis que l'aluminium (Al) est corrélé négativement avec tous les minéraux étudiés sauf le fer Fe et le sodium Na. Les échantillons de pollen d'abeilles monofloral : P2 (70 % des grains de pollen d'*Ulex europaeus*), P5 (64 % des grains de pollen d'*Ulex europaeus*), P6 (60 % des grains de pollen de *Reseda luteola*), P7 (68 % des grains de pollen de *Spiraea salicifolia*), possèdent les mêmes caractéristiques concernant le Ca, Zn, Mg, K et Cu. Alors que le pourcentage des grains de pollen prédominants dans l'échantillon de pollen d'abeilles P1(70 % de *Coriandrum sativum*), était positivement corrélée avec Fe, Na et Al. Ce qui suggère qu'en plus du type de sol, la teneur en minéraux du pollen d'abeilles a été affectée par l'origine botanique. Nos résultats vont de pair avec ceux trouvés par Stanciu et *al.* et Kostić et *al.* [385,386].

Les résultats de l'homogénéité des échantillons de pollen d'abeilles basés sur les activités phénoliques totales, flavones/flavonols et antioxydants (TAC, DPPH et RP) ont été représentés dans la Figure 24-b. La première composante explique (42,785%), et représente dans ses parties positives le pouvoir réducteur (PR), les phénols totaux, les flavones/flavonols et la capacité antioxydante totale (TAC), tandis que dans les parties négatives, on trouve le DPPH et l'ABTS. La deuxième composante explique (21,866%), et représente dans ses parties positives le DPPH, le PR et le contenu phénolique total tandis que dans les parties négatives, il représente les flavones/flavonols, la capacité antioxydante totale et ABTS. Les résultats de l'ACP indiquent que le DPPH et l'ABTS sont corrélés négativement avec la capacité antioxydante totale, les

flavones/flavonols et les phénols totaux, tandis que la capacité antioxydante, les flavones/flavonols et les phénols totaux sont positivement corrélés entre eux. La variabilité des minéraux et des teneurs en antioxydants pourrait être attribuée à l'origine géographique et botanique des pollens [235].

Les résultats indiquent également une variabilité dans l'analyse physico-chimique et l'activité antioxydante de P5 et P2, même s'ils ont la même origine botanique (*Ulex europaeus*). L'explication la plus probable de ces résultats est la présence de pollen secondaire (Tableau 7) qui contribue à l'activité antioxydante, et la teneur en minéraux des échantillons étudiés [387]. De plus, l'échantillon de pollen d'abeilles P2 provenait de KHENICHAT tandis que l'échantillon de pollen d'abeilles P5 était de FEZ (Tableau 6), ils ont donc été produits dans différentes zones géographiques et climatiques, ce qui contribue à la variabilité de ces deux échantillons dans les paramètres étudiés [235].



(a) (b)

Figure 24: Analyse en composantes principales ACP

(a) : Biplots d'échantillons de pollen d'abeilles monofloral à l'aide d'une analyse palynologique (cor sat : *Coriandrum sativum* ; uleeur : *Ulex europaeus* ; scocan : *Scorzonera cana* ; tri pre : *Trifolium pretense* ; res lut : *Reseda luteolaspi* sal : *Spiraea salicifolia* ; lam gal : *Lamium galeobdolon*, teneur en minéraux, cendres, humidité.

(b) : Biplots de pollen d'abeilles monofloral utilisant les phénols totaux, les flavones/flavonols, l'activité antioxydante totale et les activités antioxydantes (ABTS, RP, DPPH).

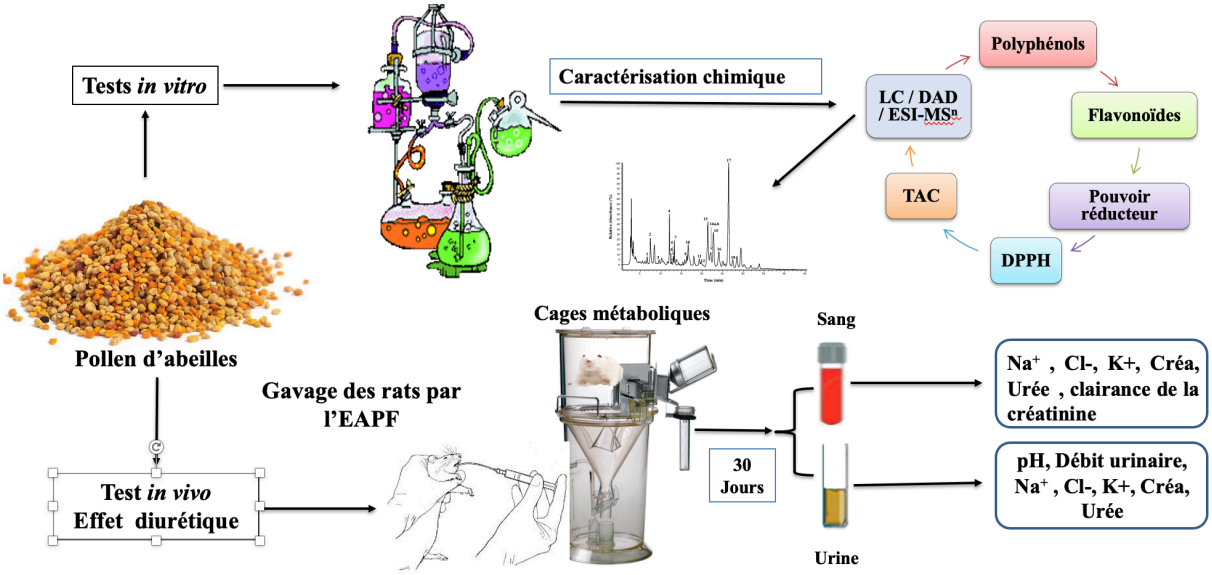
III.10 Conclusion

Dans ce travail, la caractérisation palynologique, physico-chimique, la teneur en protéines et les activités antioxydantes ont été évaluées pour la première fois pour le pollen d'abeilles Marocain. Les résultats de la présente étude ont montré que tous les échantillons répondaient aux critères de qualité et présentaient un fort potentiel antioxydant *in vitro*. Ce travail est la première étape vers la certification et la standardisation du pollen d'abeilles Marocain.

Chapitre 3 : Composition Chimique et Activité Antioxydante du Pollen Frais Marocain & Exploration de son Effet Diurétique Chez le Rat Normotensif

Résumé

Objectif de cette étude est de déterminer la composition chimique et l'activité antioxydante de l'extrait aqueux du pollen d'abeilles frais Marocain (EAPF) ainsi que l'évaluation de son effet diurétique chez des rats normotensifs. ***Matériel et méthodes*** : La composition chimique des composés bioactifs a été évaluée à l'aide de la chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation « Electrospray » (LC / DAD / ESI-MSn). Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et le pouvoir réducteur ont été utilisés pour évaluer les propriétés antioxydantes de l'extrait, ainsi que la détermination des phénols totaux et des flavonoïdes. Pour évaluer l'effet diurétique, 30 rats normaux ont été divisés en cinq groupes : le premier était un groupe témoin administré par de l'eau distillée (10 mL/kg PC), le deuxième groupe a reçu du furosémide (10 mg/kg PC), le troisième groupe a reçu 100 mg/kg PC de l'EAPF, le quatrième groupe a reçu 250 mg/kg PC de l'EAPF et le cinquième groupe a reçu 500 mg/kg PC de l'EAPF. le plasma et l'urine ont été prélevés pour analyser le taux de la créatinine, de potassium, des chlorures et de sodium. ***Résultats*** **:** La N^1,N^5,N^{10}-tri-p-coumaroylspermidine un dérivé de la spermidine, a été le composé majoritaire de cet échantillon, sur un total de 19 composés identifiés, y compris des flavonoïdes, des flavonoïdes glucosides et des dérivés méthylés. L'alimentation forcée avec l'EAPF a induit une augmentation significative de la production d'urine et des niveaux d'électrolytes urinaires avec un effet do se dépendant sans modification des taux d'électrolytes plasmatiques, tandis que le furosémide a diminué le potassium plasmatique. ***Conclusion :*** L'extrait de pollen d'abeilles frais Marocain contient des flavonols et des spermidines qui induisent une activité antioxydante potentielle associée à un effet diurétique significatif sans modification de la composition plasmatique.



I. Préface

L'hypertension artérielle est un problème majeur de santé publique mondial compte tenu du nombre croissant de patients affectés chaque année [388]. En outre, la faible efficacité et les effets indésirables associés aux diurétiques de synthèse (antihypertenseurs) peuvent limiter leur utilisation , ce qui conduit à l'utilisation concomitante d'un schéma thérapeutique adéquat [389]. Dans ce contexte, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'effet bénéfique de l'alimentation et des produits naturels sur l'hypertension et les pathologies associées. Toutes ces études soutiennent que l'adoption d'un régime naturellement riche en micronutriments, en vitamines et en antioxydants peut avoir un effet important sur la prévention et la gestion de l'hypertension artérielle [390,391].

La présente étude vise à étudier la composition chimique, le potentiel antioxydant et l'effet diurétique de trois doses de l'extrait aqueux de pollen d'abeilles frais Marocain chez des rats normotensifs.

II. L'hypertension artérielle en chiffres

L'OMS rapporte que l'hypertension artérielle est l'une des premières causes de décès prématuré dans le monde. En 2019, 1,28 milliard de personnes dans le monde âgées de 30 à 79 ans sont atteintes d'hypertension, et que la plupart (les deux tiers) vivent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Au Maroc, 27,5% soit 6,6 millions de personnes adultes de la population est atteinte d'HTA et 6,1 d'entre eux ont une HTA non contrôlée [392,393].

Actuellement, L'une des cibles mondiales en matière de maladies non transmissibles est de réduire la prévalence de l'hypertension de 33 % entre 2010 et 2030.

III. Étiologie de l'hypertension

L'hypertension est l'une des premières pathologies humaines enregistrées, ses conséquences ont directement et significativement augmenté la morbidité et la mortalité dans le monde. Bien que l'étiologie de l'HAT n'est pas clairement établie, nous savons actuellement que l'hypertension est le produit d'une interaction dynamique entre divers facteurs génétiques, physiologiques, environnementaux et psychosociaux [394,395]. Le mécanisme commun dans tous ces facteurs précités repose sur le dérèglement des différents systèmes impliqués dans l'homéostasie de la pression artérielle tels que le système nerveux sympathique, le système rénine-angiotensine-aldostérone, la fonction endothéliale plus la rétention de sodium et de l'eau [396].

Le système nerveux sympathique (SNS), le débit cardiaque et la résistance vasculaire périphérique (RVP) sont des facteurs importants et étroitement liés avec le maintien d'une

pression artérielle normale et peuvent déclencher le développement de l'HTA dans des conditions pathologiques. Il a été suggéré que l'hyperstimulation du cœur via le SNS provoque une augmentation du débit cardiaque, dans ce cas-là l'augmentation de la RVP est la réponse physiologique pour s'adapter au changement de pression et maintenir l'homéostasie [397,398]. Le rein est un organe qui joue un rôle majeur et crucial dans le maintien d'une pression artérielle normale via le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ce système est activé par une stimulation sympathique ou par un glomérule sous perfusion. Par conséquent, une augmentation plasmatique de ces hormones induit une réabsorption sodique est une rétention de l'eau, il en résulte l'installation de l'HTA [399].

Le dysfonctionnement endothélial est une autre cause de l'HTA résultant de l'augmentation du stress oxydatif chez les patients hypertendus. Le principal mécanisme sous-jacent de la dysfonction endothéliale observée dans l'HTA est la diminution de la disponibilité de l'oxyde nitrique (NO) causée par une inhibition de la production de l'enzyme oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) [400]. D'autres molécules vasoactives sécrétées par les cellules endothéliales peuvent aussi être impliquées dans le maintien de la pression artérielle telles que, l'endothéline-1 avec son effet vasoconstricteur potentiel, la bradykinine avec son effet vasodilatateur et le facteur natriurétique atrial encore appelé peptide natriurétique atrial sécrété par le cœur avec son effet natriurétique vasodilatateur [394].

IV. Traitement de l'hypertension

IV.1 Traitements non pharmacologiques

Bien que la réduction de la pression artérielle soit essentielle dans le traitement des patients atteints d'HTA, la gestion efficace d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que les troubles lipidiques, l'intolérance au glucose/diabète, l'obésité et le tabagisme est aussi indispensable. Le traitement de l'HAT comprend des traitements non-pharmacologiques tels que le changement du style de vie via la réduction du poids, de la prise de sels, l'augmentation de la prise de potassium, la réduction de la consommation de l'alcool, le sevrage de la cigarette et l'exercice physique régulier [401–405].

IV.2 Traitements pharmacologiques

Le changement du style de vie n'est pas toujours suffisant pour le management de l'HTA et les patients ont besoin de traitements pharmacologiques par les médicaments antihypertenseurs. Ce traitement comprend plusieurs classes thérapeutiques tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II qui constituent le traitement de première ligne et qui agissent en perturbant le SRAA via l'inhibition

de la formation d'angiotensine II, ils diminuent aussi le métabolisme de la bradykinine vasodilatatrice en augmentant sa disponibilité [406].

Les bloqueurs des canaux classiques BCC agissent en se liant aux canaux L des cellules musculaires lisses vasculaires perturbant ainsi la libération du calcium dans les cellules musculaires, qui en résulte une inhibition de la contraction des cellules musculaires lisses et des myocytes cardiaques [407].

Les diurétiques sont une classe importante et hétérogène de molécules pharmacologiques couramment utilisées dans le traitement de l'hypertension, de l'insuffisance cardiaque et des troubles électrolytiques. A l'exception du mannitol et de la vasopressine, les diurétiques ont une propriété commune d'augmenter l'élimination du sodium et de l'eau dans différents sites du tube rénal, par le biais d'une inhibition de la réabsorption rénale du sodium. Cette capacité des diurétiques à négativer la balance hydro-sodée explique qu'ils soient utilisés dans le traitement des états œdémateux et de l'hypertension artérielle [408,409].

Selon leur site et mécanisme d'action, les diurétiques sont subdivisés en 6 groupes de médicaments :

- **Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (IAC*)***

Sont des médicaments diurétiques de la famille des sulfonamides qui comprennent l'acetazolamide (le plus souvent prescrit), le methazolamide, le dorzolamide, le brinzolamide, le diclofenamide, l'ethoxzolamide et le zonisamide. Ces médicaments sont utilisés dans la gestion et le traitement du glaucome, de l'hypertension intracrânienne idiopathique, de l'insuffisance cardiaque congestive et de l'épilepsie, entre autres maladies. Au niveau des reins (Figure 25), les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique entraînent une inhibition de l'absorption des bicarbonates par le tubule proximal ce qui en résulte leur élimination accrue, entraînant ainsi une alcalinisation de l'urine. Au niveau de la sphère ophtalmologique, les CAI sont classiquement utilisés dans la prise en charge du glaucome en raison de leur capacité à réduire la pression intraoculaire. L'alcalinisation des urines par les IAC peut être un effet recherché de L'acétazolamide afin de solubiliser l'acide urique et les calculs rénaux de cystine [409–411].

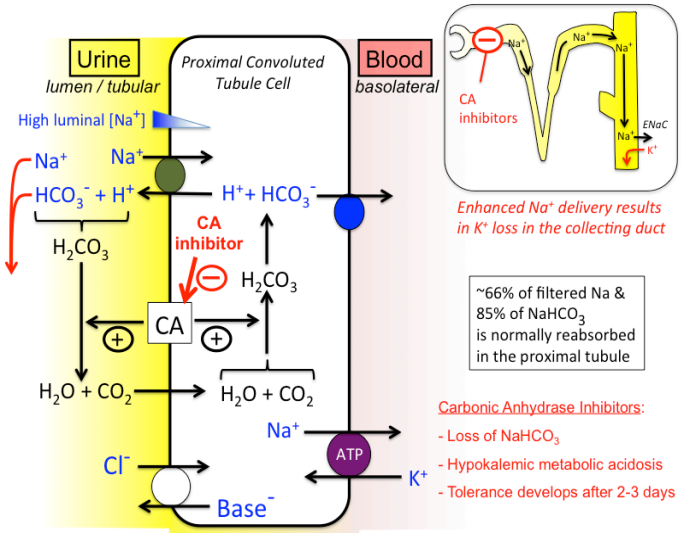


Figure 25: Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique dans le tube rénal proximal [412]

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique peuvent avoir de nombreux effets latéraux indésirables, essentiellement les modifications du goût, fatigue, douleurs abdominales, diarrhée, nausées, vomissements, vision floue, acouphènes, paresthésies et maux de tête. La structure sulfonamide de la forme orale de ces médicaments peut provoquer des réactions allergiques telles qu'une éruption cutanée, une anaphylaxie et dans de cas rares, le syndrome de Stevens-Johnson (SJS) ou la nécrolyse épidermique toxique (NET). D'autres effets secondaires graves tels que l'acidose métabolique, l'hypokaliémie, l'anémie aplasique, l'agranulocytose, et la nécrose hépatique fulminante peuvent apparaître lors d'un traitement par les IAC. La formation des calculs rénaux d'oxalate de calcium suite à l'alcalinisation des urines peut être un effet secondaire sérieux [410,411,413].

- **Diurétiques osmotiques**

Ou mannitol est un sucre-alcool dérivé du mannose incapable de traverser la membrane plasmique quand il est administré par voie intraveineuse et qui exerce son effet osmotique le long du tubule rénal quel que soit l'état d'hydratation et inhibe ainsi la réabsorption tubulaire normale de l'eau (Figure 26).

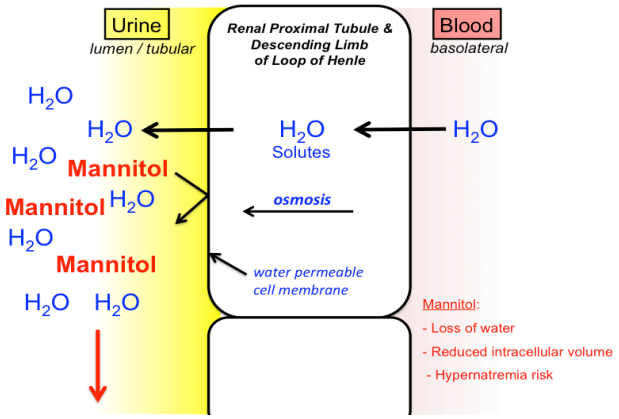


Figure 26: Mécanisme d'action du mannitol dans le tube rénale proximal [412]

Le principal effet secondaire dû au mannitol c'est qu'il élimine le gradient médullaire de soluté et altère ainsi la capacité du rein à concentrer les urines accompagné d'une augmentation de l'apport de Na^+ au néphron distal, ce qui augmente la perte de K^+. Le mannitol provoque aussi une élimination importante de Ca^{2+} vu qu'il est réabsorbé, tout comme l'eau, par la force osmotique au niveau du tube proximal [414–416].

- **Diurétiques de l'anse**

Essentiellement le furosémide, le torasémide, l'azosémide et le bumétanide agissent au niveau de la branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé, où 20 à 30 % du NaCl filtré est réabsorbé. Les diurétiques de l'anse se lient à la protéine de transport Na-K-2Cl et inhibent son action, ceci altère la réabsorption de Na^+, K^+ et Cl^- au niveau de cette partie de l'anse et augmente le transfert de Na^+ au tubule distal là où il se passe un échange de Na^+ contre K^+ favorisant ainsi l'élimination de K^+ dans le tubule distal (Figure 27). Ces changements diminuent la force motrice osmotique et la capacité du rein à concentrer les urines.

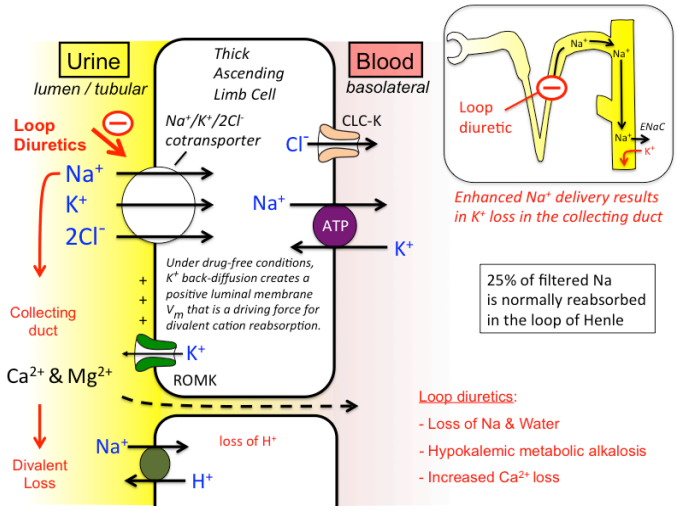


Figure 27: Mécanisme d'action du furosémide au niveau de la branche ascendante de Henlé [412]

Les principaux effets indésirables associés au furosémide sont : L'hypovolémie et le déséquilibre électrolytique dus à la diurèse, l'hypersensibilité et l'ototoxicité (altération de la fonction auditive). Une diurèse excessive due à des doses élevées du médicament peut induire une uricémie et une contraction du volume de liquide extracellulaire, entraînant une alcalose métabolique. [588, 595,596].

- **Diurétiques thiazidiques**

Sont une classe largement utilisée pour la gestion de l'hypertension. Ce sont des inhibiteurs de la réabsorption de 3 % à 5 % du sodium dans le tube contourné distal du néphron, ils agissent en bloquant le Co transporteur de NaCl ce qui entraîne une altération de la réabsorption de Na^+ et de Cl^- , une augmentation de l'apport de Na^+ au niveau du canal collecteur, un échange accru de Na^+ et de K^+ et une perte de K^+. Ils diminuent la réabsorption du Mg^{2+}et augmentent la réabsorption de Ca^{2+} (Figure 28). Par conséquent, les diurétiques thiazidiques favorisent la natriurèse et la diurèse. Trois diurétiques thiazidiques sont couramment utilisés : l'hydrochlorothiazide, la chlorthalidone et l'indapamide.

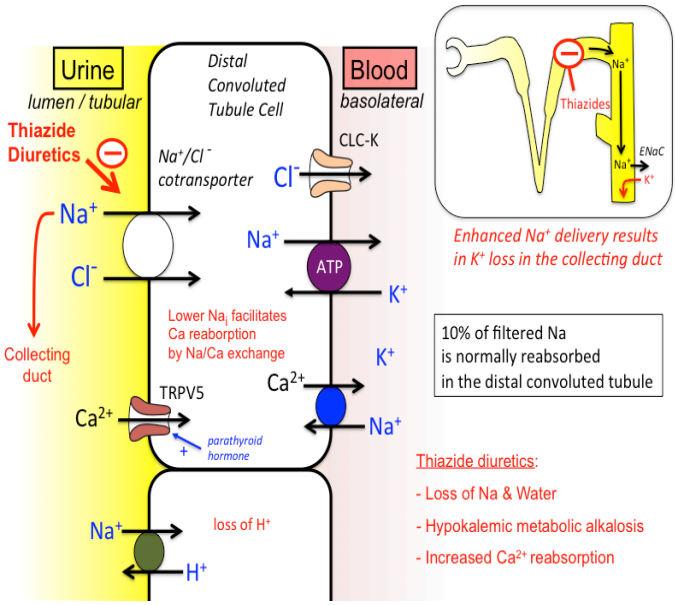


Figure 28: Mécanisme d'action des thiazidique au niveau du tube contourné distal [412]

Les thiazidiques peuvent avoir un effet toxique sur le pancréas où ils peuvent provoquer une augmentation des sécrétions pancréatiques ainsi qu'une ischémie pancréatique [419,420].

- **Diurétiques d'épargne potassique**

Ces diurétiques agissent au niveau du canal collecteur cortical et peuvent être divisés en 2 sous-catégories. La première catégorie correspond à celle des analogues de la ptéridine qui inhibent la réabsorption de Na^+ par le canal épithélial (ENaC) situé au niveau du canal collecteur (Figure

29). Étant donné que seulement 3% du Na^+ filtré est réabsorbé au niveau du canal collecteur, ces médicaments n'entraînent pas de diurèse appréciable et conduisent à une efficacité antihypertensive minimale en monothérapie, pour cela, ils sont souvent utilisés avec d'autres agents pour corriger la carence en K^+. La deuxième sous-catégorie concerne les bloqueurs des récepteurs de l'aldostérone qui agissent au niveau du cytoplasme des cellules principales pour réguler négativement la pompe basolatérale Na^+/K^+ et l'ENaC sensible à l'aldostérone. L'effet final des deux sous-catégories est une diminution de la réabsorption de Na^+, associée à une diminution de la sécrétion de H^+ et de K^+.

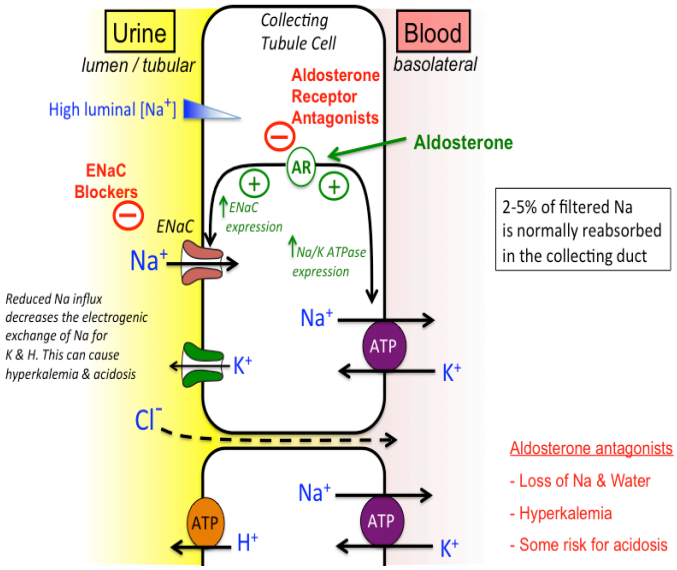


Figure 29: Mécanisme d'action des diurétiques d'épargne potassique au niveau du tube collecteur cortical [412]

Les problèmes courants liés à l'utilisation des médicaments de cette classe comprennent la gynécomastie et les troubles électrolytiques tels que l'hyperkaliémie et la détérioration de la fonction rénale [421–423].

- **Antagonistes des récepteurs de la vasopressine**

La vasopressine est une hormone neuropeptidique qui joue un rôle important dans l'homéostasie circulatoire et sodique, et dans la régulation de l'osmolalité sérique. Les médicaments de cette classe bloquent la vasopressine au niveau des récepteurs V_2 localisés dans l'endothélium vasculaire et empêchent la réabsorption d'eau libre au niveau des canaux collecteurs, entraînant une augmentation de l'excrétion d'eau libre (Figure 30) [424,425].

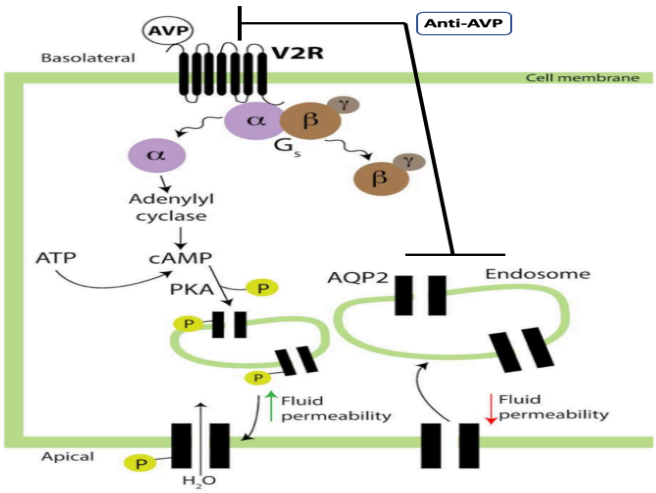


Figure 30: Mécanisme d'action des antagonistes des récepteurs de la vasopressine [426]

L'événement indésirable le plus fréquemment rapporté lors de l'utilisation des antagonistes des récepteurs de la vasopressine était la soif, qui semble être une conséquence directe d'une légère hypernatrémie. Les autres effets secondaires signalés sont également le résultat logique de l'effet diurétique du médicament et comprennent la bouche sèche, la polydipsie, la polyurie (pollakiurie), l'hypotension orthostatique, la constipation et une augmentation de la créatinine sérique [426].

- **Diurétiques naturels**

Compte tenu de leurs bienfaits pour la santé humaine, les plantes médicinales suscitent un intérêt croissant. Dans ce cadre, le nombre d'études effectuées affirme que les plantes ou les dérivés bioactifs de plantes peuvent fonctionner comme des agents diurétiques doux. Une grande majorité de ces recherches a démontré le degré de soutien clinique à l'utilisation traditionnelle de remèdes traditionnels ou folkloriques. Ces études ont pu identifier plusieurs plantes médicinales à effet diurétique (qui par définition augmentent le volume urinaire et le taux d'excrétion de Na^+). Et on note les espèces les plus prometteuses telle que; *Foeniculum vulgare*,*Fraxinus excelsior, Hibiscus sabdariffa, Petroselinum sativum et Spergularia purpurea,* des espèces de genre *Cucumis (Cucumismelo*et *Cucumistrigonus), Equisetum (Equisetum bogotense, Equisetum fluviatile, Equisetum giganteum, Equisetum hiemale var. affine* et *Equisetum myriochaetum), Lepidium (Lepidium latifolium* et *Lepidiumsativum), Phyllanthus (Phyllanthus amarus, Phyllanthus corcovadensis* et *Phyllanthus sellowianus)* et *Sambucus (Sambucus mexicana et Sambucusnigra)*. Le mécanisme antihypertenseur des molécules actives issues de ces plantes repose sur leur contenu en polyphénols, notamment les flavonoïdes ayant un effet positif sur l'amélioration du dysfonctionnement de l'endothélium [427–429].

V. Matériel et Méthodes

V.1 Caractérisation chimique par chromatographie liquide avec détection par barrette de diodes couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation « Electrospray » (LC / DAD / ESI-MS^n)

V.1.1 Extraction des composés bioactifs et préparation de l'EAPF

Le pollen d'abeilles frais a été obtenu auprès d'un apiculteur professionnel de la région de Larache, au Maroc, entre le mois de Mars et Mai 2015. Les composés bioactifs ont été extraits en mélangeant 2 g de pollen d'abeilles frais avec 15 mL d'éthanol/eau (70/30 v/v) à 70°C. l'EAPF a été préparé en mélangeant 1g de Pollen frais avec 10 mL de l'eau distillée. Après 30 min d'agitation, les mélanges ont été séparé par filtration par un Papier filtre Whatman n°5. L'extrait éthanolique du pollen frais a été maintenu à 5°C jusqu'à analyse [430] par LC / DAD / ESI-MS^n en utilisant l'instrument Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA); tandis que l'EAPF a été conservé à -20°C pour les tests de l'activité antioxydante. [431]

V.2 Estimation du contenu phénolique total

Le contenu total de polyphénols de l'EAPF a été quantifié en utilisant la réaction du réactif de Folin – Ciocalteu selon singleton et al. (cf. chapitre 2).

V.3 Estimation de la teneur en flavones et flavonols

La détermination du contenu en flavones et flavonols a été réalisée comme décrit par Miguel et al. (cf. chapitre 2).

V.4 Estimation de l'activité antioxydante totale (TAC) par dosage du phosphomolybdate

Sur la base de la méthode de Pilar Prieto, l'activité antioxydante totale de l'EAPF a été estimée en utilisant le phosphomolybdène (cf. chapitre 2).

V.5 Détermination de l'activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

La capacité de l'EAPF à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été estimée par la méthode décrite par Kumazawa et al. (cf. chapitre 2).

V.6 Détermination du pouvoir réducteur

La capacité de l'EAPF à réduire les ions de fer a été effectuée selon la méthode décrite par Moreira et Miguel (cf. chapitre 2).

V.7 Produits chimiques de référence

Tous les produits chimiques utilisés dans l'activité antioxydante et le dosage des composés phénoliques ont été fournis par Sigma-Aldrich Corporation, Fallavier, France.

V.8 Analyse LC / DAD / ESI-MSn

Un instrument Dionex UltiMate 3000 était la chromatographie liquide ultrapression utilisée pour les analyses LC / DAD / ESI-MSn (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Cette chromatographie est connectée à un réseau de diodes et attaché à un détecteur de masse. Elle a été conduite avec une colonne C18 de Macherey-Nagel Nucleosil (250 mm x 4 mm de diamètre intérieur ; diamètre de particules de 5 mm coiffé aux extrémités) avec une température maintenue constante à 30 ° C. Les conditions appliquées en chromatographie liquide étaient basées sur un travail antérieur [432]; 1 mL/min a été utilisé comme débit, et 10 µl ont été définis comme volume d'injection. Les données spectrales finales ont été accumulées dans l'intervalle de longueur d'onde de 190 à 600 nm.

Le spectromètre de masse à piège à ions linéaire LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) a été réglé en mode ions négatifs. Une source ESI a été utilisée sur le spectromètre avec les paramètres suivants: Source, lentille du tube et tension capillaire à 5 kV, -20 V et -65 V, respectivement; 325 °C comme température du capillaire; et N2 utilisé comme gaine et gaz auxiliaire à un débit de 50 et 10 (unités arbitraires), respectivement [433].

L'acquisition des spectres de masse a été effectuée dans une plage complète de 100 à 1000. Pour évaluer le modèle de fragmentation, il était important d'exécuter une analyse dépendante des données en déployant la dissociation induite par collision (CID), définie à 35 comme énergie de collision de la cellule CID (normalisée). Toutes les acquisitions de données ont été recueillies à l'aide du logiciel Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

L'identification des composés phénoliques a été effectuée à travers des standards chimiques et par comparaison, des caractéristiques chromatographiques ainsi que son comportement spectrophotométrique aux UV et les informations de la spectrométrie de masse (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

Cependant, en l'absence de standards commerciaux lorsque, les informations structurelles ont été confirmées à l'aide des données UV et des modèles de fragmentation de la SEP précédemment rapportés dans la littérature.

Trois normes ont été utilisées pour la quantification ; l'acide caféique (0,002-0,35 mg/mL; $y = 3 \times 10^7 \times -78726$; $R^2 = 0{,}999$), le Kaempférol (0,01-1 mg / mL; $y = 9 \times 10^7 \times -176949$; $R^2 = 0.999$) et la chrysine (0.005-1 mg/mL; $y = 2 \times 10^7 \times -247019$; $R^2 = 0.999$).Tous les

composés ont été quantifiés à l'aide de la courbe d'étalonnage du standard le plus proche structurellement, et le résultat final a été donné en termes équivalents. Le dosage a été répété trois fois et est exprimée en mg/g de pollen frais.

V.9 Protocol expérimental

V.9.1 Préparation de l'EAPF

Pour évaluer l'activité diurétique , l'EAPF a été utilisé pour préparer trois concentrations : 100, 250 et 500 mg/kg pc en ajoutant chaque 100, 250 et 500 mg à 10 mL d'eau distillée puis les mélanges ont été soniqués pendant 30 min, ensuite gardés pendant une nuit à l'obscurité, puis filtrée par un papier filtre Whatman N °1.

V.9.2 Approbation éthique

L'approbation éthique a été obtenue de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah de Fès, sous la responsabilité de l'Animalerie et du Laboratoire des Substances Naturelles, de la Pharmacologie, de l'Environnement, de la Modélisation, de la Santé et de la Qualité de Vie (USMBA-SNAMOPEQ 2017-03). Les expériences ont été menées conformément aux principes acceptés et énoncés dans le « Guide pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire » préparé par l'académie nationale des Sciences et publié par l'Institut National de Santé. Tous les efforts ont été faits pour minimiser la souffrance animale et le nombre d'animaux utilisés.

V.9.3 Animaux d'expérience

Cette étude a été menée sur des rats Wistar mâles normaux pesant 200±40 g chacun. Cinq groupes composés de six rats chacun (n=6) ont été utilisés.

Les animaux ont été hébergés dans l'animalerie du laboratoire SNAMOPEQ du département de biologie de la faculté des sciences et technologies de Fès, Maroc, à 25 °C ± 2 ° C, et la lumière a été imposée de 6 à 18 h. Les rats recevaient quotidiennement de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. Pour leur acclimatation, les rats ont été placés dans une cage métabolique pendant 48 h avant de commencer l'expérience.

Groupe 1 : Groupe témoin administré avec de l'eau distillée (10 mL/kg de poids corporel).

Groupe 2: Groupe contrôle médicament traité oralement par le furosémide oral (10 mg/kg de poids corporel).

Groupe 3 : Groupe traité par l'EAPF à 100 mg/kg PC.

Groupe 4 : Groupe traité par l'EAPF à 250 mg/kg PC.

Groupe 5 : Groupe traité par l'EAPF à 500 mg/kg PC.

Le traitement a duré 30 jours. Des échantillons urinaires ont été prélevés dans des cylindres gradués aux jours 0, 7, 14, 21 et 30 du traitement pour déterminer le volume urinaire, puis filtrés, centrifugés et stockés à -20 °C pour l'analyse biochimique des taux urinaires de sodium, de chlorure, de potassium, de la créatinine et de l'urée.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à la fin du traitement par ponction rétro-orbitaire sur des animaux anesthésiés partiellement par l'éther [434].Ensuite, le plasma a été séparé par centrifugation à 10 000 x g pendant 10 min et conservé à -20 ° C pour l'analyse des taux sanguins du sodium, du potassium, du chlorure, de la créatinine et de l'urée[435]. La clairance de la créatinine a également été calculée au jour 30 selon la formule suivante :

$$\text{Clairance (mL/min)} = (U_{créa} \times P_{créa}) / V$$

avec $U_{créa}$: concentration urinaire de créatinine, $P_{créa}$: concentration plasmatique de créatinine et V: volume urinaire (mL/min). La clairance osmolaire (C_{osm}) a également été calculée à partir du volume urinaire (V), de l'osmolarité plasmatique (P_{osm}) et de l'osmolarité urinaire (U_{osm}) en utilisant l'équation suivante :

$$Co_{sm} = (V \times U_{osm}) \times 1/P_{osm}.$$

Ensuite, la clairance de l'eau libre (CH_2O) a été calculée selon l'équation suivante :

$$CH_2O = V \times (1 - U_{osm}) \times 1 / P_{osm}.$$

La réabsorption de l'eau libre (TCH_2O) a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$TCH_2O = - (CH_2O).$$

V.9.4 Médicament de référence

Le furosémide (Lasilix, Pharma 5, Maroc) a été utilisé comme médicament de référence.

V.10 Analyses statistiques

Le logiciel Graph Pad Prism 5 a été utilisé pour comparer tous les groupes en utilisant l'analyse unidirectionnelle de la variance suivie du test de comparaison multiple post hoc de Tukey. Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM.

VI. Résultats

VI.1 Caractérisation chimique par LC/DAD/ESI-MS^n

Le profil chromatographique du pollen d'abeilles frais Marocain enregistré à 280 nm est obtenu en utilisant LC / DAD / ESI-MS^n (Figure 31).

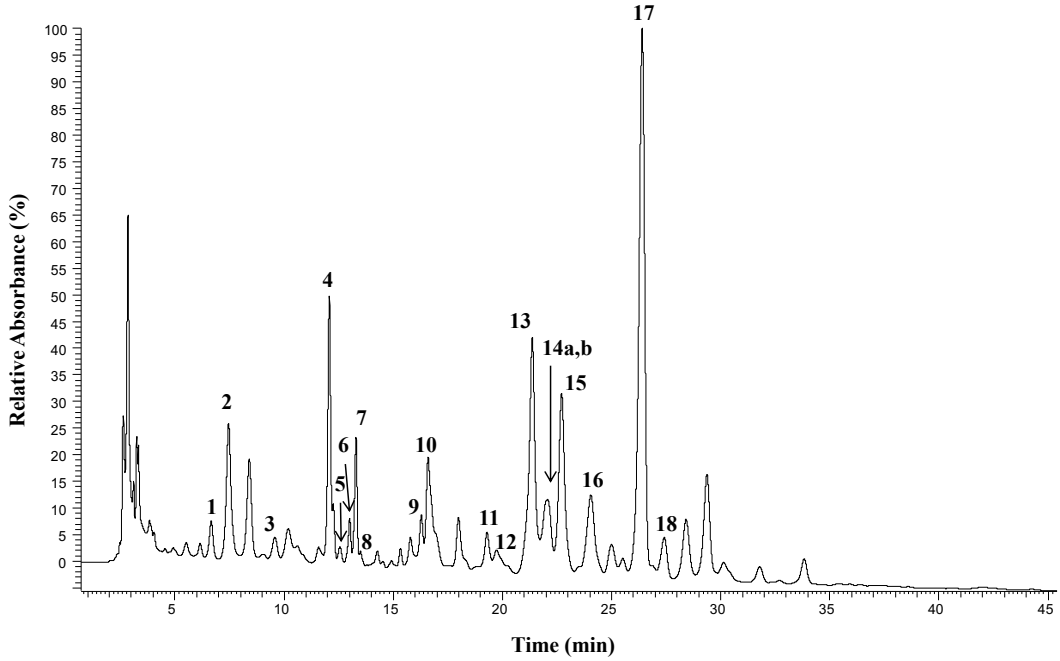


Figure 31 : Profil chromatographique de l'échantillon de pollen frais obtenu à 280 nm par LC/DAD/ESI-MS^n

Dix-neuf composés ont été identifiés et détectés dont 10 dérivés de flavonols, principalement la quercétine, l'isorhamnétine et les glycosides de Kaempférol. Une flavone ; la lutéoline, un acide phénolique ; l'acide ellagique ; et sept spermidine tri-substituées ont aussi été identifiés (Tableau 11). Lorsque le standard n'a pas été disponible, la quantification des composés a été faite à travers le chromatogramme obtenu à 280 nm et en utilisant les courbes d'étalonnage des composés phénoliques dont la structure est très proche, ainsi que le spectre UV est similaire. Parmi les composés quantifiés, le N^1, N^5, N^{10}-tri-p-coumaroylspermidine (pic 17; 0,89 mg / g de pollen frais) était principalement détecté avec la quantité la plus élevée, suivi des flavonols kaempférol-3-O-rutinoside (0,78 mg / g de pollen frais, pic 4), et diglucoside de quercétine (pic 2; 0,70 mg / g de pollen frais). Avec une concentration de 3,78 mg / g de pollen d'abeilles frais, les dérivés de flavonols étaient les plus abondants parmi les différentes classes, tandis que les dérivés de spermidine comprennent 1,75 mg / g de pollen frais (Tableau 11).

Tableau 11: Composés bioactifs identifiés et quantifiés dans l'échantillon du pollen d'abeilles frais par LC/DAD/ESI-MS^n

Pic	t_R (min)	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$	MS^n (% pic de base)	Composés proposés	mg/g pollen frais
1	6,7	264,354	625	MS^2[625]: 317 (100)	Myricetine-3-*O*-rutinoside[a,c]	0,27±0,00
2	7,5	257,354	625	MS^2[625]: 445 (85), 300 (92), 301 (100), 271 (17)	Quercétine-diglucoside[a,d]	0,70±0,00
3	9,6	257, 354	609	MS^2[609]: 301 (44), 300 (100)	Quercétine-3-*O*-rutinoside[a,b,e]	0,23±0,00
4	12,1	266, 347	593	MS^2[593]: 285(100)	Kaempférol-3-*O*-rutinoside[a,b,e]	0,78±0,00
5	12,2	255, 354	623	MS^2[623]: 315 (100), 314 (67), 300 (23)	Isorhamnétine-3-*O*-rutinoside[a,b,e]	0,24±0,00
6	13,01	255, 355	609	MS^2[609]: 315 (100)	Isorhamnétine-*O*-péntosyl-héxoside[a,c]	0,24±0,00
7	13,3	266, 350	635	MS^2[635]: 285 (33), 284 (100)	Kaempférol-diglucuronide[a]	0,42±0,01
8	13,5	255, 354	477	MS^2[477]: 462 (45), 314 (18), 315 (100), 300 (13), 299 (12)	Isorhamnetin-3-*O*-glucoside[a,c]	0,16±0,01
9	16,3	256, 349	447	MS^2[447]: 301 (100)	Quercétine-3-*O*-rhamnoside[a,b,e]	0,32±0,01
10	16,6	253, 367	301	MS^2[301]: 301 (100), 257 (5), 255 (5), 229 (11)	Acide ellagique[a,b,d]	0,17±0,00
11	19,3	298, 308	614	MS^2[614]: 494 (24), 478 (100), 468 (5), 452 (78), 358 (18); MS^3[478]: 358 (100); MS^4[284]: 315	N^1-*p*-coumaroyl-N^5, N^{10}-dicaffeoylspermidine[a,d,f,g]	0,07±0,00
12	19,7	298, 309	598	MS^2[598]: 478 (100), 436 (11), 358 (16); MS^3[478]: 358 (100); MS^4[358]: 315	N^1, N^{10}-*di-p*-coumaroyl-N^5-caffeoylspermidine[a,d,f,h]	0,06±0,00
13	21,4	254, 268sh, 348	285	MS^2[285]: 285 (100), 241 (27), 217 (13), 175 (18)	Luteoline[a,b,e]	0,49±0,00
14a	22,1	256, 355	315	MS^2[315]:300 (100); MS^3[300]: 271 (100), 255 (4), 151 (<1)	Quercétin-3-méthyl-ether[a,e]	0,42±0,00
14b		299, 310	598	MS^2[598]: 478 (41), 462 (100), 452 (39), 342 (13); MS^3[462]: 343	N^1, N^5-*di-p*-coumaroyl-N^{10}-caffeoylspermidine[a,d,f,h]	0,10±0,00
15	22,7	294, 308sh	582	MS^2[582]: 462 (100), 436 (9), 342 (7); MS^3[462]: 342	N^1, N^5, N^{10}-*tri-p*-coumaroylspermidine[a,d,f,h]	0,32±0,00
16	24,1	291, 308sh	582	MS^2[582]: 462 (100), 436 (10), 342 (6); MS^3[462]: 342	N^1, N^5, N^{10}-*tri-p*-coumaroylspermidine[a,d,f,h]	0,20±0,00
17	26,4	299, 307	582	MS^2[582]: 462 (100); MS^3[462]: 342	N^1, N^5, N^{10}-*tri-p*-coumaroylspermidine[a,d,f,h]	0,89±0,02
18	27,4	299, 308	582	MS^2[582]: 462 (100), 436 (10), 342 (6); MS^3[462]: 342	N^1, N^5, N^{10}-*tri-p*-coumaroylspermidine[a,d,f,h]	0,10±0,00

VI.2 Activité antioxydante de l'EAPF

Le Tableau 12 résume les résultats de la quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes et de la propriété antioxydante de l'EAPF.

La capacité antioxydante totale était de l'ordre de 56,92 ± 0,21 mg EAA/g de pollen frais. En termes de polyphénols totaux, l'échantillon contenait 44,96 ± 0,51 mg de EAG/g; cependant, le taux de flavonoïdes étaient de l'ordre de 2,73 ± 0,07 mg EQ/g de pollen frais.

Pour le pouvoir antiradicalaire, le test DPPH, indique que l'EAPF possède une activité moins significative par rapport au BHT avec une IC_{50} de (0,39 ± 0,13 mg/mL), tandis que le test du pouvoir réducteur (PR) a montré une activité chélatrice avec une IC_{50} de (0,54 ± 0,53 mg / mL).

Tableau 12: contenu en polyphénols, flavones et flavonols, et activité antioxydante totale

Extrait/standards	DPPH IC_{50} (mg/mL)	Pouvoir réducteur IC_{50} (mg/mL)	polyphénols totaux (mg EAG/g)	Flavones et flavonols (mg EQ/g)	Capacité antioxydante totale (mg EAA/g)
EAPF	0,39±0,13	0,54 ± 0,53	44,96 ± 0,51	2,73 ± 0,07	56,92 ± 0,21
BHT	0,021 ± 0,01	-	-	-	-
Acide ascorbique	-	0,03 ± 0,07	-	-	-

VI.3 Effet de l'AEFBP sur le débit urinaire

L'excrétion urinaire a été mesurée au jour 1, 7, 15, 21 et 30 du traitement. Selon les résultats présentés dans le Tableau 13, le débit urinaire n'a pas changé de manière significative après le traitement avec de l'eau distillée. En revanche, l'administration orale de l'EAPF à la dose de 100, 250 et 500 mg / kg de poids corporel a montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du débit urinaire de façon dose dépendante.

Le traitement par 100 mg/kg d'EAPF a induit une élévation significative du débit urinaire à partir du jour 7 ($p < 0,01$). Cette augmentation a été conservée jusqu'au dernier jour du traitement. Après 30 jours, le débit urinaire est passé de 4,5 ± 0,22 à 20,5 ± 0,87 mL/24 h (augmentation de 267%). Pour la dose de 250 mg/kg PC, le débit urinaire est passé de 4,25 ± 0,54 à 20,5 ± 1,78 mL/24 h (augmentation de 273%). Cependant, la dose la plus élevée (500 mg/kg PC) a induit l'effet le plus important avec une augmentation de 309%; le débit urinaire dans ce groupe est passé de 4,53 ± 0,78 à 22,5 ± 1,92 mL/24 h. Le furosémide a induit une augmentation très significative du débit urinaire ($p < 0,001$) par rapport au groupe contrôle, cette augmentation reste moins importante par rapport à l'EAPF à différentes doses.

Tableau 13: Débit urinaire (mL /24h) après administration orale quotidienne de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée (moyenne ± SEM)

Traitements	Débit urinaire (mL/24h)				
	Jour-0	Jour-7	Jour-15	Jour-21	Jour-30
Contrôle	5 ±0,75	5,5 ±2,32	4,5 ±0,24	5,25 ±0,75	5,5 ±0,34
Furosémide	4,25±0,4	7,5±0,23**	9±0,18***	12,75±0,24***	13,25±0,32***
EAPF-100mg	4,5±0,22	7±0,42	16±0,32***+++	19±0,67***+++	20,5±0,87***+++
EAPF-250mg	4,25±0,54	9±0,87***	18±1,56***+++	19,5±1,67***+++	20,5±1,78***+++
EAPF-500mg	4,53±0,78	10±1,13***++	18,5±1,65***+++	20±1,78***+++	22,5±1,92***+++

*Comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. +Comparaison entre le groupe furosémide avec les différentes concentrations de l'EAPF **p < 0,01, ***p < 0,001.+++p < 0,001

VI.4 Effet de l'EAPF sur l'excrétion urinaire des électrolytes

Les données contenues dans le Tableau 14 résument les résultats de l'effet de l'eau distillée, de l'EAPF et du furosémide sur la clairance urinaire du sodium, des chlorures et du potassium. Le furosémide et les trois doses de l'EAPF ont montré une augmentation significative (p <0,001) de la clairance urinaire du sodium, des chlorure et du potassium par rapport au contrôle. Cependant, l'excrétion du sodium était dose-dépendante, de l'ordre de 180,5 ± 3,4 mmol/l pour la première dose (100 mg/kg PC), 347 ± 6,6 mmol/l pour la deuxième dose (250 mg/kg PC), et 410 ± 8,6 mmol/l pour la dernière dose (500 mg/kg de poids corporel).Pour le furosémide, l'augmentation était de l'ordre de 147,8 ± 5,9 mmol/l.

De plus, l'administration orale de l'EAPF pendant 4 semaines a provoqué une augmentation significative de la kaliurèse par rapport au groupe contrôle. Pour la première dose (100 mg/kg PC) l'augmentation était de l'ordre de 158,5 ± 4,21 mmol/l, 181,15 ± 4,32 mmol/l pour la deuxième dose (250 mg/kg PC) et 238,3 ± 5,21 mmol/l pour la dernière dose (500 mg/kg PC).Le traitement par le furosémide a également induit une augmentation de la kaliurèse (160,8±4,11 mmol/l) par rapport au groupe contrôle (62,90±2,32 mmol/l).

De même que le potassium, les chlorures urinaires ont augmenté significativement après le gavage par l'EAPF pendant 30 jours. Cette excrétion est de l'ordre de 99,0 ± 3,5 mmol/ pour le groupe témoin, 224,5 ± 5,6 mmol/l pour le groupe (100 mg/kg PC) de l'EAPF, 310±7,2 mmol/l pour le deuxième groupe (250 mg / kg de poids corporel) et 312,0±6,45 mmol/l pour le dernier groupe (500 mg/kg PC), alors que le groupe furosémide a excrété 198,0 ± 4,9 mmol/l d'ions chlorure (Tableau 14).

Tableau 14: Effet de l'administration orale des trois dose de l'EAPF du furosémide et de l'eau distillée sur le taux urinaire de la créatinine, de l'urée, du sodium, du potassium et des chlorures chez le rat (moyenne ± SEM)

Traitements	Urée (g/L)	Créatinine (mg/L)	Électrolytes urinaires (mmol/L)			Indice Salurétique		
			Sodium	Potassium	Chlorure	Sodium	Potassium	Chlorure
Contrôle	12,89±3,12	47±2,7	108±12,7	62,90±2,32	99,0±3,5	1	1	1
Furosémide	25,76±2,12***	53,4±1,9*	147,80±5,9*	160,8±4,11	198±4,9	1,36***	2,55***	2***
EAPF-100mg	27,16±2,12***	59,6±2,42***+	180,5±3,4***+	158,5±4,21***+++	224,5±5,6***+++	1,67***+++	2,51***+++	2,51***+++
EAPF-250mg	26,89±2,43***	60,2±1,45***++	347±6,6***+++	181,15±4,32***+++	310±7,2***+++	3,21***+++	2,87***+++	3,13***+++
EAPF-500mg	29,85±3,23***	62,8±3,29***++	410±8,6***+++	238,3±5,21***+++	312±6,45***+++	3,79***+++	3,78***+++	3,15***+++

*Comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. +Comparaison entre le groupe furosémide avec les différentes concentrations de l' EAPF **p < 0,01, ***p < 0,001.+++p < 0,001

VI.5 Effet de l'EAPF sur la clairance de la créatinine

l'EAPF et le furosémide ont entraîné une augmentation significative de la clairance de la créatinine le dernier jour du traitement par rapport à la valeur initiale et au groupe témoin. Cette augmentation est plus importante chez les groupes traités avec de l'EAPF à des doses différentes par rapport au groupe furosémide, et l'effet le plus élevé a été attribué à la dose la plus élevée (Tableau 15).

Tableau 15: Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur la clairance de la créatinine (mL/min) chez des rats normaux (moyenne ± SEM).

Traitements	Jour 1	Jour 30
Contrôle	0,032±0,002	0,035±0,001
Furosémide	0,027±0,001	0,096±0,002***
EAPF-100mg	0,029±0,001	0,163±0,001***+++
EAPF-250mg	0,027±0,001	0,171±0,001***+++
EAPF-500mg	0,029±0,001	0,196±0,003***+++

*Comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. +Comparaison entre le groupe furosémide avec les différentes concentrations de l'EAPF **p < 0,01, ***p < 0,001.+++p < 0,001

VI.6 Effet de l'EAPF sur les électrolytes plasmatiques

Par rapport au groupe témoin, l'administration de l'EAPF pendant 4 semaines n'a provoqué aucune modification significative des concentrations plasmatiques de créatinine, de l'urée, du potassium, des chlorures et de sodium. Cependant, le furosémide a conduit à une diminution significative des niveaux de chlorures plasmatiques et de potassium (Tableau 16).

Tableau 16: Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur les électrolytes plasmatiques chez des rats normaux (moyenne ± SEM)

Traitements	Taux d'électrolytes plasmatiques (mmol/l)			Urée (g/l)	Créatinine (g/l)
	Sodium	Potassium	Chlorures		
Contrôle	164,5±6,36	5,7±0,23	102,5±5,12	0,5±0,02	5±0,26
Furosémide	160,2±7,71	3,9±0,3***	99,75±4,1	0,49±0,02	5,1±0,31
EAPF-100mg	156±6,41	5,5±0,29+++	104±2,82	0,52±0,03	5,2±0,30
EAPF-250mg	163,5±7,67	5,4±0,27+++	106,5±3,12	0,52±0,02	5±0,30
EAPF-500mg	167±8,48	5,2±0,2+++	111±2,56	0,51±0,04	5±0,21

*Comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. +Comparaison entre le groupe furosémide avec les différentes concentrations de l'EAPF **p < 0,01, ***p < 0,001.+++p < 0,001

VI.7 Effet de l'EAPF sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre

Par rapport au groupe témoin et après 4 semaines de traitement, l'EAPF et le furosémide ont provoqué une augmentation significative de la clairance osmolaire, de la clairance de l'eau libre et de l'osmolarité urinaire ($p < 0,001$).Cette augmentation était plus importante dans les groupes traités avec les différentes doses de l'EAPF que dans le groupe furosémide, avec un effet dose dépendant. Par conséquent, aucun effet significatif de l'EAPF ou du furosémide n'a été trouvé sur l'osmolarité plasmatique (Tableau 17).

Tableau 17 : Effet de l'administration orale de l'EAPF, de furosémide et de l'eau distillée sur l'osmolarité urinaire, l'osmolarité plasmatique, la clairance osmolaire et la clairance de l'eau libre chez des rats normaux (moyenne ± SEM)

Traitements	Osmolarité plasmatique (mOsm/kg)	Osmolarité urinaire (mOsm/kg)	C_{osm} (µl/min)	C_{H2O} (µl/min)	TC_{H2O} (µl/min)
Contrôle	329±12,67	555,8±38,27	6,45±1,31	- 2,63±0,31	2,63±0,31
Furosémide	320,4±22,54	1044,8±34,71***	30±9,82**	-20,8±9,31***	20,8±9,31***
EAPF-100mg	312±17,74	1128,9±31,92***	51,51±16,22***++	-37,27±8,74***	37,27±8,74***+
EAPF-250mg	327±21,62	1502,6±54,11***+++	65,41±14,71***+++	-51,18±9,87***+++	51,18±9,87***+++
EAPF-500mg	334±19,32	1792,1±61,62***+++	83,84±11,21***+++	-68,21±12,31***+++	68,21±12,31***+++

*Comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. +Comparaison entre le groupe furosémide avec les différentes concentration de l' EAPF **p < 0,01, ***p < 0,001, +++p < 0,001

VII. Discussion

Cette étude vise à évaluer l'effet antioxydant et diurétique de l'administration orale de l'EAPF chez des rats Wistar normotensifs. Plusieurs études scientifiques récentes ont discuté l'importance des composés phénoliques dans plusieurs pathologies en raison de leur large éventail de propriétés, telles que l'activité antimicrobienne, anti-hyperlipidémiques, anti-inflammatoires, immunorégulatrice et antidiabétiques. Cependant, la propriété antioxydante est l'activité principale de ces composés et la plus révélée en raison de son contenu en flavonoïdes largement présents dans l'alimentation humaine[283,436].

Le pollen d'abeilles frais contient une grande quantité de biomolécules telles que les flavones et les flavonols, qui sont les constituants les plus importants des produits dérivés des plantes et des abeilles. Cependant, les conditions climatiques telles que le type de sol, les conditions météorologiques et les origines géographiques et botaniques sont des facteurs influençant la composition chimique du pollen ainsi que d'autres facteurs tels que les activités des apiculteurs [1,437].

VII.1 Caractérisation chimique par LC / DAD / ESI-MS^n

L'analyse chimique de l'échantillon de pollen d'abeilles frais Marocain a permis la détection de 19 composés y compris des dérivés de flavonols et de spermidines (Tableau 11 et Figure 31). La confirmation positive de la quercétine-3-O-rutinoside (pic 2, *m/z* 609), du kaempférol-3-O-rutinoside (pic 4, *m/z* 593), de la quercétine-3-O-glucoside, de l'isorhamnétine-3- L'O-rutinoside (pic 5, *m/z* 623), l'acide ellagique (pic 10, *m/z* 301) et la lutéoline (pic 13, *m/z*285) a été réalisée en tenant compte du temps de rétention, du profil UV-Vis et du profil MS des standards commerciaux.

Pour les composés restants, il était important d'interpréter les voies de fragmentation détectées dans les spectres MS^n avec celles disponibles dans la littérature et de les combiner avec les informations spectrales des UV. L'identification des fractions sucre des flavonoïdes a été faite en considérant que le sucre est le plus commun dans la nature et donc attribué aux pentosides, glucosides, rutinosides et glucuronides.

Il importe de noter le grand nombre de flavonols glycosylés dans le pollen d'abeilles frais Marocain. Le MS^2 du [MH] - à *m/z* 625 (pic 1) a montré un ion à *m/z* 317 (-308 Da) compatible avec une perte d'un désoxyhexosyl-hexoside à partir d'un fragment myricétine, très probablement dans la positionC_3, étant attribué au composé comme myricetin-3-O-rutinoside [285]. Les pics 2 et 14a ont été identifiés comme des dérivés de quercétine en raison de l'ion produit observé à *m/z* 301 et du spectre UV caractéristique avec UV max à 257 et 354 nm. Le

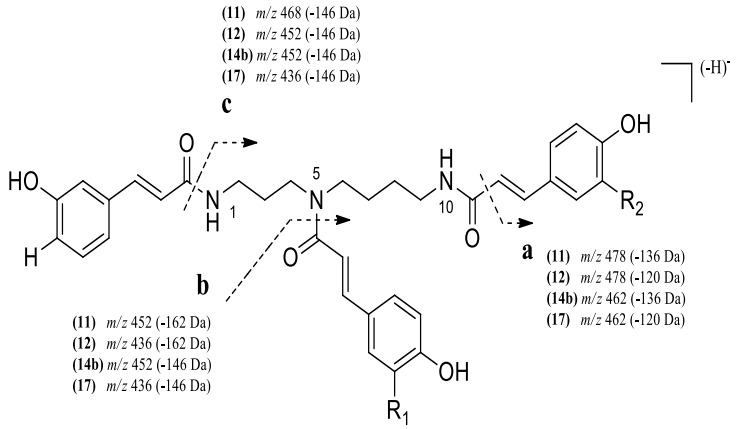
spectre MS^2 du composé 2, avec *m/z* 625, présentait la perte principale d'un résidu hexoxyl-hexoside (*m/z* 301; -324 Da), permettant l'identification en tant que quercétine-hexosyl-hexoside, très probablement une fraction diglucoside [438]. Le pic 14a a été attribué à la quercétine-3-O-méthyl-éther, où il était possible d'observer une [M-H-CH_3] production significative typique des flavonoïdes méthylés [433].

La voie de fragmentation montrée par la production principale dans les pics 6 et 8 (*m/z* 315) et les données UV (255 et 355 nm) étaient compatibles avec l'Isorhamnétine. Au pic 6, le spectre MS^2 indique une perte de 294 Da correspondant à un pentosyl-hexoside lié entre eux, alors qu'au pic 8, la production était formée par la perte de 162 Da, ce qui est indicatif à une unité glucoside.

Le pic 7 a montré un UVmax à 266 et 350 nm et un ion pseudo-moléculaire [MH] - à *m/z* 636. Le MS^2 a produit un fragment à *m/z* 284 avec une perte de 351 Da, ce qui indique une fraction diglucuronide lié au Kaempférol[439,440]. Parmi les flavonoïdes détectés, les dérivés de la quercétine sont les principaux composés (1,89 mg/g de pollen frais), ce qui est en accord avec la littérature où le pollen d'abeilles est rapporté être riche en dérivés de quercétine par rapport aux flavonols restants [441].

Un autre groupe important de composés détectés dans cet échantillon était les spermidines, qui sont des phénolamides, c'est-à-dire des amines biogènes N-acylées conjuguées à des acides phénoliques, qui sont principalement des amides d'acide Hydroxycinnamique[442]. Les groupes polyamine amino peuvent présenter divers degrés de saturation, se produisant sous forme de mono- ou poly-substitution avec des acides hydroxycinnamiques identiques ou différents[443]. Les spermidines sont les principaux constituants phénoliques des organes reproducteurs et des grains apparentées dans tout le règne végétal. Plusieurs dérivés de la spermidine ont été détectés dans cet échantillon de pollen d'abeilles frais Marocain, notamment le N^1-p-coumaroyl-N^5, N^{10}-dicaffeoylspermidine (pic 11), N^1, N^{10}-di-p-coumaroyl-N^5-caffeoylspermidine (pic 12), N^1, N^5-di-p-coumaroyl-N^{10}-caffeoylspermidine (14b), et N^1, N^5, N^{10}-tri-p-coumaroylspermidine et ses trois isomères (15, 16, 17 et 18, respectivement) (Tableau 11 et Figure 30). Les modèles de fragmentation des spermidines identifiées sont illustrés dans la Figure 31, et les identités ont été provisoirement attribuées lors de la comparaison avec les données disponibles dans la littérature. Tous les dérivés de la spermidine ont montré un spectre UV spécifique des phénolamides avec un UV max autour de 298 et 209 nm [443]. Le spectre ESI-MS^2 du pic 11 a indiqué un ion [MH] - à 478 attribué à la perte de 136 Da du résidu d'acide caféique, formé à partir du clivage dans la voie de fragmentation (Figure 32a), indiquant la substitution de N^{10} par un groupement caféoyle[438]. Un ion majeur à *m/z* 452 (-162 Da)

pourrait être attribué à la perte préférentielle d'un autre résidu caféoyle à N^5 comme précédemment observé, par voie de fragmentation (Figure 32b) [444]. Le signal à *m/z*468 pourrait provenir du clivage de la liaison amide entre le résidu coumaroyle et le groupement spermidine, comme le montre la voie de fragmentation (Figure 31c) indiquant la substitution de N^1 par un autre groupe coumaroyle. Le composé du pic 11 a été provisoirement identifiée comme N^1-p coumaroyl-N^5, N^{10}-dicaféoylspermidine. Les mêmes modèles de fragmentation ont été observés pour les composés dans les pics 12, 14b et 15-18 (Figure 31) avec des différences respectives corrélées avec le type de groupements hydroxycinnamoyle, p-coumaroyle ou caféoyle, liés aux différents groupes aminés dans les molécules. Les pics 15-18 ont indiqué le même ion pseudo-moléculaire à *m/z* 582, soulignant qu'ils pourraient correspondre à différents isomères N^1, N^5, N^{10}-tri-p-coumaroylspermidine. L'isomère de ce dernier composé présent au pic 17 était l'un des plus abondants, avec une concentration de 0,89 mg/g de pollen frais, générant aux spermidines un total de 1,75 mg/g de pollen frais.



(11) $R_1 = R_2 = OH$; N^1-*p*-coumaroyl-N^5, N^{10}-dicaffeoylspermidine
(12) $R_1 = OH$, $R_2 = H$; N^1, N^{10}-di-*p*-coumaroyl-N^5-caffeoylspermidine
(14b) $R_1 = H$, $R_2 = OH$; N^1, N^5-di-*p*-coumaroyl-N^{10}-caffeoylspermidine
(17) $R_1 = R_2 = OH$; N^1, N^5, N^{10}-tri-*p*-coumaroylspermidine

Figure 32: Schéma de fragmentation ESI-MS2 des dérivés de spermidine identifiés dans le pollen d'abeilles frais Marocain

Les spermidines, en particulier les dérivés tri-substitués, sont largement présentes dans les organes reproducteurs de nombreuses plantes supérieures, étant signalées dans le pollen de différentes familles de plantes telles que *Malus domestica* [443], *Quercus dentata* [445],

Helianthus annuus[446], *Arachis hypoEAGa* [447], *Sambucus nigra* [448], *Hippeastrumx hortorum* [449] et *Ambrosia artemisiifolia L*. [438].

VII.2 Activités antioxydantes et diurétiques de l'EAPF

Les résultats du dosage du contenu en polyphénols totaux rejoignent ceux de la caractérisation chimique par LC / DAD / ESI-MS^n et montrent que l'EAPF contient une quantité considérable de phénols totaux (44,96 ± 0,51 mg EAG/g). De nombreuses études ont montré que le pollen d'abeilles récolté dans différentes régions de la Turquie contient également un taux important de flavonoïdes et d'acides phénoliques et possède une forte activité antioxydante. Les valeurs les plus élevées de composés phénoliques totaux ont été trouvées dans les pollens de châtaignier (174,6± 20 mg EAG/g) [432]. Nos résultats ont révélé une activité antioxydante totale et une teneur en flavonoïdes élevées de l'EAPF examiné.

Pour évaluer l'effet diurétique de l'EAPF, nous avons utilisé le furosémide comme médicament de référence pour comparer son effet avec l'effet diurétique de notre échantillon. Comme nous avons vu précédemment, les diurétiques sont largement connus dans le traitement de l'accumulation de liquide causée par certaines maladies telles que l'hypertension artérielle et les maladies cardiaques ou rénales en augmentant le taux d'élimination de l'urine [389,450]. L'excrétion de Na^+ qui est un déterminant majeur du volume de liquide extracellulaire de haute importance dans les diurétiques cliniques [418].

Les trois doses de l'EAPF utilisées dans cette étude ont montré un effet puissant sur l'augmentation du débit urinaire. L'effet était encore plus important que le médicament standard (furosémide).Une augmentation significative de l'élimination urinaire des électrolytes tels que le sodium, le potassium et les chlorures a été observée d'une manière dose-dépendante sans avoir modifié les taux des électrolytes plasmatiques. Ces résultats sont similaires à l'étude d'El-Guendouz et al. où il ont rapporté que le miel de *capparis spinosa* et sa coadministration avec la propolis ont provoqué un effet diurétique significatif caractérisé par une augmentation du volume urinaire et une élimination importante des électrolytes, sans modification de leur taux plasmatique [451].

En outre, l'administration orale et quotidienne de l'EAPF a provoqué une augmentation significative de l'excrétion de l'urée et de la clairance de la créatinine. Ces résultats corroborent ceux d'El Menyiy et al. qui ont démontré que les extraits de *Silybum marianum L*. et de *Cistus ladaniferus L* ont induit une augmentation de la clairance de la créatinine ainsi qu'une élimination importante de l'urée [452]. Ces résultats suggèrent un effet potentiel du pollen

d'abeilles frais dans le cas des insuffisances rénales aiguës ou chroniques à travers l'augmentation de la clairance de la créatinine.

Généralement, la diurèse est caractérisée par deux événements : l'augmentation de l'excrétion de l'eau (débit urinaire) et l'augmentation de l'élimination des électrolytes osmoactifs, exactement comme il est observé dans le mécanisme d'action du furosémide, qui augmente le débit urinaire et l'élimination du sodium en bloquant le cotransporteur électroneutre Na/K/2Cl dans la branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé. Cependant, une hypokaliémie peut souvent survenir lors d'un traitement par le furosémide. Compte tenu que le potassium est un élément qui joue un rôle clé dans le potentiel membranaire de toutes les cellules, toute diminution de sa concentration plasmatique peut avoir des effets délétères sur tous les systèmes. Cliniquement les anomalies de la kaliémie sont d'une importance majeure du fait qu'elles exposent aux troubles du rythme cardiaque sévères [453]. Par conséquent, un apport du potassium suffisant est nécessaire dans le cas du traitement par le furosémide [454,455].

Nos résultats ont révélé d'une part, une élimination importante des électrolytes dans une grande quantité des urines, ce qui lui a conféré la propriété de « diurétique » par définition. D'autre part, dans le compartiment sanguin aucun changement n'a été détecté concernant les électrolytes plasmatiques notamment le taux de potassium qui est resté stable jusqu'à la fin du traitement.

Nos résultats suggèrent un effet cardioprotecteur du pollen frais contre les troubles cardiaques induits pas l'utilisation des diurétiques. Cet effet est peut être lié à la composition du pollen frais riche en micronutriments, et en éléments minéraux [6] comme le potassium, le calcium et le magnésium susceptibles d'être perdues lors d'une altération de la réabsorptions des électrolytes au niveau du rein pendant une thérapie par les diurétiques.

Le mécanisme impliqué dans l'effet diurétique de l'EAPF n'est pas encore clair, cependant, son effet est similaire à celui des diurétiques de l'anse car il a augmenté l'élimination urinaire du potassium et du sodium comme le furosémide. L'effet conservateur du potassium plasmatique est comparable avec celui des diurétiques d'épargne potassique.

La composition phénolique du pollen frais démontrée par la présente étude suggère un autre mécanisme impliquant l'effet antioxydant des flavonoïdes. Les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, peuvent améliorer le taux de filtration glomérulaire en augmentant le flux sanguin rénal, favorisant ainsi une augmentation de la formation d'urine [450,456,457].

Actuellement, il est bien évident que le stress oxydatif joue un rôle primordial dans l'installation de l'hypertension artérielle. Le système vasculaire est une riche source de NADPH oxydase qui produit la plupart des ROS et joue un rôle important dans le dysfonctionnement rénal et

provoquent des lésions endothéliales. Cette pathogénèse est associée à une production accrue de pro-oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anion superoxyde, une réduction de la synthèse de NO (vasodilatateur endothéliale) et une diminution de la biodisponibilité des antioxydants. [458].

De nombreuses études ont associé la consommation d'aliments riches en flavonoïdes avec un risque plus faible d'événements cardiométaboliques. Au niveau de l'endothélium, les flavonoïdes exercent leurs effets vasorelaxants via l'augmentation des niveaux de NO, ou via la diminution du stress oxydatif par la diminution de la production des ROS ou encore leur élimination. L'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) induisant leur dilatation est aussi un effet attribué aux flavonoïdes [428].

Il existe toute une panoplie de molécules phénoliques actives avec un effet antihypertenseur résumé dans la Figure 33 [428], concernant notre étude, nous allons se focaliser sur 3 molécules principalement et majoritairement isolées à partir de l'EAPF. La lutéoline, un flavone identifié dans notre échantillon est connu pour réduire la pression artérielle et la vasorelaxation de l'aorte et la relaxation des VSMCs via l'activation des canaux k^{+}/ca^{2+} et l'augmentation de l'eNO qui augmente le taux de NO dans les cellules endothéliales après une cascade de réactions cellulaires [459,460].

La quercétine est un flavonol aussi largement identifié dans notre échantillon, le mécanisme moléculaire impliqué dans son effet antihypertenseur est compliqué et cible différentes molécules sur différents niveaux vasculaires. En résumé, l'effet de la quercétine est dû à sa capacité à améliorer la fonction endothéliale, à moduler le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et à moduler la contractilité des VSMCs, elle exerce ses effets en augmentant l'eNOS aortique et les taux plasmatiques de NO, elle peut agir sur les canaux k+/ca2+ pour induire une hyperpolarisation et donc une vasorelaxation. La quercétine est démontrée avoir un effet antioxydant au niveau du cœur et du rein via l'inhibition des sous unités de NADPH oxydase [461–464]. Le Kaempférol est un autre flavonol contenu dans notre échantillon est connu avoir un effet antihypertenseur prononcé, il exerce son effet via la diminution de la pression sanguine et la dilatation de l'aorte. Ce mécanisme repose sur le blocage des canaux calciques voltage dépendants cav3 responsables de la diminution de la biodisponibilité du NO endothélial [465,466].

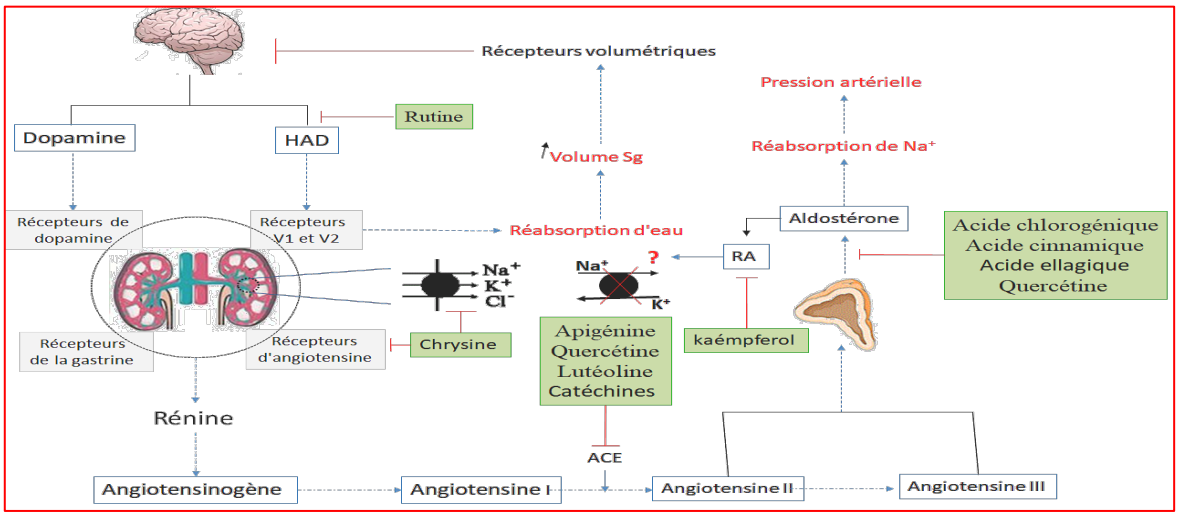


Figure 33: Mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet antihypertenseur des différents composés phénoliques du pollen d'abeilles

Ces évidences scientifiques attribuent à notre pollen d'abeille frais non seulement un effet antihypertenseur accentué mais aussi un effet cardio et néphroprotecteur intéressant, ce qui pourrait représenter un avantage thérapeutique du pollen frais qui n'est pas offert par les médicaments diurétiques actuels.

VIII. Conclusion

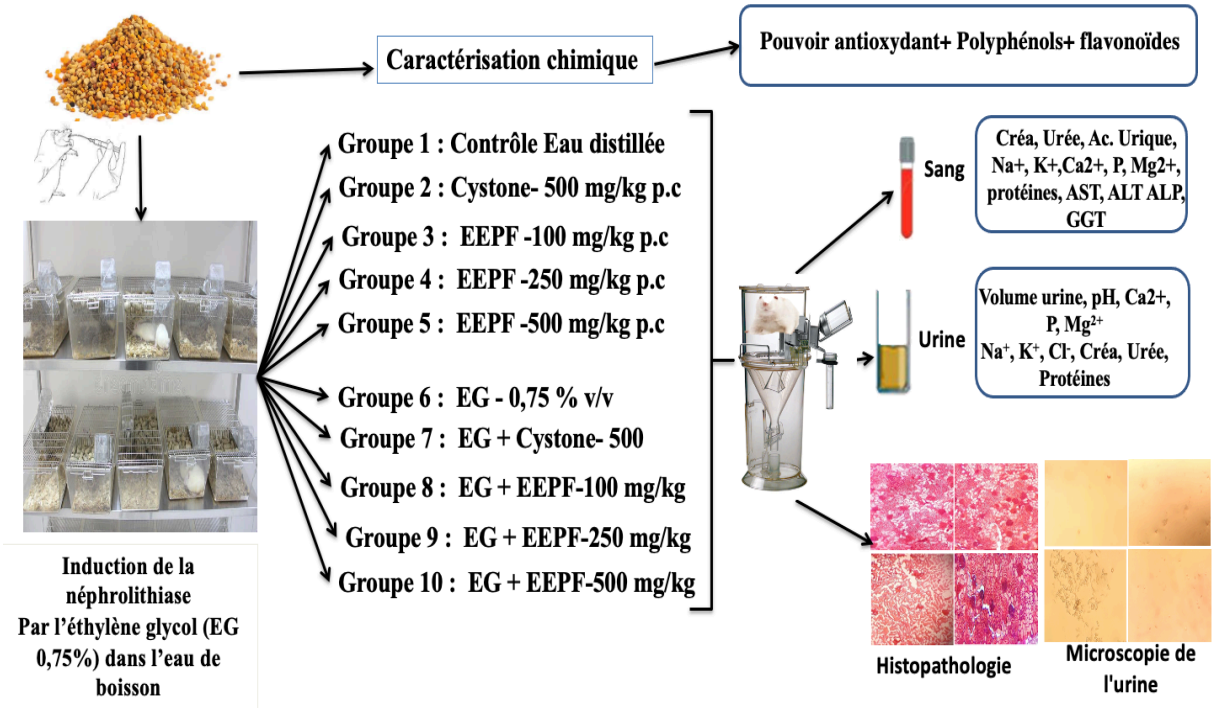
La composition du pollen d'abeilles frais Marocain a été déterminée, présentant une quantité élevée de flavonols et de dérivés de spermidine. Les principaux flavonols étaient le diglucoside de quercétine et le kaempférol-3-O-rutinoside, tandis que N^1, N^5, N^{10}-tri-p-coumaroylspermidine était le principal dérivé de spermidine détecté dans notre échantillon. Cette étude est considérée comme la première à évaluer le pouvoir antioxydant et l'effet du pollen frais sur la diurèse par rapport au furosémide. L'administration orale de trois doses d'AEFBP a montré une augmentation significative du débit urinaire de 24 h après le traitement. De plus, le traitement avec notre extrait a augmenté d'une manière dose dépendante, l'élimination urinaire du sodium, du potassium et des chlorures sans avoir affecté la kaliémie en fonction de la dose et a provoqué une augmentation de l'osmolarité urinaire. Cette activité diurétique puissante semble être directement liée aux constituants antioxydants élevés, tels que les flavonols largement contenus dans notre extrait ce qui fait de notre pollen un diurétique naturel par excellence. D'autres essais cliniques sont nécessaires pour étudier l'effet diurétique du pollen d'abeilles Marocain et ses utilisations médicales dans le traitement des pathologies rénale et cardiaque causées par le stress oxydatif.

Chapitre 4 : Effet protecteur du pollen d'abeilles dans les lésions rénales aiguës, la protéinurie, la cristallurie et les lésions hépatiques aiguës induites par l'ingestion d'éthylène glycol chez le rat

Résumé

Objectif : Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel antioxydant et l'effet protecteur de l'extrait hydroéthanolique du pollen d'abeilles frais EEPF contre la cristallurie, les lésions rénales et hépatiques induites par l'éthylène glycol (EG). ***Matériel et méthodes*** *:* Dix groupes de rats (n=6) ont été utilisés. Le groupe 1 a reçu de l'eau potable, le groupe 2 a reçu du cystone (500 mg/kg PC) et les groupes 3, 4 et 5 ont reçu l'EEPF à des doses de 100, 250 et 500 mg/kg PC , respectivement. Les groupes 6, 7, 8, 9 et 10 ont reçu de l'EG en ajoutant de l'EG (0,75 %) dans l'eau potable. De plus, le groupe 7 a reçu de la cystone et les groupes 8, 9 et 10 ont reçu l'EEPF aux mêmes différentes doses. Les interventions ont été administrées quotidiennement pendant 30 jours. Au jour 30, des échantillons de sang et d'urine ont été prélevés pour analyse. Les reins ont été prélevés pour étude histopathologique. L'activité antioxydante de l'EEPF a été évaluée et son contenu en polyphénols et flavonoïdes a été déterminé. ***Résultats*** *:* L'EG a significativement augmenté le pH, le volume urinaire, le calcium, le phosphore, l'acide urique et l'excrétion de protéines ainsi que les enzymes hépatiques ($P<0,05$), et a provoqué une lésion rénale aiguë (LRA). Il a diminué le magnésium urinaire et provoqué une cristallurie. Le traitement avec l'EEPF ou cystone a atténué l'effet de l'EG, l'EEPF était plus puissant que le cystone ($P<0,05$). L'EEPF a augmenté le volume urinaire et le sodium, le magnésium et les chlorures urinaires et a diminué le potassium urinaire par rapport aux groupes témoins et traités par l'EG. L'EEPF a réduit l'excrétion urinaire des protéines et a amélioré considérablement la LRA, la cristallurie, les lésions hépatiques et les modifications histopathologiques du tissu rénal causées par l'EG. L'EEPF a montré une activité antioxydante et une teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes. ***Conclusion :*** Nos résultats montrent que l'EEPF peut améliorer la LRA, la toxicité hépatique, la cristallurie et la protéinurie induites par l'EG, et possède le potentiel de traiter et de prévenir les dépôts de calculs rénaux.

Mots clés **:** Pollen d'abeilles Marocain, Pollen d'abeilles, Éthylène glycol, Cristallurie, Cystone, Protéinurie, Lésion rénale aiguë, Foie.



I. Préface

L'urolithiase, est une forme de plus en plus courante de maladies rénales associées à des urolithes (calculs rénaux) ou concrétions minérales dans les calices et le bassin rénaux, trouvés libres ou attachés aux papilles rénales. Il est important de noter que le terme « urolithiase » ou encore « néphrolithiase » désigne l'ensemble des calculs urinaires formés ou situés n'importe où dans le système urinaire, y compris les reins et la vessie [467]. Ces calculs apparaissent lorsque l'urine devient excessivement sursaturée par rapport à un minéral, entraînant la formation, la croissance, l'agrégation et la rétention de cristaux dans les reins [468].

Le premier calcul urinaire remonte aux environs de 4800 ans avant Jésus-Christ où il été découvert par l'archéologue anglais E. Smith en 1901 lorsqu'il travaillait sur des momies de 4500 à 5000 ans à El Amrah, en Égypte. Les traitements des calculs ont été mentionnés dans les anciens écrits médicaux égyptiens de 1500 A.J [469].

De nos jours, l'urolithiase continue à être un problème de santé courant, présent dans le monde entier et à forte récurrence. Elle touche aussi bien les Hommes que les femmes. Environ 12% de la population mondiale est affectée par différentes formes d'urolithiase dont le taux de récurrence est de 47-60% chez les femmes et de 70-80% chez les Hommes [470].

L'épidémiologie de l'urolithiase diffère en termes de prévalence et d'incidence, en fonction de la zone géographique, la répartition par âge et par sexe la composition et la localisation des calculs. ces dernières années, l'épidémiologie des calculs urinaires ne cesse d'augmenter à raison de l'amélioration progressive des conditions sociales, et probablement des procédures de diagnostic clinique et de changements dans les facteurs nutritionnels et environnementaux en particulier dans les zones urbaines des pays développés les plus riches [471].

Au Maroc, qui est un pays toujours en développement, la prise en charge médicale n'est pas la même sur tout le territoire ainsi que les habitudes alimentaires qui se rapprochent de plus en plus de celles des pays industrialisés et qui changent d'une région à l'autre, de ce fait le profil épidémiologique des calculs rénaux au Maroc sera aussi différent d'une région à l'autre. Une étude réalisée sur des cas provenant de presque tout le Maroc (Meknès, Fès, Settat, Moyen Atlas, Nord Est et Sud du pays) s'est concentrée sur les facteurs impliqués dans l'épidémiologie des calculs urinaires, montre d'une part, une confirmation sur le profil épidémiologique des calculs Marocains qui se rapproche de celui des pays industrialisés (dominance masculine, localisation essentiellement haute, prépondérance de l'oxalate de calcium monohydraté), et d'autre part, une différence régionale entre la composition chimique de certains types de calculs. Ainsi, les calculs d'acide urique sont plus nombreux dans le moyen Atlas et les calculs

de phosphate de calcium, de magnésium et d'ammonium sont observés plus dans le Nord-Est et dans la région de Fès [472].

La présente étude vise à évaluer l'impact de l'EEPF sur la fonction rénale et son effet protecteur contre les lésions rénales aiguës, la cristallurie, la protéinurie et l'hépatotoxicité induites par l'EG chez le modèle animal. Les résultats ont été comparés avec le cystone, de plus, la teneur en antioxydants et l'activité de l'EEPF ont été étudiées.

II. Étiologie et Facteurs de risque de l'urolithiase

Il est difficile de définir exactement quels sont les facteurs de risque, et comment et quand ils agissent chez un patient donné pour la formation d'un calcul, mais il est évident que la lithiase urinaire est un trouble multifactoriel résultant de l'influence combinée de nombreux facteurs prédisposant à la maladie [473,474]. Ces facteurs incluent des facteurs individuels tels que l'âge et le sexe où les Hommes sont plus disposés d'avoir les calculs que les femmes à cause de leur taux élevé du testostérone alors que les œstrogènes diminuent le risque de leur formation [475–477]. Les facteurs génétiques sont aussi des facteurs influençant l'apparition de l'urolithiase, où il a été suggéré que la prévalence des troubles monogéniques des calculs rénaux chez les patients souffrant d'une urolithiase et de plus de 15% [478].

l'influence de la géographie de la géochimie et de la composition minérale de l'eau sur la maladie des calculs est clairement rapportée et reflète généralement des facteurs de risque environnementaux, avec une prévalence plus élevée de calculs dans les climats chauds et arides, cette disparité est probablement lié au climat, la différence de race et de l'ethnie dans la prévalence des calculs sont aussi reconnus depuis bien longtemps [468,479,480].

De nombreuses maladies et facteurs systémiques ont été associés à un risque accru de calculs rénaux. Le syndrome métabolique, l'obésité, l'indice de masse corporelle, les maladies cardiovasculaires et le diabète ont été montrées dans de grandes études de cohorte prospectives en corrélation avec le risque d'incidents de calculs rénaux, avec un effet plus important chez les femmes que chez les Hommes dans certaines cohortes.

De nombreux chercheurs ont trouvé une relation cause-effet entre la maladie de la lithiase rénale et le stress oxydatif où ils ont démontré que l'exposition à des niveaux élevés d'oxalate et de cristaux d'oxalate de calcium peut induire une augmentation de la production des radicaux libres, une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution de l'état antioxydant cellulaire [481–483].

Les marqueurs majeurs du stress oxydant et de l'inflammation sont détectables dans l'urine des patients lithiasiques ainsi que des rats atteints de néphrolithiase (CaOx) induite

expérimentalement. Le cristal d'oxalate provoque des lésions cellulaires lorsqu'il y a une exposition prolongée à des niveaux élevés d'oxalate et d'oxalate de calcium. Il a été démontré que les mitochondries montrent une absorption excessive de calcium lorsque le niveau de du calcium libre cytoplasmique augmente de façon marquée, provoquant des anomalies dans la chaîne respiratoire et augmentant la production mitochondriale des ROS (espèces réactives de l'oxygène). La lésion des mitochondries induite par le calcium peut être évitée par les antioxydants, ce qui suggère que le stress oxydatif peut être un événement important dans son développement [484–486].

III. Nature chimique des calculs rénaux

Les principaux composants de la matrice de calculs représentent 2 à 3 % de leur poids sec total et sont constitués de macromolécules généralement présentes dans l'urine [487].

- ***Protéines*** : la matrice des calculs est composée principalement de 64 % de protéines. Une très longue liste de protéines a été identifié y compris Glycoprotéine de Tamm Horsfall la molécule urinaire la plus étudiée dans les recherche sur la néphrolithiase, elle est majoritairement présente dans les urines avec un grand poids moléculaire ce qui favorise son agrégation avec les carbohydrates présentes dans les urines ceci favorise la cristallisation du calcul [488].De nombreuses études ont montré qu'une variété de protéines urinaires inhibent la croissance cristalline du calcul et son agrégation. En fonction des conditions expérimentales, certains comme les mucoprotéines de Tamm-Horsfall peuvent inhiber la formation du calcul et aussi provoquer sa formation [489].

- ***Lipides :*** La matrice de tous les calculs examinés à ce jour, y compris la struvite, l'acide urique, le CaOx et le CaP, contient des lipides qui représentent 10,25 % de la matrice de calculs. Les phospholipides représentent 8,6 % des lipides totaux. Les membranes cellulaires et leurs lipides jouent un rôle essentiel dans le processus de calcification. Des phospholipides membranaires particuliers favorisent la formation d'oxalate de calcium et de phosphore de calcium et font partie de la matrice organique de la calcification croissante du calcul [490,491].

- ***Glycosaminoglycanes (GAG)*** **:** de nombreuses études ont déduit la présence des GAG dans la matrice des calculs avec un pourcentage de 0,19 et 0,58 % du poids d'un calcul [492]. D'autres études ont démontré que les GAG peuvent représenter jusqu'à 20 % du poids de la matrice [493] ce qui suggère qu'ils peuvent jouer une certaine fonction dans la formation des calculs.

La nature de la molécule urinaire affecte la masse du calcul déposé où la taille des particules cristallines produites peuvent influencer potentiellement la probabilité que les particules

cristallines soient retenues dans le système collecteur rénal et par conséquent, induire le développement de la maladie des calculs rénaux [494].

IV. Types de calculs rénaux

La variation de la composition des calculs rénaux reflète l'importance des facteurs constitutionnels, environnementaux et génétiques. L'analyse des calculs urinaires est actuellement réalisée par des méthodes physiques telles que la diffraction des rayons X (XRD) ou la spectroscopie infrarouge transformée de Fourier (FTIR).

L'analyse globale via ces méthodes classe les calculs comme étant principalement composés d'oxalate de calcium (CaOx), de phosphate de calcium ou calcium apatite (CaP), d'acide urique, de struvite et de cystine, qui représentent ensemble environ 98 % de tous les calculs urinaires présents, avec 80 % du total des calculs sont des calculs de calcium [495].

Ces méthodes permettent d'identifier la nature chimique des constituants du calcul et permettent également l'identification des phases cristallines du CaOx, à savoir le CaOx monohydraté (COM) et le CaOx dihydraté (COD) [496].

IV.1 Oxalate de calcium (CaOx)

Les cristaux d'oxalate de calcium (Figure 34) sont présents dans un grand nombre de plantes, y compris certaines utilisées comme aliments comme par exemple, les épinards contiennent à la fois de l'oxalate de calcium soluble et insoluble [497].

La formation d'urolithes d'oxalate de calcium se produit lorsque l'urine est sursaturée en calcium et en acide oxalique. La formation de ces urolithes est complexe et incomplètement comprise. Il existe des facteurs métaboliques connus pour augmenter la probabilité de formation d'urolithes d'oxalate de calcium. Ceux-ci comprennent l'hypercalcémie, l'hypocalciurie et l'acidose métabolique[498].

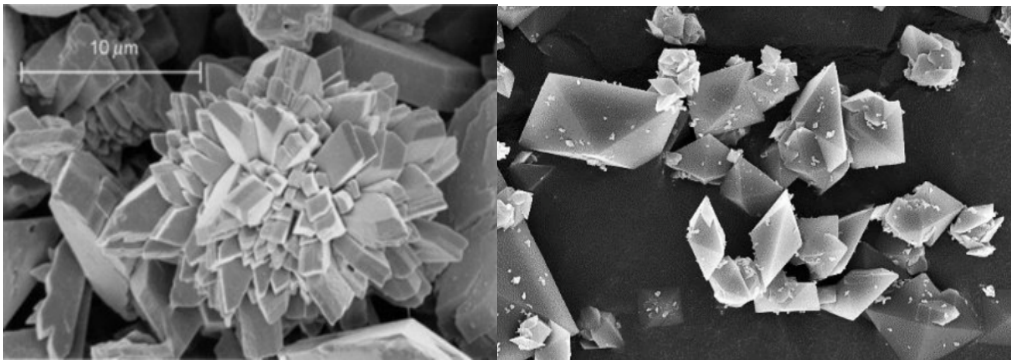


Figure 34: Oxalate de calcium vu par microscopie électronique à balayage (SEM) [499]

IV.2 Phosphate de calcium

Les calculs rénaux au phosphate de calcium (CaP) comprennent l'apatite ou la carboxyapatite ou l'hydroxylapatite (HAP), la brushite et le phosphate d'octa-calcium (OCP) (Figure 35). Le HAP est thermodynamiquement ,la forme la plus stable des cristaux de calcium avec le taux d'apparition d'apatite 4-10%, brushite 2-6% et phosphate d'octa-calcium moins de 1%. Le premier produit qui précipite est un phosphate de calcium amorphe, qui est ensuite converti en phases cristallines l'OCP et l'HAP ou occasionnellement en brushite[496].

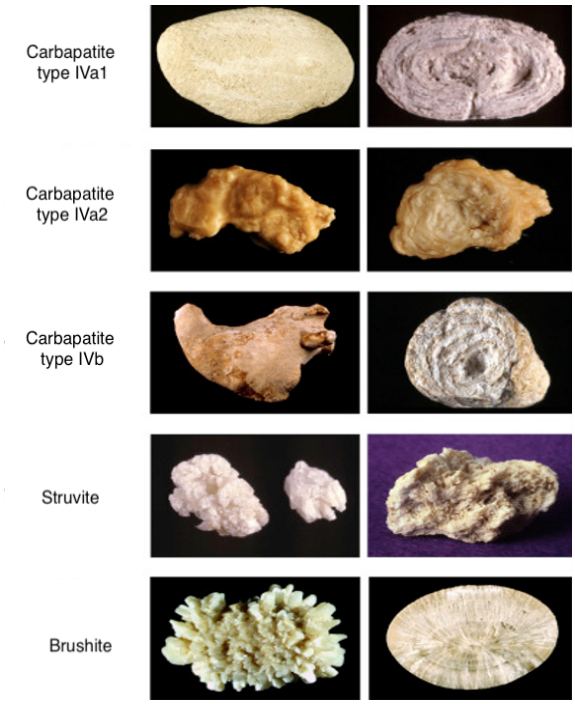


Figure 35: Différentes formes des calculs formés du phosphate de calcium (CaP) [496]

IV.3 Acide urique

Ces calculs sont formés principalement d'acide urique, qui est un sous-produit du métabolisme des protéines. Si le régime est riche en protéines, il peut conduire au développement de calculs d'acide urique. La goutte entraîne également des calculs de ce type. Certains facteurs génétiques ainsi que les troubles de la moelle osseuse influencent également sa formation.

Ces types de calculs sont lisses, ronds, jaune-oranges et presque radio-transparents sauf s'ils sont mélangés avec des cristaux de calcium ou de la struvite (Figure 36). Les régimes alimentaires riches en purines, en particulier ceux contenus dans la viande et le poisson, entraînent une hyperuricosurie qui, en combinaison avec un faible volume urinaire et un faible pH urinaire, peuvent exacerber la formation de calculs d'acide urique [496].

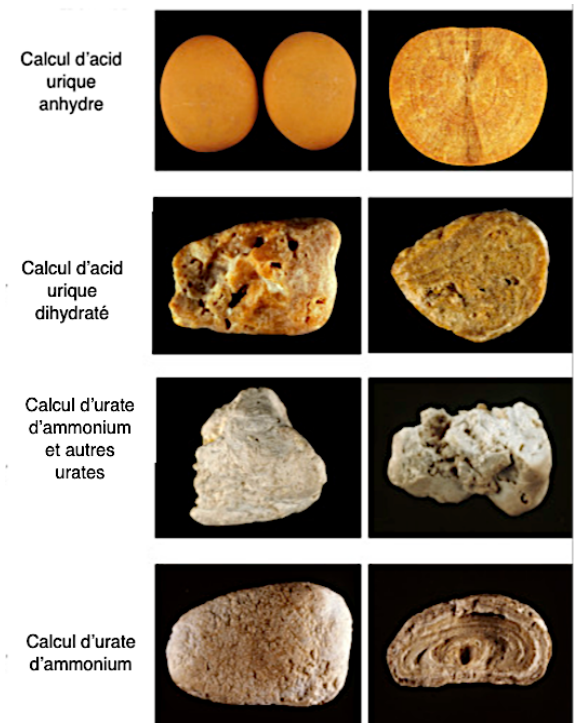


Figure 36: Différentes formes du calcul de l'acide urique [496]

Un défaut héréditaire dans le transport rénal des acides aminés a été impliqué comme cause des calculs de cystine. Avec une incidence de 1 sur 20000. C'est un trouble autosomique récessif où les personnes qui sont homozygotes pour la cystinurie excrètent plus de 600 mg par jour de cystine insoluble. Les calculs sont jaunes verdâtres, mouchetées de cristallites brillants, et sont modérément radio-opaques en apparence, leur apparition est la plupart du temps rare. La cystine est l'un des éléments constitutifs des muscles, des nerfs et d'autres parties du corps. Une accumulation excessive de cystine due à des facteurs diététiques inappropriés peut entraîner une cystinurie qui aboutit finalement à la formation de calculs.

Chez les enfants, la cystinurie provoque jusqu'à 10% de tous les calculs. La solubilité de la cystine est affectée par la concentration en cystine, le pH urinaire, la force ionique et les macromolécules urinaires; La collecte d'urine sur 24 heures montre une excrétion urinaire de cystine de 350 mg / jour à 500 mg / jour [500].

V. Lithogénèse ou formation des calculs rénaux

La lithogénèse des calculs rénaux humains ne peut pas correctement s'expliquer car ils sont trop divers et leur formation est trop complexe pour une compréhension simple. À l'aide de biopsies de tissus humains, d'imagerie peropératoire ils ont pu identifier au moins trois voies induisant la formation de ces calculs (saturation, précipitation nucléation et croissance ou aggrégation).

Généralement, le mécanisme de formation des calculs commence par la saturation, qui est la clé de la précipitation, et comprend la nucléation des cristaux constitutifs du calcul, leur croissance ou leur agrégation jusqu'à une taille susceptible d'interagir avec une structure intrarénale, leur rétention dans le rein ou le système collecteur rénal et une nouvelle agrégation et/ou nucléation secondaire pour former le calcul [501]. L'hyperoxalurie est le facteur le plus important impliqué dans la formation de calcul d'oxalate de calcium chez l'Homme[502,503]. Les autres facteurs qui augmentent le risque de formation de calcul sont l'hypercalciurie, l'hyperphosphatémie, l'hypocitraturie, l'hyperuricosurie, l'hypomagnésiurie, un pH et un débit urinaire faibles [504,505].

VI. Lithiase et lésions rénales aigues LRA

Il est bien connu que la néphrolithiase peut provoquer de nombreuses lésions rénales telle que l'insuffisance rénale aiguë (IRA) via une obstruction de l'écoulement urinaire, souvent associée à une détérioration rapide de la fonction rénale. Des lésions rénales irréversibles peuvent survenir si le drainage urinaire n'est pas corrigé à temps. Des études récentes suggèrent également que les patients atteints de néphrolithiase sont plus susceptibles de développer une maladie rénale chronique (MRC) [506]. Les troubles rénaux aigus et chroniques liés au dépôt ou à la formation de cristaux à l'intérieur du rein, sont appelés néphropathies cristallines (NC). Les mécanismes moléculaires de la formation des cristaux et de la fixation des cristaux aux molécules de la matrice des cellules épithéliales ont été largement étudiés au cours des dernières décennies. Les NCs peuvent survenir indirectement par une inflammation établie par l'activation des inflammasomes activés par des récepteurs (TLR : Toll-like receptors) extracellulaires sensibles aux signaux microbiens et non-microbiens tel que les calculs rénaux dans les phagocytes mononucléaires rénaux [507]. La sensibilisation de ces récepteurs abouti à une activation des cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, ce qui entraîne l'infiltration des cellules inflammatoires (par exemple, neutrophiles, lymphocytes, macrophages, cellules NK etc.) dans l'interstitium du rein pendant la NC.

Le mécanisme direct de la NC implique la toxicité des calculs rénaux lorsqu'ils entrent en contact direct avec l'épithélium tubulaire. Des études ont associé la formation de l'oxalate monohydraté au dysfonctionnement mitochondrial et à l'augmentation subséquente de la production des ROS qui, à leur tour activent les inflammasomes et déclenchent une cascade de réactions inflammatoires aboutissant aux lésions tubulaires [508].

VII. Matériel et méthodes

VII.1 Collecte et extraction du pollen d'abeilles frais

Le pollen d'abeilles frais a été obtenu à partir de ruches situées dans la région de Sidi kacem/ Hed Kourt à l'Ouest du Maroc le mois de mai 2016, et a été directement stocké à -20°C jusqu'au jour de l'extraction. L'échantillon a ensuite été extrait par macération à température ambiante pendant une semaine dans de l'éthanol 70% sous agitation, puis filtré sur un papier filtre Whatman No1 puis l'alcool a été éliminé par évaporation rotative sous vide à 60 °C. L'extrait obtenu a été conservé à -20 °C. De l'eau distillée a été ajoutée pour obtenir trois concentrations différentes (100, 250 et 500 mg/kg PC) administrées quotidiennement aux animaux par gavage.

VII.2 Induction de la lithiase par l'éthylène glycol

Dans cette étude, l'éthylène glycol (EG) est utilisé pour induire une néphrolithiase, c'est un liquide chimique synthétique utilisé dans presque tous les produits liquides pour radiateurs et utilisé comme solvant, émulsifiant ou surfactant [509]. L'ingestion de l'EG provoque des lésions rénales et l'exposition à ce solvant dans les industries entraîne une altération des fonctions hépatiques et rénales [510].

L'éthylène glycol est un précurseur métabolique de l'oxalate. La formation d'oxalate commence après 24-72h d'administration. Dans notre étude, les groupes de traitement ont été administrés par l'éthylène glycol (0,75% v/v) dans l'eau de boisson pour l'induction des calculs rénaux, à l'exception des groupes normaux.

Le modèle d'hyperoxalurie induite par l'éthylène glycol a été utilisé pour induire l'urolithiase.

VII.3 Médicament de référence

Le Cystone est une formulation à base de plantes bien connue utilisée pour traiter les infections des voies urinaires, faciliter le passage des calculs rénaux et pour son activité antilithiasique en médecine traditionnelle. Il contient neuf différents types d'extraits de plantes et a un effet protecteur contre la lithiase urinaire induite expérimentalement chez le rat. Dans des études expérimentales, le cystone à une dose de 500 mg/kg a provoqué une inversion significative des changements induits par NaOx dans l'excrétion d'ions et la concentration urinaire de CaOx chez le rat [511]. Il a été constaté que le cystone (500 et 750 mg/kg) pendant 28 jours a exercé une activité protectrice contre le stress oxydatif induit par l'hyperoxalurie et le dépôt de cristaux d'oxalate de calcium en améliorant le statut antioxydant et en augmentant le volume urinaire [512]. Une revue de 50 études cliniques a montré que le cystone améliorait les symptômes, augmentait le volume d'urine et réduisait les constituants formant des calculs dans l'urine sans effets secondaires significatifs ce qui en fait un médicament de référence [513].

VII.4 Protocol expérimental

VII.4.1 Animaux d'expérience

Les rats Wistar mâles adultes (150-220 g) ont été obtenus auprès de l'animalerie du laboratoire SNAMOPEQ, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Fès, Maroc. Les animaux ont été logés dans des conditions environnementales standard (25±1 °C, et cycle lumière/obscurité de 12 h/ 12 h) et ont été maintenus en libre accès à l'eau et à la nourriture des rats de laboratoire. Toutes les expériences ont été menées conformément aux principes internationalement reconnus pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Une approbation éthique a également été obtenue de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah Mohammed de Fès (Cf. Chapitre 3).

Soixante rats ont été divisés au hasard en dix groupes contenant chacun six rats:

Groupe 1 : Contrôle non traité et a été nourri avec de la nourriture ordinaire pour rats et de l'eau de boisson *ad libitum*.

Groupe 2 : Groupe qui a reçu le cystone (500 mg/kg PC) du 1er au 30ème jour.

Groupes 3, 4 et 5 : Groupes normaux traités par l'EEPF (100/250/500 mg/kg PC) administrées par gavage pendant 30 jours.

Tous les autres groupes ont reçu un traitement inducteur de calculs composé d'éthylène glycol à 0,75 % v/v dans l'eau de boisson pendant 30 jours.

Groupe 6 : Groupe contrôle lithiasique (EG).

Groupes 7, 8 et 9 : Groupes lithiasiques traités concomitamment par l'EEPF 100, 250 et 500 mg/kg respectivement.

Groupe 10: Groupe lithiasique traité concomitamment par le cystone (500mg/kg) du premier au 30ème jour de l'induction de la lithiase.

L'EEPF et le cystone ont été administrés quotidiennement par gavage pendant 30 jours. selon des études antérieures, la dose de cystone était de 500 mg/kg durant 30 jours [514]. L'éthylène glycol (0,75 %) dans l'eau potable a été utilisée [515]. Les animaux ont reçu de l'eau de boisson contenant de l'EG, et cela a été surveillé car chaque animal était logé dans une cage métabolique avec un libre accès à la nourriture et à l'eau de boisson avec de l'EG dans une bouteille graduée.

VII.5 Analyses biochimiques

VII.5.1 Collecte et analyse des échantillons d'urine

Chaque animal a été maintenu dans une cage métabolique individuelle et l'urine a été collectée aux jours 0, 15 et 30 de la période d'étude. Les animaux avaient libre accès à la nourriture et à l'eau potable pendant la période de collecte d'urine. L'urine a été analysée pour le volume, le

pH, le calcium, le phosphore inorganique, le magnésium, les électrolytes, l'urée, la créatinine et les protéines totales.

VII.5.2 Analyse du sang

A la fin de l'étude, tous les rats ont été soumis à une anesthésie légère (diéthyl éther), le sang a été prélevé par ponction du sinus rétro-orbitaire sous anesthésie et le sérum a été séparé par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes et analysé pour la créatinine, l'urée, les électrolytes : sodium, potassium, chlorure, magnésium, calcium, phosphore et les protéines totales. La fonction hépatique a été évaluée en mesurant la phosphatase alcaline (PAL), l'alanine aminotransférase (ALT), le gamma glutamyl-transférase (GGT) et l'aspartate aminotransférase (AST) sériques.

VII.6 Étude microscopique des cristaux urinaires

L'urine a été recueillie dans tous les groupes après 30 jours d'intervention et un examen microscopique a été effectué pour identifier les cristaux urinaires.

VII.7 Histopathologie des reins

Les animaux ont été sacrifiés sous anesthésie, et le rein a été prélevé et rincé dans du sérum physiologique glacé. Le rein a été fixé dans du formol tamponné neutre à 10 %, traité dans une série d'alcool et de xylène gradués, inclus dans de la cire de paraffine, sectionné à 5 µm et coloré à l'hématoxyline et à l'éosine pour un examen histopathologique. Les lames ont été examinées au microscope optique pour étudier l'architecture des reins et des dépôts d'oxalate de calcium. Les images ont été traitées avec le logiciel GIMP pour augmenter la clarté.

VII.8 Détermination du contenu phénolique total

Le contenu en phénols totaux dans de l'EEPF a été déterminé par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu, selon singleton et al. (cf. chapitre 2).

VII.9 Teneur totale en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de l'EEPF a été quantifiée selon la méthode décrite par Miguel et al. (cf. chapitre 2).

VII.10 Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale dans de l'EEPF a été déterminée selon la méthode colorimétrique au molybdate d'ammonium de Prieto et al. (cf. chapitre 2).

VII.11 Activité antiradicalaire anti-DPPH

L'activité de piégeage des radicaux de l'EEPF contre le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été mesurée selon Kumazawa et al. (cf. chapitre 2).

VII.12 Pouvoir réducteur (PR)

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode décrite par Moreira et Miguel (cf. chapitre 2).

VII.13 Activité antiradicalaire anti-ABTS

L'activité de piégeage du radical $ABTS^{+}$ a été mesurée selon la méthode décrite par Miguel et al. (cf. chapitre 2).

VII.14 Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne ± SD. La signification statistique a été évaluée à l'aide d'une analyse de variance à sens unique (ANOVA), suivie du test de comparaison multiple post hoc de Tukey en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 5.

VIII. Résultats

VIII.1 Effet des interventions sur la fonction rénale et les électrolytes sériques

Chez les groupes non traités par l'EG, l'EEPF et le cystone n'ont pas provoqué de changements significatifs dans la créatinine sérique, le phosphore, le calcium, le sodium et le potassium (Tableaux 18 et 19). L'EEPF a provoqué une élévation significative des protéines sériques et une diminution significative du magnésium sérique. L'EG a provoqué une élévation significative de la créatinine sérique, des protéines, du magnésium, du phosphore, du sodium et du potassium ($P < 0,05$). L'utilisation concomitante de l'EEPF ou du cystone avec l'EG a entraîné une baisse significative de ces paramètres par rapport à l'EG seul ; l'EEPF à des doses plus élevées était plus puissant que le cystone.

Tableau 18: Effet des interventions sur le taux sanguin d'urée, de créatinine et de protéines au jour 30

Groupes	Interventions	Créatinine mg/dl	Urée mg/dl	Protéine g/dl
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	0,5±0,09	33,5±4,57	4,25±0,38
	Cystone	0,55±0,09	27±3,11	4,45±0,30
	EEPF -100	0,5±0,06	23,2±3,9*	6,5±0,74$^{*\#}$
	EEPF -250	0,55±0,07	25,3±4,35	6,2±0,28$^{*\#}$
	EEPF -500	0,55±0,09	32±4,48	6,16±0,53$^{*\#}$
Groupes traité par l'EG	EG	1,17±0,07*	47,5±5,23*	8,55±0,57 *
	EG+ Cystone	0,7±0,01$^{\beta}$	39±4,64 $^{\beta}$	7,18±0,40 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 100	0,9±0,11 β $^{\pi}$	27±4,84 $^{\beta\,\pi}$	7,3±0,43 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 250	0,7±12 $^{\beta}$	26±4,01$^{\beta\,\pi}$	6,86±0,30 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 500	0,6±0,09$^{\beta}$	37,5±5,77$^{\beta\,\pi}$	6,15±0,64 $^{\beta\,\pi}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle. # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone. β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0.05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone.

Tableau 19: Effet des interventions sur le taux sanguin des électrolytes au jour 30

Groupes	Interventions	Magnésium mg/dl	Phosphore mg/l	Calcium mg/dl	Sodium mmol/l	Potassium mmol/l
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	2,49 ± 0,35	4,20±0,35	3,22±0,41	149,5±7,11	5,7±1,44
	Cystone	2,68 ± 0,34	4,28±0,31	3,45±0,44	146±3,89	4,98±1,16
	EEPF -100	1,79±0,20$^{*\#}$	4,20±0,47	3,46±0,35	147±6,72	4,92±1,3
	EEPF -250	1,98±0,23$^{\#}$	4,01±0,29	3,48±0,46	148±5,56	5,45±0,84
	EEPF -500	1,96±0,25$^{\#}$	4,36±0,36	3,91±0,46	145,50±6,27	5,30±1,09
Groupes traités par l'EG	EG	3,35±0,50*	8,55±0,64*	8,55±0,43*	182,50±7,14*	10,75±2,18*
	EG+ Cystone	3,02±0,45	5,02±0,34$^{\beta}$	6,92±0,49$^{\beta}$	152,72±5,33$^{\beta}$	4,39±0,44$^{\beta}$
	EG+ EEPF 100	2,58±0,45	6,55±0,52$^{\beta\pi}$	7,45±0,33$^{\beta}$	153,50±5,22$^{\beta}$	4,45±0,62$^{\beta}$
	EG+ EEPF 250	2,36±0,23$^{\beta}$	5,20±0,56$^{\beta}$	6,97±0,32$^{\beta}$	150,50±6,09$^{\beta}$	3,95±0,56$^{\beta}$
	EG+ EEPF 500	2,05±0,38$^{\beta\pi}$	4,95±0,44 $^{\beta}$	5,70±0,47$^{\beta\pi}$	152,63±5,22$^{\beta}$	3,60±0,57$^{\beta}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle. # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone. β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0,05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone.

VIII.2 Effet des interventions sur les enzymes hépatiques

Chez les groupes non traités par l'EG, le cystone a augmenté significativement l'ALP, tandis que l'EEPF diminuait significativement l'AST et l'ALP (Tableau 20). Chez les groupes traités par l'EG, celui-ci a significativement augmenté les enzymes hépatiques (P < 0,05). L'utilisation concomitante de l'EEPF ou du cystone avec l'EG a amélioré de manière significative l'élévation des enzymes hépatiques induite par l'EG et l'EEPF était plus puissant que la cystone (P < 0,05).

Tableau 20: Effet des interventions sur les enzymes hépatiques au jour 30

Groupes	Interventions	AST (U/L)	ALT(U/L)	ALP (U/L)	GGT(U/L)
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	89,94±9,48	9,50±1,91	144±6,63	4,2±1,16
	Cystone	91,64±5,31	10,50±2,23	167±7,43*	5,1±0,89
	EEPF-100	89,50±4,87	11,29±2,04	145±4,31$^{\#}$	4,0±0,69
	EEPF-250	68,11±3,35$^{*\#}$	12,57±2,44	134,98±9,88$^{\#}$	4,5±1,09
	EEPF-500	57,73±6,1$^{*\#}$	12,85±2,35	122,12±4,77$^{*\#}$	4,3±0,63
Groupes traités par l'EG	EG	165,50±9,72*	34,97±4,35*	196±11,88*	10,50±1,66*
	EG+ Cystone	98,33±4,81 $^{\beta}$	18,50±3,08 $^{\beta}$	183,16±4,87	6,45±1,29 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 100	142,2±11,77 $^{\beta\pi}$	19,50±3,65 $^{\beta}$	190±9,21	4,50±1,22 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 250	114,5±8,6 $^{\beta\pi}$	14,56±1,78 $^{\beta}$	169,90±6,17$^{\beta\pi}$	5±0,89 $^{\beta}$
	EG+ EEPF 500	93±5,03 $^{\beta\pi}$	13,79±3,14 $^{\beta}$	154±9,25 $^{\beta\pi}$	4,45±0,88 $^{\beta}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle. # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone. β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0.05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone.

VIII.3 Effet des interventions sur le volume et le pH urinaires

Chez les rats non traités par l'EG (Tableau 21), l'EEPF et le cystone ont provoqué une élévation significative du volume urinaire aux jours 15 et 30 par rapport à la ligne de base (jour 0) et au témoin ($P < 0,05$). chez les groupes traités par l'EG, celui-ci a provoqué une augmentation significative du volume d'urine, qui a été significativement potentialisée avec l'utilisation concomitante de l'EEPF. Chez les groupes traités par l'EG, celui-ci a provoqué chez les rats une élévation significative du pH urinaire, qui a été atténuée par l'utilisation concomitante du cystone ou de l'EEPF(Tableau 21).

Tableau 21: Effet des interventions sur le volume et le pH urinaires

Groupes	Interventions	Volume d'urine (mL)			pH urinaire		
		Jour 0	Jour 15	Jour 30	Jour 0	Jour 15	Jour 30
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	6±1,01	6,69±1,57	7,2±1,52	6,55±1,13	6,61±0,72	6,57±0,65
	Cystone	5,9±1,5	16,5±3,04$^{*\alpha}$	22,42±3,03$^{*\alpha}$	6,41±0,91	6,82±0,2	7,16±0,66
	EEPF-100	5,9±1,04	14,6±2,93$^{*\alpha}$	19,5±2,25$^{*\alpha}$	6,53±0,95	6,65±0,68	6,89±0,53
	EEPF-250	6±1,5	15,5±2,13$^{*\alpha}$	19,5±3,01$^{*\alpha}$	6,45±1,44	6,83±0,66	6,74±0,61
	EEP -500	6,4±1,54	15,1±2,9 $^{*\alpha}$	24±3,57$^{*\alpha}$	6,39±0,82	6,57±1	6,83±0,51
Groupes traités Par l'EG	EG	6,5±1,85	15,5±3,8$^{*\alpha}$	16±2,73$^{*\alpha}$	6,52±0,9	6,99±0,53	7,83±0,4$^{*\alpha}$
	EG+ Cystone	5,96±1,8	10,23±2,68$^{\alpha}$	13,2±1,86$^{\alpha}$	6,41±1,05	6,86±1,01	6,97±0,39
	EG+ EEPF 100	5,9±1,44	19,5±2,7$^{\pi\alpha}$	39,5±4,41$^{\beta\pi\alpha}$	6,61±0,85	6,57±0,63	6,61±0,57
	EG+ EEPF 250	6,32±1,36	18,25±1,12$^{\pi\alpha}$	39,5±1,54$^{\beta\pi\alpha}$	6,54±0,86	6,48±0,58	6,53±0,42$^{\beta}$
	EG+ EEPF 500	6±1,41	22,5±2,34$^{\beta\pi\alpha}$	42,5±4,29$^{\beta\pi\alpha}$	6,49±0,8	6,56±0,53	6,58±0,8$^{\beta}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle. # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone. β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0,05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone. α $P<0,05$comparaison avec le jour 0.

VIII.4 Effet des interventions sur le calcium, le phosphore et le magnésium urinaires

Chez les groupes non traités par l'EG, l'EEPF a augmenté le magnésium urinaire par rapport au groupe témoin (Tableau 22). Le cystone n'affecte pas le calcium, le phosphore et le magnésium urinaires. Dans le groupe traité par l'EG, celui-ci a provoqué une diminution significative ($P < 0,05$) du magnésium urinaire et une élévation significative du calcium et du phosphore Urinaires par rapport au groupe contrôle (Tableau 22). Cependant, le traitement par l'EEPF a significativement augmenté le magnésium et a diminué le taux de calcium et de phosphore dans l'urine lorsqu'il est administré avec l'EG par rapport au groupe traité par l'EG seul ($P < 0,05$). L'EEPF (500 mg/kg PC) a exercé un effet plus élevé sur les niveaux urinaires du magnésium, du calcium et de phosphore par rapport au groupe traité par le cystone et au groupe traité par l'EG.

VIII.5 Effet des interventions sur l'excrétion urinaire de sodium, potassium, chlorures

Chez les groupes non traités par EG, l'EEPF et la cystone ont augmenté significativement le sodium et le chlorure urinaires et diminué le potassium urinaire par rapport au groupe contrôle (Tableau 22). Chez les groupes traités par l'EG, celui-ci a significativement diminué le sodium urinaire, le potassium et les chlorures ($P < 0,05$) (Tableau 22). Cependant, l'utilisation concomitante l'EEPF ou de cystone avec EG a entraîné une augmentation significative du sodium et des chlorures urinaires par rapport au groupe traité par EG. L'effet du l'EEPF était dose-dépendant et plus puissant que celui de la cystone. l'effet d'épargne potassique de l'EEPF a été claire chez tous les groupe traités par rapport au contrôle.

Tableau 22: Effet des interventions sur les électrolytes urinaires au jour 30

Groupes	Interventions	Magnésium mg/l	Calcium mg/l	Phosphore mg/l	Sodium mmol/l	Potassium mmol/l	Chlorures mmol/l
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	268,53±10,37	120,19±8,02	53,34±8,53	146 ± 10,48	262,50±16,05	121,50±11,43
	Cystone	281,11±13,96	119,42±9,08	49,72±9,59	243,50±12,32*	233,50±13,09*	287±12,36*
	EEPF-100	283,11±12,81	123,38±9,13	48,56±8,48	282,50± 9,35$^{*\#}$	209,50±18,32*	286±10,03*
	EEPF-250	286,61±12,02	119,41±9,28	49,18±8,92	389,2±25,36$^{*\#}$	211,45±14,66*	309,50±15,98*
	EEPF-500	290,73±10,58*	123,35±10	53,19±6,93	391± 29,63$^{*\#}$	225,90±15,76*	304,5±19,59*
Groupes traités Par l'EG	EG	136,91±11,89*	165,66±9,5*	67,77±8,88*	32±9,29*	163,91±13,45*	82,50±13,76 *
	EG+ cystone	225,15±11,48$^{\beta}$	124,67±11,16$^{\beta}$	49,38± 9,57	147,22±16,53$^{\beta}$	223,15±13,95$^{\beta}$	254,97± 17,52$^{\beta}$
	EG+ EEPF 100	185,11±12,08$^{\beta\pi}$	155,35±10,12$^{\pi}$	39,76±8,9$^{\beta\pi}$	132± 12,1$^{\beta}$	159,50±9,81$^{\pi}$	126,50±17,07$^{\beta}$
	EG+ EEPF 250	222,23±11,92$^{\beta}$	147,29±10,59$^{\beta\pi}$	37,94±11,37 $^{\beta\pi}$	219,5± 17,60$^{\beta\pi}$	153±19,15$^{\pi}$	176±15,0$^{\beta}$
	EG+ EEPF 500	234,97±13,77$^{\beta}$	122±8,86$^{\beta}$	30,45±9,32 $^{\beta\pi}$	223,5± 15,17$^{\beta\pi}$	176,40±13,59$^{\pi}$	287,39±14,80$^{\beta\pi}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle, # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone. β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0,05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone.

VIII.6 Effet des interventions sur la créatinine urinaire, l'urée, les protéines, l'acide urique et la clairance de la créatinine

Chez les groupes non traité par l'EG, les interventions n'ont pas provoqué de changements significatifs dans les protéines urinaires, l'urée et l'acide urique (Tableau 23). Cependant, une élévation significative de la clairance de la créatinine (P<0,05) a été remarquée, l'effet de l'EEPF était plus puissant que celui du cystone. chez le groupe traité par l'EG, celui-ci a provoqué une élévation significative des protéines urinaires et de l'acide urique et une diminution significative de la créatinine urinaire et de la clairance de l'urée et de la créatinine (P<0,05). L'utilisation concomitante de L'EEPF et du cystone avec l'EG a diminué l'acide urique urinaire et a augmenté l'urée urinaire, la créatinine urinaire et la clairance de la créatinine par rapport au groupe traité par l'EG seul. Fait intéressant, l'EEPF ou la cystone ont diminué significativement la protéinurie, l'EEPF à une dose de 500 mg était significativement plus puissant que le cystone.

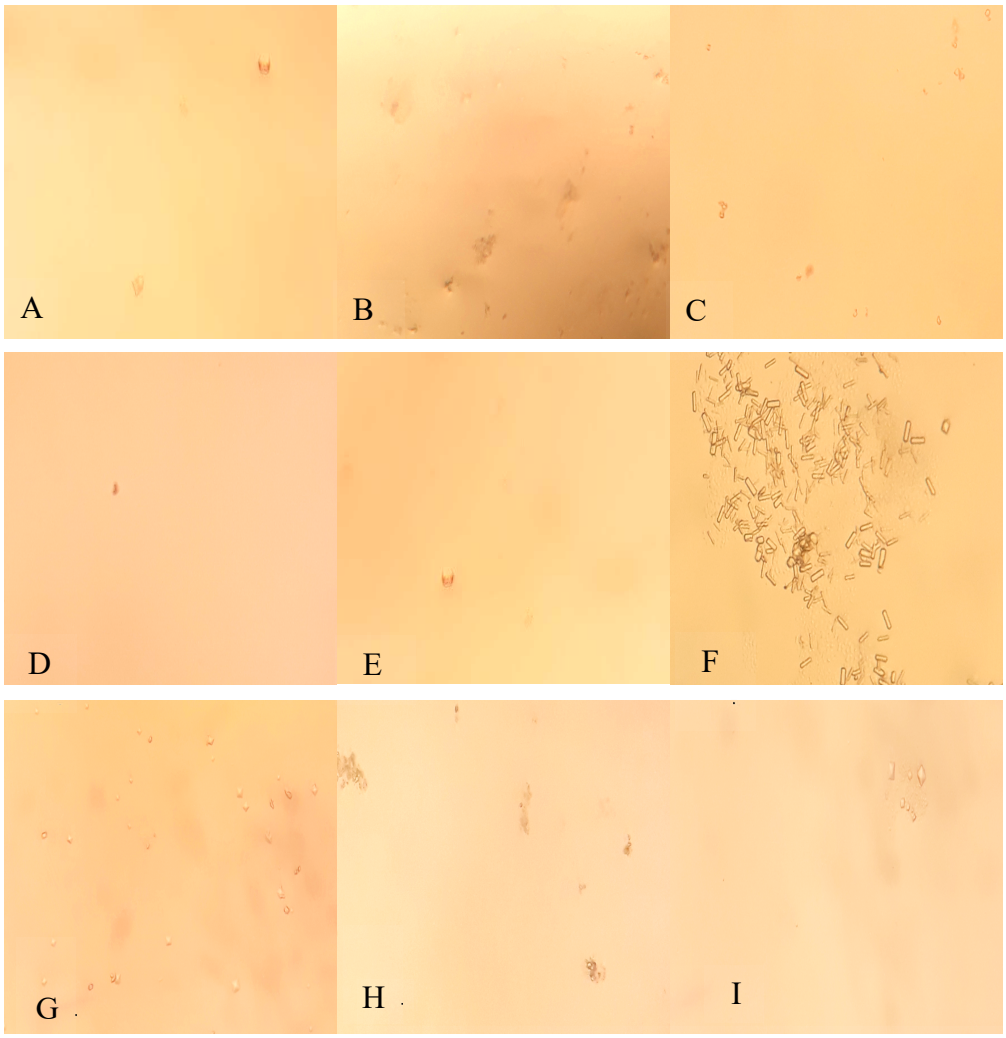
Tableau 23: Effet des interventions sur la créatinine urinaire, urée, protéines, acide urique et clairance de la créatinine au jour 30

Groupes	Intervention	Protéine mmol/l	Urée mmol/l	Créatinine mmol/l	Acide urique mmol/l	Clairance de la créatinine (mL/min)
Groupes non traités par l'EG	Contrôle	22,50± 3,84	47,10±4,11	46,20±5,47	7,5± 0,9	0,047±0,012
	Cystone	24,50± 3,62	45,53±4,83	47 ,07±4,8	8,20±1,30	0,138±0,040*
	EEPF-100	19,0± 3,12	42,62±5,47	48,98±4,7	8,89±1,35	0,134±0,023*
	EEPF-250	20,07± 3,83	41,90±3,48	49,25±4,31	9,4±1,3	0,124±0,031*
	EEPF-500	21,78± 3,85	42,96±4,45	53,40±4,71	8,32±1,17	0,165±0,039*
Groupes traités Par l'EG	EG	45±3,83*	26,94±3,2*	19,30±3,86*	13,75±1,2*	0,017±0,002*
	EG+cystone	32,80±4,17$^{\beta}$	34,33±3,28	34,80± 5,1 $^{\beta}$	10,96±2,14	0,045±0,008$^{\beta}$
	EG+ EEPF 100	40,62± 4,84 $^{\pi}$	30,39±3,75	24,62±3,41$^{\pi}$	10,20±2,3	0,084±0,02$^{\beta\pi}$
	EG+ EEPF 250	34,62± 4,64$^{\beta}$	31,09±3,55	34,62±4,78 $^{\beta}$	11,60±1,83	0,148±0,04$^{\beta\pi}$
	EG+ EEPF 500	24,12± 3,89$^{\beta\pi}$	36,87±4,7$^{\beta}$	40,12±3,96$^{\beta}$	9,70±1,47$^{\beta}$	0,20±0,037$^{\beta\pi}$

*$P<0,05$ comparaison avec le groupe contrôle, # $P<0,05$ comparaison avec le groupe cystone.β $P<0,05$ comparaison avec le groupe EG. π $P<0,05$ comparaison des groupes traité par l'EG avec le groupe EG+ cystone.

VIII.7 Microscopie urinaire et étude histopathologique rénale

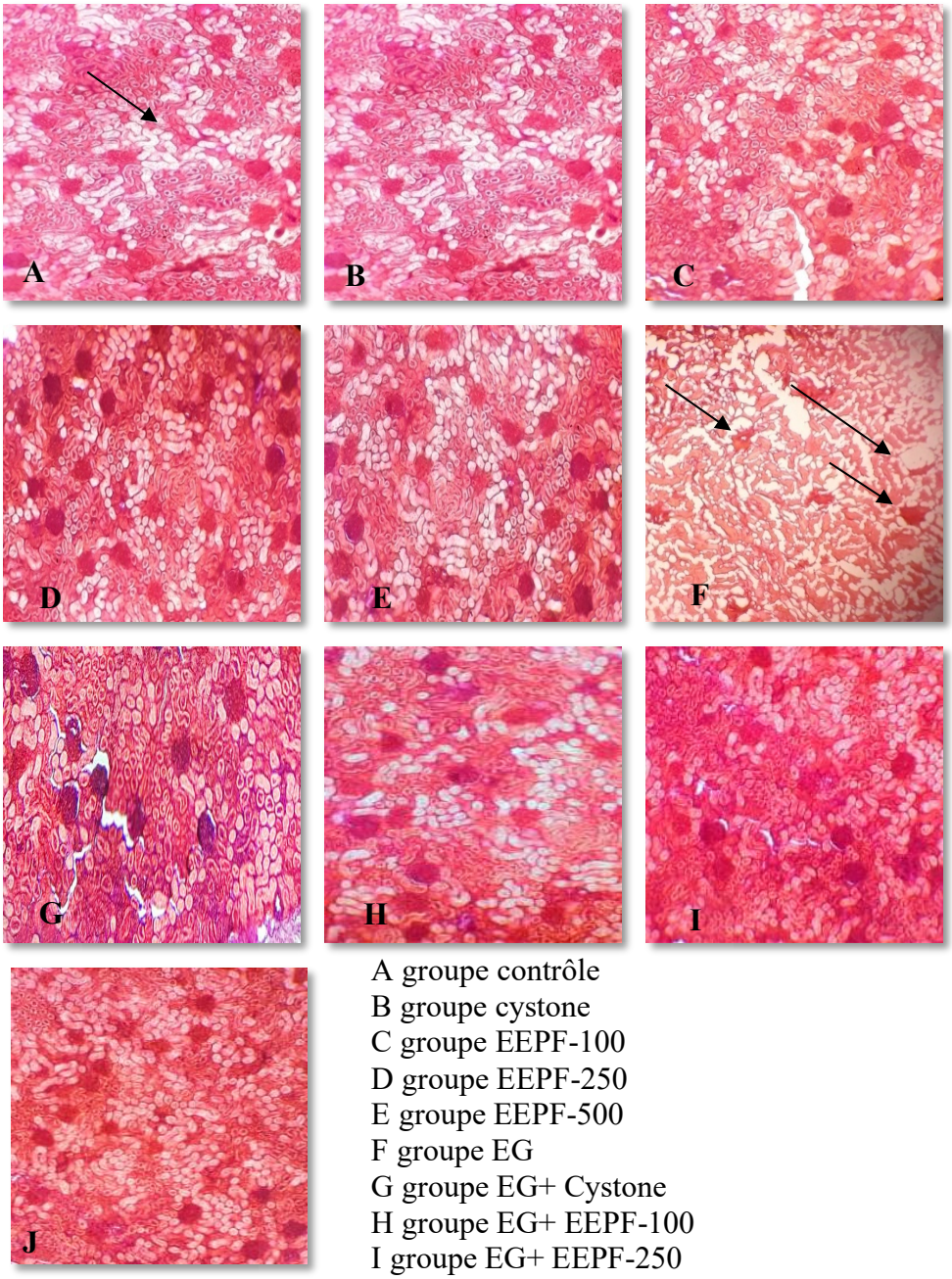
L'EG a provoqué une cristallurie par rapport aux groupes témoins (Figure 37). Cependant, l'utilisation concomitante de l'EEPF ou de cystone avec l'EG a significativement diminué la cristallurie qui a totalement disparue à l'aide de l'EEPF à une dose de 500 mg/kg .PC .



A groupe contrôle
B groupe cystone
C groupe EEPF-100
D groupe EEPF-250
E groupe EEPF-500
F groupe EG
G groupe EG+ Cystone
H groupe EG+ EEPF-100
I groupe EG+ EEPF-250
J groupe EG+ EEPF-500

Figure 37: Examen au microscope optique des échantillons d'urine recueillis, au grossissement de 10 × 10X au jour 30 montrant des cristaux multiples dans le groupe traité par EG.

Concernant l'étude histopathologique rénale, les résultats ont montré que l'EG provoquait des dépôts de cristaux dans les tubules, une dilatation des tubules collecteurs, une nécrose de l'épithélium tubulaire, une inflammation, un œdème et une congestion de l'interstitium (Figure 38). Fait intéressant, le traitement par l'EEPF et le cystone a nettement empêché ces changements histologiques observés dans les groupes traités par l'EG.



A groupe contrôle
B groupe cystone
C groupe EEPF-100
D groupe EEPF-250
E groupe EEPF-500
F groupe EG
G groupe EG+ Cystone
H groupe EG+ EEPF-100
I groupe EG+ EEPF-250
J groupe EG+ EEPF-500

Figure 38 : Examination histopathologique des coupes de reins des rats des diffèrent groupes par microscope optique a un grossissement de 10 × 10X.

VIII.8 Tests d'activité antioxydante et contenu phénolique

Le l'EEPF a révélé une capacité antioxydante importante vis-à-vis du DPPH, de l'ABTS et du pouvoir réducteur ferrique (0,72±0,031 mg/mL, 0,16±0,04 mg/mL et 0,12±0,087 mg/mL respectivement) mais ces valeurs étaient significativement ($P<0,05$) inférieures au standard BHT (0,021 ± 0,01 mg/mL), l'acide gallique (0,019 ± 0,001 mg/mL) et l'acide ascorbique (0,03 ± 0,07 mg/mL). La quantité de phénols dans l'EEPF était de 51,35 ± 2,61 mg EAG/g de pollen, la teneur en flavonoïdes était de 1,87 ± 0,06 mg EQ/g de pollen et la capacité antioxydante totale était de 234,53 ± 2,63 mg EAA/g de pollen (Tableau 24).

Tableau 24: Activité antioxydante et contenu phénolique

Echantillons	DPPH IC_{50} (mg/mL)	ABTS IC_{50} (mg/mL)	PR IC_{50} (mg/mL)	Phénols totaux (mg EAG /g)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g)	Capacité Antioxidante Totale (mg EAA/g)
EEPF	0,72±0,031	0,16±0,04	0,12±0,087	51,35 ± 2,61	1,87 ± 0,06	234,53 ± 2,63
BHT	0,021 ±0,01	-	-	-	-	-
A. ascorbique	-	-	0,03 ± 0,07	-	-	-
A. gallique	-	0,019±0,001				

IX. Discussion

Dans cette étude, l'effet protecteur du pollen d'abeilles contre les lésions rénales aiguës, la protéinurie, la cristallurie et les lésions hépatiques aiguës a été évalué à travers l'ingestion de l'éthylène glycol (0,75 % v/v) dans l'eau de boisson des rats wistar pendant 30 jours.

Les effets de l'EG révélés dans la présente étude sont similaires à ceux qui ont été signalés par nombreux chercheurs où ils ont rapporté que l'administration chronique d'une solution aqueuse d'EG aux rats mâles a augmenté significativement l'élimination du calcium, du phosphore, de l'acide urique, des protéines et de l'oxalate urinaires [516,517]. Une autre étude a montré que l'EG provoque également des lésions rénales en augmentant la concentration sérique de la créatinine, de l'acide urique et des protéines [518].

L'un des principaux facteurs de risque pour le développement des calculs dans les voies urinaires est la sursaturation de l'urine en minéraux « urolithes » ce qui favorise la précipitation des cristaux et la formation des calculs rénaux [519,520]. Le traitement par l'EEPF et le cystone a augmenté significativement le débit urinaire. L'activité diurétique de l'EEPF a été associée à une augmentation significative de l'excrétion du sodium, et des chlorures par rapport au groupe

témoin avec un effet d'épargne du potassium. L'augmentation de la diurèse aboutit à la diminution de la concentration des solutés urinaires et réduit finalement la saturation et la formation de calculs. Nos résultats sont en harmonie avec ceux d'autres études qui ont pu démontré la relation entre le potentiel diurétique et l'effet antiurolithiasique [505,514,521] où Patel et al. ont démontré que l'élimination des calculs rénaux est favorisée par une diurèse élevée [522]. Les diurétiques thiazidiques sont également connus pour réduire la sursaturation urinaire en raison de leurs actions diurétique et hypocalciurique et sont largement utilisés pour traiter la maladie des calculs calciques [523]. De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes possèdent des effets diurétiques, ceci pourrait aider à expliquer l'activité diurétique de l'EEPF riche en flavonoïdes. Nos résultats ont également montré que l'EG provoque une augmentation du volume urinaire. L'utilisation de l'EEPF avec EG provoque une augmentation supplémentaire du volume urinaire.

L'EEPF a provoqué une augmentation des protéines sériques dans les groupes non traités par l'EG, ceci est très probablement lié à son contenu nutritionnel (richesse en protéines et en acides aminés). L'EG a aussi provoqué une augmentation des protéines sériques, ce qui pourrait être dû à une réaction inflammatoire et à des lésions tissulaires. Cependant, L'EEPF a atténué l'hyperprotéinémie causée par l'EG, ce qui est probablement due à son activité antioxydante et anti-inflammatoire. D'autres études sont nécessaires pour explorer le mécanisme d'action.

La présente étude a montré que l'EEPF a diminué considérablement les niveaux de calcium et de phosphore urinaires, ce qui a aidé à prévenir la formation de calculs. Une augmentation de l'excrétion urinaire de phosphore et de calcium a été observée chez les rats traités par l'EG, ce qui pourrait conduire à la formation de cristaux de phosphate de calcium [505]. La présence d'oxalate fournit un environnement approprié pour la formation de calculs où le phosphate de calcium induit le dépôt d'oxalate de calcium [524]. Par conséquent, l'EEPF pourrait réduire la formation de calculs en augmentant le volume urinaire et en diminuant les cristaux de calcium, de phosphore et d'oxalate dans l'urine, ce qui a été évident par l'examen microscopique direct de l'urine.

Il a été démontré que le magnésium est un inhibiteur bien connu de la cristallisation de l'oxalate de calcium et qu'il peut réduire le potentiel de précipitation [512,525,526]. Dans la présente expérience, l'EG a significativement diminué le magnésium urinaire qui a été augmenté par l'administration simultanée de l'EEPF ou du cystone. Dans notre précédente étude de EL MINIYI et al., nous avons découvert que la propolis, qui est un autre produit de la ruche, a corrigé également la déplétion urinaire en magnésium induite par l'EG [512].

L’administration de l’EG diminue significativement le volume urinaire, ce qui pourrait être le résultat d'une insuffisance rénale. Il a été constaté que l'EG provoque des lésions rénales aiguës (LRA) dues à une nécrose des cellules tubulaires proximales qui résulte du dépôt de plusieurs métabolites (glycolaldéhyde, glyoxylate, glycolate et oxalate) et de cristaux d'oxalate de calcium monohydraté à l'intérieur de la lumière des tubules rénaux [527]. Le taux de filtration glomérulaire diminue en raison de l'obstruction du flux urinaire par les calculs dans le système urinaire. De ce fait, les déchets, en particulier les substances azotées comme l'urée, la créatinine et l'acide urique, s'accumulent dans le sang [518,528]. Dans la présente étude, la LRA était évidente par une élévation significative des niveaux plasmatiques de la créatinine et de l'urée observés après administration de l'EG. L’EEPF réduit considérablement l’accumulation de l'urée et de la créatinine en augmentant leur clairance et empêche donc la LRA induite par l'EG. La protéinurie reflète un dysfonctionnement tubulaire proximal, et elle est fréquente dans les LRAs [474]. Il est intéressant de noter que l’EEPF a considérablement réduit l'excrétion de protéines et pourrait donc potentiellement empêcher la formation de nidus pour la nucléation des cristaux. Ce résultat est similaire à celui de notre précédente étude qui montrait la capacité de la propolis à diminuer l'excrétion des protéines causée par l'administration de l’EG.

Au niveau hépatique, nos résultats indiquent que l'EG a provoqué une hépatotoxicité caractérisée par une augmentation pathologique des niveaux sériques des enzymes hépatiques (ALT, AST, GGT et PAL), qui ont été normalisés par l'ingestion de l’EEPF ou du cystone dans l'eau de boisson. Cet effet est probablement associé aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes du pollen due à sa composition riche en antioxydants tels que les polyphénols et les flavonoïdes responsables de nombreux effets biologiques [206,264].

L'effet maximal de l’EEPF qui a atténué les facteurs de risque de formation des calculs et de cristallisation et qui a prévenu les LRA et les lésions hépatiques a été attribué à la dose de 500 mg/kg PC/jour contre 100 et 250 mg/kg. PC/jour. Le mécanisme sous-jacent à cet effet est très probablement médié par les composés antioxydants présents dans l’EEPF et leur activité antioxydante.

Les données présentées dans ce travail ont montré que l’EEPF possède une puissante activité antioxydante contre le DPPH, l'ABTS et le pouvoir réducteur ferrique. De plus, il contient une grande quantité de phénols et de flavonoïdes. Le résultat est similaire aux études publiés précédemment [6,432]. L'oxalate de calcium stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène et l'inflammation, et l'administration d'antioxydants protège contre la néphrolithiase [481] . Nos études précédentes (chapitre 3) ont révélé la présence de molécules connues pour leur effets néphroprotecteur puissant telles que la quercétine, le kaempférol et le résveratrol qui

peuvent être entre autres, à l'origine de l'effet antiurolithiasique révélé dans cette étude [529–531]

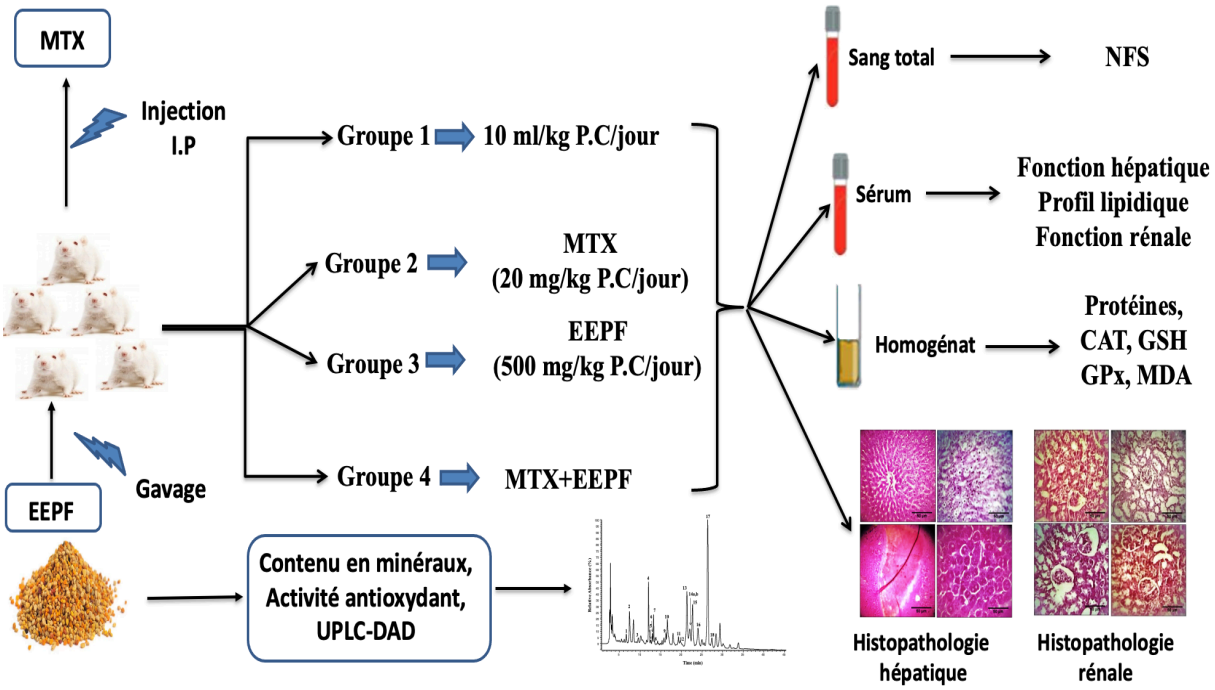
X. Conclusion

Nos résultats ont montré que l'EEPF possède une activité néphroprotectrice, anti-urolithiasique et hépatoprotectrice importante, ce qui a été évident par sa capacité à diminuer le calcium, le phosphore, les protéines, l'acide urique et les cristaux urinaires, et à augmenter la diurèse et le taux du magnésium urinaire. Ce qui est plus intéressant, c'est que l'EEPF a empêché les lésions rénales et hépatiques aiguës en diminuant les taux plasmatique de l'urée et de la créatinine, ainsi que les enzymes hépatiques et en augmentant la créatinine urinaire et la clairance de l'urée et de la créatinine. En outre, il a amélioré les changements histopathologiques induits par l'EG et le dépôt de cristaux dans le tissu rénal. Le mécanisme d'action est inconnu, mais son activité antioxydante et sa teneur en flavonoïdes pourraient jouer un rôle dans son activité. D'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes d'action moléculaires et tester l'effet de l'EEPF dans d'autres maladies rénales qui provoquent une protéinurie causée par d'autres conditions médicales telles que le diabète et la gestion de des LRA. Ces études paveront la voie à des études cliniques.

Chapitre 5. Composition Chimique, du Pollen Frais Marocain & Exploration in vitro et in vivo, de son Effet Antioxydant et Protecteur Contre l'Hématotoxicité, l'Hépatotoxicité, et la Néphrotoxicité Induites par le Méthotrexate Chez le Rat

Résumé

Objectif : La présente étude vise à évaluer l'effet protecteur de l'extrait éthanolique du pollen frais (EEPF) Marocain contre les toxicités hémato et hépatorénales induites par le méthotrexate MTX chez des rats albinos Wistar. ***Matériel et méthode :*** L'UPLC-DAD a été utilisée pour la détermination du profil phénolique de l'EEPF, le contenu minéral, et le contenu en polyphénols, et en flavonoïdes ont été utilisés pour son caractérisation. L'activité antiradicalaire a été évaluée par le test DPPH, ABTS et FRAP. 16 rats albino wistar ont été divisés en 4 groupes, un groupe contrôle, un groupe injecté par une unique dose de MTX (20 mg/kg), un groupe traité par l'EEPF (500 mg/kg) seul et un groupe injecté par le MTX et puis traité par l' EEPF. Les échantillons de sang total ont été prélevés pour faire la numérotation de la formule sanguine (NFS), le sérum a été récupéré pour doser les paramètres sériques rénaux (urée, acide urique, créatinine, CRP, protéines et taux d'albumine) et hépatiques (PAL, AST, ALT, LDH et GGT). Les marqueurs lipidiques (TC, TG, HDL et LDL, MDA) et la glycémie ont aussi été dosés. Les organes frais ont été prélevés pour explorer le statut des enzymes antioxydantes (CAT, GPx, GSH) chez ces rats. Le reste des organes a été utilisé pour faire les coupes anatomopathologiques. ***Résultats :*** Les résultats indiquent que l'injection du MTX a induit une toxicité au niveau du sang, des reins et du foie caractérisée par une anémie et une augmentation des enzymes hépatiques, de l'urée de la créatinine et de la peroxydation lipidique et une diminution de la CAT, GSH, et la GPX. L'examen histologique a montré une détérioration structurelle et de nombreuses lésions tissulaires hépatiques et rénales. Cependant, le traitement par l'EEPF a inversé ces variations pathologiques en diminuant les marqueurs de la toxicité rénale et hépatique et en corrigeant l'anémie résultante, et en améliorant le statut antioxydant par augmentation des enzymes antioxydantes naturelles. ***Conclusion :*** Les résultats ci-dessus suggèrent que l'EEPF peut atténuer la toxicité hématologique hépatique et rénale induite par le MTX en diminuant le stress oxydatif.



I. Préface

Le méthotrexate (MTX) est un médicament immunosuppresseur antagoniste de l'acide folique largement utilisé pour le traitement des maladies auto-immunes systémiques inflammatoires chroniques, il est commercialisé sous forme de comprimés et d'injections. Depuis sa découverte en 1945, le MTX est devenu une thérapie standard pour plusieurs pathologies, il est même appelé « médicament ancre » par certains chercheurs [532,533]. A forte dose le MTX est utilisé comme l'un des agents chimiothérapeutiques classiques les plus puissants dans le traitement de certains tumeurs tels que la leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant, les troubles lymphoprolifératifs, le choriocarcinome et diverses tumeurs solides, et à faible dose, il est le principal médicament, pour le traitement du psoriasis sévère, du rhumatisme psoriasique, de la polyarthrite rhumatoïde PR et de plusieurs maladies inflammatoires ou auto-immunes [534].

Malgré le large éventail de ses effets thérapeutiques contre les maladies inflammatoires et de nombreux cancers, l'efficacité du MTX reste limitée en raison de plusieurs effets indésirables potentiels associés à son utilisation à long terme. L'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et l'hématotoxicité sont les complications les plus fréquentes et les plus graves liées au traitement par le MTX [535–540].

Pour inverser ces effets toxiques, plusieurs études scientifiques ont été menées pour évaluer l'effet protecteur potentiel des plantes et produits naturels connus pour leurs propriétés antioxydantes contre les toxicités induites par le MTX, leurs résultats suggèrent que l'association du MTX avec ces produits pourrait booster l'effet thérapeutique du MTX et pourrait même réduire ses toxicités systémiques [541–543].

Les produits de la ruche comme le miel, la propolis, la gelée royale, la cire d'abeille ou le pollen d'abeilles sont considérés comme une source potentielle de bio-composés et sont utilisés depuis des anciens temps en médecine traditionnelle contre plusieurs pathologies [544,545]. Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées sur l'effet de la propolis, du miel, de la gelée royale contre les toxicités liées au MTX et ont rapporté que ces produits ont une puissante capacité à prévenir et réduire ces toxicités [546–548]. Cependant, le pollen d'abeilles n'a jamais été testé sur la toxicité induite par le MTX, d'où l'objectif de cette étude qui vise à évaluer *in vitro* et *in vivo*, l'effet antioxydant et protecteur possible de l'extrait éthanolique du pollen d'abeilles frais Marocain (EEPF) sur la toxicité sanguine et hépatorénale induites par l'injection du MTX (20 mg/kg) chez le rat.

II. Mécanisme d'action du méthotrexate

Le MTX est le médicament du premier choix dans le traitement des cancers, des troubles inflammatoires auto-immuns et dans la transplantation de moelle osseuse. Une fois que le MTX atteint la circulation, il pénètre les érythrocytes, les globules blancs, les hépatocytes et les synoviocytes via des transporteurs de folate réduits et subit une polyglutamation catalysée par la folylpolyglutamate synthétase. Ensuite, le MTX reste dans les cellules pendant de longues périodes après la fin de la polyglutamation. [533]. Le mécanisme d'action du MTX dépends de la dose et de la cellule cible.

II.1 Effet du méthotrexate sur le folate

Dans le traitement du cancer comme agent chimiothérapeutique (cytotoxique), le MTX agit comme antagoniste du folate. Avec sa structure similaire à la structure de l'acide folique (Figure 39), le MTX agit principalement en bloquant l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR) de manière compétitive. Cette enzyme est responsable de la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate (forme active de l'acide folique). Le tétrahydrofolate est nécessaire pour la synthèse des nucléotides de l'ADN et de l'ARN, aboutissant à une inhibition de la prolifération cellulaire. Cette voie est responsable aussi à l'effet anti-néoplasique observé lors du traitement des cancers et des maladies auto-immunes, puisqu'elle interfère spécifiquement avec la division cellulaire [533,549,550]**.**

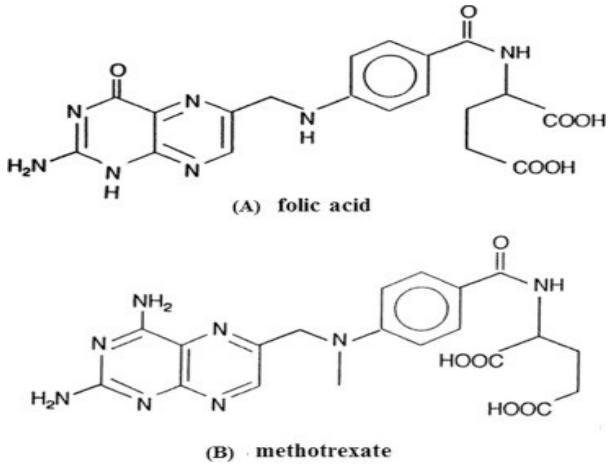


Figure 39: Structures chimiques de (A) acide folique et (B) méthotrexate [551]

II.2 Effet du méthotrexate sur l'adénosine et la production des cytokines

Quand il s'agit de son effet anti-inflammatoire, le MTX agit sur l'adénosine est un nucléoside purique issu de la dissociation de l'ATP en réponse au stress et présent dans tous les tissus et fluides corporels impliqué dans le bon fonctionnement des tissus. le MTX inhibe l'enzyme amino-imidazole-carboxamido-ribonucléotide (AICAR) transformylase qui provoque une

augmentation des niveaux d'AICAR et conduit à une accumulation et à la libération d'adénosine qui module les réponses inflammatoires des cellules neutrophiles, et des macrophages par sa liaison soit avec les récepteurs pro-inflammatoires (A_1 et A_2B) ou anti-inflammatoires (A_2A, et A_3). L'activation des récepteurs anti-inflammatoires par le MTX provoque une réduction des médiateurs de l'inflammation (cytokines) tels que le TNF-α et l'IL-1β [552]. En outre, le MTX semble réduire les molécules d'adhésion (E-sélectine et VCAM-1) sur les cellules synoviales de patients RA.

II.3 Effet du méthotrexate sur la cyclooxygénase/lipoxygénase

Le rôle médiateur des prostaglandines et des leucotriènes dans les réactions inflammatoires est bien connu avec leurs enzymes clés (COX-1, COX-2, 5-lipoxygénase). L'effet anti-inflammatoire direct du MTX sur la COX-1 ou la COX-2 n'est pas bien établi sauf que il y a des études qui ont conclu que le MTX n'agit pas sur la COX-1 et réduit légèrement la production de la COX-2 chez les patients atteints de l'arthrite rhumatoïde (AR) [553]. Le leucotriène LTB4 est un produit de la 5-lipoxygénase qui stimule la production d'IL-2 et d'IFNγ par les cellules T. Chez des patients atteints par l'AR, le traitement par le MTX semble réduire considérablement la production des LTB_4 [554].

II.4 Effet immunosuppresseur du méthotrexate

L'apoptose est une mort cellulaire active programmée signal-dépendante étroitement régulée par l'expression coordonnée des gènes de survie et de mort. Des études *in vivo* ont démontré l'effet des fortes doses du MTX dans l'induction de l'apoptose des cellules ovariennes du hamster et des lymphocytes T leucémiques humaines. D'autres études *in vitro* ont pu démontré l'effet de faibles doses de MTX sur les lymphocytes du sang périphérique humain en induisant l'apoptose des CD_4 et CD_8 activés mais pas des cellules T au repos [555–557]. Brièvement, les mécanismes moléculaires de l'immunosuppression du MTX font intervenir l'induction de l'apoptose des lymphocytes T par l'initiation du signal apoptotique au moment de la synthèse de l'ADN durant la phase S de leur cycle cellulaire. La délétion des lymphocytes T pendant leur expansion, ou encore l'augmentation de la sensibilité des lymphocytes T actives envers les récepteurs de mort CD_{95} et CD_{95}-L via l'augmentation de leur expression sur la surface des cellulaires T leucémiques. Le MTX provoque aussi un surexpression de récepteurs de mort sur les lignées cellulaires d'hépatome. [390, 406,411].

II.5 Effet du méthotrexate sur la production des ROS

Les propriétés modificatrices de l'équilibre redox du MTX ont été proposées comme mécanisme important des effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires du médicament.

Le MTX s'est avéré avoir un effet générateur des espèces réactives d'oxygène. Les ROS ainsi générés, interviennent non seulement dans la mort cellulaire, mais aussi dans la modulation de différentes fonctions cellulaires, telles que l'inhibition de la production de cytokines et l'inhibition de la prolifération cellulaire. Ce mécanisme est médié par la diminution de la production de la tétrahydrobioptérine qui est un cofacteur nécessaire pour la synthèse du NO via l'inhibition de la DHFR catalysant la réduction du dihydrobioptérine en tétrahydrobioptérine. Cette inhibition provoque une déplétion de la formation du NO et une augmentation de la production des ROS [558,559].

III. Utilisations cliniques du méthotrexate

Le méthotrexate est l'un des agents anti-métabolites (anti-folate) les plus étudiés et les plus efficaces pour le traitement de nombreuses tumeurs solides, les tumeurs hématologiques malignes et les maladies auto-immunes.

III.1 Méthotrexate pour le traitement du cancer

Le MTX est utilisé à forte dose (500 mg/m^2) ou plus administré par voie intraveineuse pour traiter une variété de cancers chez les adultes et les enfants, y compris l'ostéosarcome, l'ostéosarcome et les lymphomes. Le MTX en chimiothérapie agit via la voie de l'inhibition du DHFR (voir mécanisme d'action du MTX : effet du MTX sur le folate). Cette enzyme est cruciale pour la synthèse du tétrahydrofolate responsable à son tour de la biosynthèse de la thymidine et des purines nécessaires à la synthèse de l'ADN. Cette inhibition va empêcher les cellules de se diviser et de produire des protéines. Le MTX est utilisé en monothérapie dans le traitement des lymphomes, des choriocarcinomes ainsi que dans le traitement d'entretien de la leucémie lymphoblastique aiguë. En faisant partie d'autres schémas thérapeutiques, il est utilisé dans le traitement du cancer gastrique, le cancer du sein adjuvant et métastatique, cancer de la tête et du cou et le cancer avancé de la vessie [533,560–563] .

III.2 Méthotrexate pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (AR)

L'arthrite rhumatoïde AR est une maladie auto-immune courante caractérisée par une inflammation progressive de la membrane synoviale, un gonflement des articulations et une destruction des os ou des cartilages sous-jacents, qui peuvent évoluer vers des complications systémiques, notamment des troubles pulmonaires, squelettiques, cardiovasculaires et psychologiques ; aboutissant finalement à la mort prématurée des patients. La pathogenèse de la AR est considérée comme l'interaction de facteurs génétiques dans des conditions environnementales appropriées (cigarette, maladies infectieuses virales ou bactériennes, interactions hormonales) [564]. Le méthotrexate est un médicament de première intention

appartenant à la classe des médicaments antirhumatismaux modificateurs de maladies. A faible dose (7,5 à10 mg/ semaine) il est utilisé pour le traitement de l'AR chez les adultes ou la polyarthrite rhumatoïde juvénile chez les enfants ayant une réponse thérapeutique insuffisante. L'efficacité clinique du méthotrexate dans la polyarthrite rhumatoïde est médiée par ses effets anti-inflammatoires, ses effets cytotoxiques envers les cellules en prolifération ainsi que sa capacité à épuiser le niveau de glutathion intracellulaire par un mécanisme oxydant [565,566].

III.3 Méthotrexate pour traitement du psoriasis

Le psoriasis est une maladie auto-immune fréquente caractérisée par une inflammation cutanée et une hyperprolifération des kératinocytes. Bien que la pathogenèse du psoriasis ne soit pas entièrement comprise, l'interaction génétique et environnementale semble être primordiale pour le développement de la maladie[567]. Le MTX via son effet immunosuppresseur classique, reste la pierre angulaire du traitement systémique du psoriasis, il est utilisé depuis de nombreuses années avec de bonnes réponses et un bon profil de sécurité. Le MTX et la cyclosporine sont les seules thérapies systémiques pour le psoriasis incluses dans la liste des médicaments essentiels de l' OMS [566,568].

III.4 Méthotrexate pour le traitement des maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) sont un trouble inflammatoire chronique du tractus gastro-intestinal qui regroupe la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC), qui diffère l'une de l'autre de point de vue pathologie et caractéristiques cliniques [569]. Actuellement, les MICI sont considérés comme une maladie mondiale dont la prévalence est la plus élevée dans les pays occidentaux avec une forte augmentation d'incidence qui peut dépasser1 milliard dans des populations nouvellement industrialisées (Chine, Inde). Cette maladie touche plus d'enfants que d'adultes [570,571]. L'étiologie et la pathogenèse des MICI sont mal connues, mais il est largement admis que la pathogenèse des MICI implique des facteurs génétiques et environnementaux [572]. l'inflammation intestinale qui résulte des MICI semble être due à un dysfonctionnement du système immunitaire en réponse à des changements dans la flore intestinale commensale (non pathogène), des études génétiques ont montré que les interactions hôte-microbiote jouent un rôle important dans la pathogenèse de la RCH et de la MC et impliquent des régions génomiques précises qui régulent la défense microbienne et l'inflammation intestinale [569,573,574].

A faible dose (à partir de 25 mg/semaine), le méthotrexate est utilisé comme un immunomodulateur efficace pour induire et maintenir la rémission de la maladie de MC chez les patients réfractaires ou intolérants aux traitements de base (thiopurines ou aux anti-TNFα).

C'est un médicament efficace aussi bien en monothérapie qu'en association avec un anti-TNFα, pour prévenir l'immunisation[575,576].

L'effet inhibiteur de DHFR, immunosuppresseur, antiinflammatoire du MTX est impliqué et provoque une série de processus biologiques, notamment une réduction de la prolifération des cellules endothéliales, une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T, une réduction de la production de cytokines pro-inflammatoires et une réduction de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire. Ces mécanismes interfèrent avec les interactions endothéliales leucocytaires et les extravasations leucocytaires à travers la barrière endothéliale induisant ainsi une réduction de l'inflammation systémique [577].

IV. Toxicités du méthotrexate

Comme nous avons vu précédemment, le MTX a été utilisé avec succès pour traiter divers cancers et maladies auto-immunes, seul ou en association avec d'autres agents. Par ailleurs, le potentiel curatif de ce médicament est parfois réduit en raison de sa toxicité morbide touchant plusieurs organes, y compris la toxicité gastro-intestinale, la toxicité de la moelle osseuse, la cardiotoxicité, la néphrotoxicité et l'hépatotoxicité. La toxicité induite par le méthotrexate non seulement entraîne une morbidité et une mortalité occasionnelle, mais peut également interrompre le traitement du cancer, entraînant potentiellement des résultats anticancéreux insuffisants [578]

Le MTX a un temps de demi-vie sérique relativement courte de 6 à 8 heures et plus de 80 % du médicament circule sous sa forme intacte et est excrété dans les urines par sécrétion glomérulaire et tubulaire. Le MTX utilisé à forte dose (arrivant à 500mg) dans la chimiothérapie peut entrainer une insuffisance rénale aigue dans 2% à 12% des patients, l'incidence dépend des facteurs liés au malade, aux mesures de soutien utilisées, ainsi qu'à la dose et du programme de traitement par le MTX [534,578,579].

A faible dose dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires, le traitement par MTX peut également altérer la fonction rénale, chez les patients âgés où le taux de filtration glomérulaire et l'excrétion tubulaire peuvent être réduits de 10 % pendant le traitement à une faible dose de 15 mg/semaine. La clairance du MTX et la clairance de la créatinine peuvent également diminuer avec une dose stable de MTX de 7,5 mg/semaine [580].

L'hépatotoxicité est une complication fréquente du traitement à long terme par MTX. De nombreux facteurs de risque peuvent augmenter la survenue d'hépatotoxicité sévère (Grade III ou IV) comme une longue durée d'exposition au MTX avec une grande dose cumulée, une

infection par l'hépatite B ou C, l'alcoolisme, le diabète, l'obésité et la stéatohépatite non alcoolique [581].

La Neurotoxicité aiguë, subaiguë ou chronique peut survenir lors d'u traitement par le MTX. Cette toxicité est principalement observée après administration du médicament par voie intrathécale ou intraveineuse. Cette toxicité est due à e l'interférence du MTX avec les réactions de transméthylation importantes pour la formation de la myéline, le MTX diminue également le taux de méthionine et de S-adénosyl méthionine dans le liquide céphalo-rachidien et augmente les taux de S-adénosyl homocystéine et d'homocystéine. Il a été démontré que des taux élevés d'homocystéine peuvent être responsables des phénomènes vasculaires de neurotoxicité du MTX [582–584].

Le traitement par le MTX est associé avec des affections des tissus ectodermaux (inflammation de la muqueuse buccale, toxicité gastro-intestinale, toxicité cutanée et neurotoxicité). [585]. La toxicité gastrointestinale dose-dépendante est la toxicité principale survenant lors du traitement avec le MTX. L'entérocolite est la toxicité majeure de la chimiothérapie anticancéreuse à base de méthotrexate, ce qui limite ses applications cliniques. Le MTX agit via la production des ROS et en étant un antifolate qui inhibe la synthèse d'ADN et provoque l'apoptose des entérocytes, l'ulcération de la muqueuse intestinale, la malnutrition et la rupture de la barrière de la muqueuse intestinale. Cette toxicité aboutit a une atrophie de la villosité intestinale, ceci augmente le risque de septicémie associée à l'intestin [586,587].

La pneumonite est l'un des effets secondaires les plus graves mais les plus rares du MTX à faible dose. La pneumonite est une réaction d'hypersensibilité au MTX médiée par les lymphocytes T activés. le MTX entraîne une libération de cytokines par les cellules alvéolaires de type 2 provoquant une alvéolite par recrutement de cellules inflammatoires [588,589].

Le traitement chronique ou aigu par le MTX est toujours associé à une hématotoxicité morbide et parfois mortelle lors du traitement chimio thérapeutique des leucémies ou bien à faible dose lors du traitement chronique de l'AR. La myélosuppression, la pancytopénie, la thrombocytopénie, la leucopénie et l'anémie mégaloblastique sont les principales manifestations de l'hématotoxicité du MTX. [590].

V. Matériel et méthodes

V.1 Collecte et extraction du Pollen

Le pollen d'abeilles frais a été obtenu à partir de colonies d'abeilles mellifères localisées dans la région de Séfrou au Maroc auprès d'un apiculteur professionnel en 2017 et conservé dans un réfrigérateur (-20°C). Ce pollen est extrait par macération à température ambiante pendant 1

semaine dans de l'éthanol 70% sous agitation puis une sonication par un vibrateur ultrasonique pendant 30 minutes avant filtration [6]. Ensuite, l'extrait a été filtré sur papier filtre Whatman N°1 et concentré par évaporation rotative sous vide à 60 °C. L'extrait éthanolique du pollen frais (EEPF) ainsi obtenu vas servir par la suite à faire les analyses biochimiques nécessaires et à préparer la concentration de gavage de 500 mg/kg de poids corporel.

V.2 Analyses chimique de l'EEPF

V.2.1 Détermination de la teneur en cendres

La teneur en cendres a été mesurée selon la méthode de gravimétrie une incinération (Cf. chapitre 2).

V.2.2 Détermination du contenu minéral

Les éléments minéraux ont été déterminés comme décrit précédemment dans le chapitre 2 (Cf. chapitre 2).

V.2.3 Identification des composés phénoliques par chromatographie liquide ultraperformante couplé à un détecteur à barrette de diodes (UPLC-DAD)

L'extrait éthanolique de l'échantillon de pollen a été analysé à l'aide d'un chromatographe Shimatzu Nexpera X2 équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) (Shimadzu, SPD-M20A) selon la méthode décrite par Ferreira-Santos et *al.*[591]. La séparation a été réalisée sur une colonne Aquity UPLC BEH C_{18} en phase inverse (2,1 mm × 100 mm, taille des particules de 1,7 µm ; de Waters) et une pré-colonne du même matériau à 40 ◦C. Le débit était de 0,4 mL/min. Des solvants de qualité HPLC eau/acide formique 0,1 % (A) et acétonitrile (B) ont été utilisés. Le gradient d'élution du solvant B était le suivant : de 0,0 à 5,5 min, éluant B à 5 %, de 5,5 à 17 min, augmentant linéairement de 5 à 60 %, de 17,0 à 18,5 min, augmentant linéairement de 60 à 100 % ; la colonne a été équilibrée à 5 % de 18,5 à 30,0 min. Les composés phénoliques ont été identifiés en comparant leurs spectres UV et leurs temps de rétention avec ceux des standards correspondants. La quantification a été effectuée en utilisant des courbes d'étalonnage pour chaque composé analysé à des concentrations comprises entre 250 et 2,5 mg/L. Dans tous les cas, le coefficient de corrélation linéaire était R2 > 0,99. Les composés ont été quantifiés et identifiés à différentes longueurs d'onde (209-370 nm). Les valeurs des composés phénoliques individuels ont été exprimées en milligrammes par kilogramme de pollen (mg/Kg).

V.2.4 Dosage du contenu total en polyphénols

La teneur en phénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Ferreira-Santos et *al.* Brièvement, 60 µL de réactif de Folin Ciocalteu et 15 µL de solution de

carbonate de sodium (75 g/L) ont été ajoutés à 5 µL d'extrait hydro-éthanolique de pollen. La concentration de la couleur produite a été mesurée à 700 nm après incubation du mélange pendant 5 min à 60 °C. L'acide gallique (0-500 mg/L) a été utilisé comme standard (R2 = 0,996) et les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de pollen (mg EAG/g).

V.2.5 Dosage du contenu total en flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux ont été déterminés selon la procédure décrite par Ferreira-Santos et *al.*[592] . 100 µL de l'extrait de pollen ont été mélangés avec du nitrite de sodium (5%) et de 150 µL de solution d'$AlCl_3$ (10%). Après 6min, 200 µl de solution de NaOH (1%) ont été ajoutés et le mélange a été correctement mélangé et laissé reposer à l'obscurité pendant 60 min. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. La quercétine (2,6-142 mg/L) a été utilisée pour réaliser la courbe standard (R^2 = 0,997). Les résultats ont été exprimés en milligramme d'équivalent de la quercétine (EQ) par gramme de pollen (mg EQ/g).

V.2.6 Activité antiradicalaire anti- $ABTS^+$

L'activité antiradicalaire anti-ABTS de l'extrait de pollen a été déterminée comme suit : 200 µL de solution de cation radicalaire 2,2′-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) sel de d'ammonium (ABTS) a été mélangé avec 10 µL de différentes dilutions de l'extrait de pollen. Les solutions résultantes ont été incubées dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante et l'intensité de la coloration produite a été mesurée immédiatement à 734 nm[591]. Le Trolox a été utilisée comme contrôle positif. Le pourcentage d'inhibition radical ABTS a été déterminé à l'aide de l'équation suivante, et les résultats des IC_{50} ont été exprimés en (µg/mL).

$$\%\ \text{d'inhibition} = \frac{\text{Abs de contrôle} - \text{Abs de l'échantillon}}{\text{Abs de contrôle}} \times 100 \quad (6)$$

V.2.7 Activité antiradicalaire anti-DPPH

Selon Ferreira-Santos et *al.*[591], 270 µL de la solution de 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) (150 µM), préparée dans du méthanol avec une absorbance de 0,700 ± 0,01 à 515 nm a été ajouté à 30 µl de différentes dilutions de l'extrait de pollen. Ensuite, les mélanges réactionnels ont été incubés à l'obscurité pendant 1h à la température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 515 nm et l'activité antiradicalaire (% d'inhibition) a été calculée en utilisant l'équation (6). La concentration capable d'inhiber 50 % du radical DPPH est déterminée à l'aide de six dilutions différentes de l'échantillon, en considérant que le pourcentage d'inhibition devrait être compris entre 20 % et 80 %, et les résultats ont été exprimés en microgramme

d'extrait de pollen par mL (µg/mL). L'éthanol (70 %) a été utilisé comme solution de contrôle à la place de l'échantillon, et le Trolox a été utilisée comme contrôle positif.

V.2.8 Détermination du pouvoir réducteur ferrique (FRAP)

Le pouvoir réducteur ferrique de l'extrait de pollen frais a été déterminé comme décrit par Ferreira-Santos et *al.*[591]. 290 µL de réactif FRAP a été mélangé avec une aliquote de 10 µL de l''échantillon de pollen, l'absorbance a été lu à 593 nm après l'incubation du mélange réactionnel à 37 °C pendant 15 min. Une solution aqueuse de sulfate ferreux $FeSO_4.7H_2O$ (1000–100 µM) a été utilisée pour la préparation de la courbe d'étalonnage (R^2 = 0,993). Les valeurs de FRAP sont exprimées en micromoles d'équivalent ferreux par g de pollen (µmol Fe2+ /g).

VI. Protocole expérimental

VI.1 Approbation éthique

Dans cette étude expérimentale, des rats mâles albinos Wistar sains pesant entre 180 et 220 g ont été utilisés. Les animaux ont été obtenus auprès de l'animalerie du laboratoire SNAMOPEQ. Faculté des sciences Dhar Mehraz, Fès, Maroc en juin 2018. Une approbation éthique a été obtenue (Cf. chapitre 3).

VI.2 Répartition des animaux expérimentaux

Dans cette expérience, 24 rats ont été utilisés et divisés en quatre groupes (n = 6 dans chaque groupe) et ont été réparti selon l'ordre suivant :

Groupe 1 (Contrôle) : est un groupe témoin qui a reçu de l'eau de boisson par voie orale à titre de 1 mL/kg de poids corporel/jour pendant 15 jours, une dose unique de solution saline (0,1 mL) a été injectée par voie intrapéritonéale (i.p) le 3ème jour.

Groupe 2 (EEPF) : est un groupe qui a reçu par voie orale 500 mg/kg/jour de l'extrait éthanolique de pollen frais (EEPF) pendant 15 jours, avec une seule injection (i.p) le 3ème jour de 0,1 mL de solution saline.

Groupe 3 (MTX) : est un groupe qui a reçu de l'eau de boisson par gavage (1mL/kg de poids corporel/jour) pendant 15 jours, avec une seule injection intrapéritonéale d'une dose unique de méthotrexate 20 mg/kg le 3ème jour [593].

Groupe 4 (MTX+EEPF) : est un groupe qui a reçu par voie orale l'EEPF (500 mg/kg PC/jour) pendant 15 jours à partir du 4ème jour. Les rats ont été injectés par une dose unique de MTX (20 mg/kg PC) par voie intrapéritonéale le 3ème jour.

VI.3 Médicament de référence

Le méthotrexate (QUINUX 20 MG / 0.8 mL, Solution injectable en seringue pré-remplie, IBERMA, Maroc) a été utilisée comme médicament de référence.

VI.4 Prise de poids corporel et poids des organes (foie, rein)

Après dissection, le foie et les reins frais ont été placés sur du papier et pesés séparément sur une balance analytique pour obtenir leur poids. Le poids des organes a été exprimé en grammes.

VII. Analyse biochimique

VII.1 Évaluation de la fonction hématologique

Vers la fin de l'expérience, deux prélèvements rétro-orbitaux ont été faits pour les analyses ultérieures. Le premier était un prélèvement du sang total récupéré dans des tubes à EDTA pour évaluer les paramètres hématologiques (hémogramme) tels que le nombre de globules rouges (GR), nombre de globules blancs (GB), nombre de plaquettes (PLT), hémoglobine (Hb), hématocrite (Hte), volume corpusculaire moyen (MCV), hémoglobine corpusculaire (MCH), concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire(MCHC), le nombre de lymphocytes, de neutrophiles, de monocytes et d'éosinophiles ont également été analysés.

VII.2 Évaluation de la fonction néphro-hépatique et profil lipidique

Le deuxième prélèvement a été récupéré dans des tubes secs pour faire les analyses du profil lipidique (TC, TG, HDL et LDL), les paramètres rénaux (urée, acide urique, créatinine, CRP, protéines et taux d'albumine), et la fonction hépatique (PAL, AST, LDH et GGT). Les paramètres hématologiques

Ensuite, les rats ont été sacrifiés et les échantillons de rein et de foie ont été prélevés et chaque organe a été divisé en deux parties. La première portion a été homogénéisée dans une solution saline tamponnée au phosphate froide (0,1 M ; pH 7,4) et centrifugée. Le surnageant a été collecté et stocké à -20°C pour analyser les paramètres du stress oxydatif (MDA, catalase, glutathion peroxydase et glutathion). La deuxième partie a été fixée dans une solution de formol à 10 % pour les études anatomopathologiques.

VII.3 Dosage du malondialdehyde (MDA) dans le rein et le foie

La peroxydation lipidique dans les homogénats de rein et de foie a été évaluée par la mesure des niveaux de MDA en utilisant la méthode décrite par Draper et Hadley [594]. Le principe de cette méthode est la mesure spectrophotométrique (à 532 nm) de la couleur formée dans la réaction de l'acide thiobarbiturique TBA avec le MDA. Le 1, 1,3,3-tétraéthoxypropane a été utilisé comme standard pour calculer le niveau de MDA et les résultats ont été exprimés en nmoles de MDA par gramme de tissu.

VII.4 Dosage des enzymes antioxydantes dans les reins et le foie

L'activité de la catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode d'Aebi et al. [595]. L'activité a été exprimée en mmol de H_2O_2/mg de protéines. L'activité de la glutathion (GSH) a été dosée selon la méthode décrite par Ellman G. [596] et exprimée en µmoles par gramme de tissu. L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été déterminée selon la méthode décrite par Flohe et Gunzler [597]. L'activité GPx a été exprimée en nmoles de GSH oxydé/min/mg de protéines.

VIII. Examen anatomopathologique

Après dissection, les reins et le foie ont été nettoyés des tissus adhérents et fixés dans une solution de formaldéhyde à 10 %. Après fixation, les échantillons ont été traités dans une série d'alcool et de xylène classés, inclus dans de la paraffine et colorés avec H et E (hématoxyline et éosine) pour être examinés par microscopie optique.

IX. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SD et la comparaison entre les groupes a été réalisée par le logiciel Graph Pad Prism 5 en utilisant la variance (ANOVA) suivie d'un test de comparaison multiple post hoc de Tukey. Le test khi deux X^2 a été utilisé pour comparer la différence dans la proportion de l'effet du MTX et de l'EEPF sur les paramètres oxydatifs entre les reins et le foie.

X. Résultats et discussion

X.1 Analyses chimiques, pouvoir antioxydant et profil phénolique de l'EEPF

Les radicaux libres sont des atomes contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui les rend très « réactifs ». Ils sont constamment produits lors de l'utilisation de l'oxygène pour produire l'ATP dans les mitochondries. La capacité de la molécule O_2 à accepter des électrons, génère des molécules instables telles que l'anion superoxyde ($^{\bullet}O_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^-) et le l'oxygène singulet ($^1O_2$), ces molécules sont produites par toutes sortes de cellules. Il existe d'autres voies de formation des radicaux libres tels que les enzymes (NADPH oxydase, xanthine oxydase, oxyde nitrique synthase), les rayonnements ionisants UV, ainsi que par le métabolisme d'une large gamme de médicaments et de xénobiotiques. Physiologiquement, les ROS sont indispensables pour le bon fonctionnement des cellules (signalisation et homéostasie), mais quand ils sont produits excessivement ou bien ne sont pas métabolisés, les dégâts du stress oxydant commencent à apparaître [598–600]. Face à la toxicité des ROS, l'organisme a développé un système de défense cellulaire impliquant des enzymes antioxydantes endogènes qui dépendent des nutriments antioxydants apportés par l'alimentation y compris les vitamines, les carotènes, les minéraux et les composés phénoliques.

Les résultats obtenus dans cette étude concernant le contenu minéral sont présentés dans le Tableau 25 est montrent que notre échantillon est hautement riche non seulement en macroéléments comme le potassium (1145,12 ± 13,24mg/kg), et le calcium (901,76 ± 24,76 mg/kg) mais aussi en éléments traces tels que le fer (356,51 ± 11,67 mg/kg), le zinc (26,19 ± 2.17 mg/kg), le magnésium (471,89 ± 19,10 mg/kg)et le cuivre (1,01 ± 0,01 mg/kg). Ces éléments (Zn, Cu, Mg, Fe) sont les principaux minéraux impliqués dans la fonction antioxydante des cellules, leurs effets antioxydants contribuent à l'action en tant que cofacteurs des enzymes antioxydantes. Le cuivre et le zinc sont des cofacteurs de la Cu, Zn-superoxyde dismutase (superoxyde dismutase dépendante du Zn et Cu) qui est responsable de l'élimination des radicaux superoxydes. Le fer est un cofacteur essentiel de la catalase, la fameuse enzyme antioxydante responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène, ces trace éléments sont fortement conseillés seuls ou en combinaison pour les patients en état de maladie critique [601,602]. Ces données suggèrent un potentiel antioxydant important de notre pollen qui peut être utilisé comme un agent thérapeutique contre les maladies liées au stress oxydant.

Tableau 25: Composition minérale du pollen d'abeilles frais

EEPF	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Cu (mg/kg)
	1145,12±13,24	901,76±24,76	471,89±19,1	356,51±11,67	26,19±2,17	1,01±0,01

Les composés phénoliques sont une classe principale de métabolites secondaires retrouvés dans tout le matériel végétal y compris les aliments à base de plantes, et sont divisés en acides phénoliques et polyphénols. Parmi ces métabolites on trouve les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins qui sont considérés comme étant les principaux composés phénoliques alimentaires. Ils sont connus par leur capacité à réduire les dégâts oxydatifs en agissant comme agents antioxydants, la raison pour laquelle la détermination quantitative et qualitative de la composition phénolique des produits naturels est cruciale pour leur valorisation et pour comprendre leurs mécanismes d'action comme antioxydant au niveau cellulaire [603–606].

Les résultats relatifs au profil phénolique de notre échantillon de pollen frais sont présentés dans le Tableau 26 et ont révélé la présence de 13 molécules phénoliques réparties en 4 groupes ; 6 molécules de flavonoïdes ont été détectées dans cet échantillon avec une dominance de la quercétine (256,1 ± 0,9 mg/kg) et de la rutine (118,3 ± 10,1 mg/kg). L'apigénine, la naringine, la hespéridine et le Kaempférol sont aussi identifiés dans cet échantillon.

Le groupe des acides Hydroxycinnamiques est représenté dans sa majeure partie par l'acide rosmarinique avec une concentration de 253,1 ± 3,6 mg/kg. Les autres acides identifiés de ce

groupe sont ; l'acide ferulique, l'acide o-coumarique, l'acide Chlorogenique et l'acide cinnamique. L'acide ellagique et la seule molécule du groupe des acides hydroxybenzoïques identifiée (36,9 ± 3,4 mg/kg), le résveratrol et le seul stilbène identifié dans cet échantillon (96,5± 7,2 mg/kg). Ces résultats sont similaires à ceux d'autres auteurs qui ont pu identifier les acides hydroxycinnamiques, les acides hydrobenzoïques, les flavonoïdes, et les Stilbènes [156,207,607].

Tableau 26: identification et quantification des composés phénoliques dans l'extrait de pollen d'abeilles frais

Composés phénoliques	Valeur en (mg/kg)
Acides Hydroxycinnamiques	
Acide o-coumarique	17,5 ± 2,0
Acide ferulique	29,5 ± 3,1
Acide cinnamique	12,9 ± 0,9
Acide rosmarinique	253,1 ± 3,6
Acide chlorogenique	15,1± 1,3
Acides Hydroxybenzoïques	
Acide ellagique	36,9 ± 3,4
Flavonoïdes	
Naringine	78,0 ± 3,1
Hespéridine	41,4 ± 4,8
Apigénine,	92,3 ± 6,0
Rutine	118,3 ± 10,1
Quercétine	256,1 ± 0,9
Kaempférol	7,8 ± 0,2
Stilbènes	
Résveratrol	96,5 ± 7,2
Total	1055

Le pouvoir antioxydant puissant des composés phénoliques est attribué à leur capacité à piéger les radicaux libres, de donner des atomes d'hydrogène, des électrons ou de chélater les cations métalliques. Les résultats du pouvoir antioxydant de l'EEPF sont résumés dans le Tableau 27 et montrent que le contenu total en polyphénols de L'EEPF était de (15,75 ± 0,09mg EAG/g) alors que le contenu total en flavonoïdes était de (5,68± 0,23mg EQ/g). Les résultats montrent aussi que le l'EEPF est doté d'une activité antiradicalaire anti DPPH est anti-ABTS importante

avec une valeur IC_{50} de (95,15 ± 0,91µg/mL et 387,79 ± 7,18 µg/mL) respectivement. Le pouvoir réducteur était de (191,64 ± 3,13 µmol Fe^{2+}/g). Ces résultats sont presque similaires avec ceux des pollens Marocains de différentes régions représentées dans l'étude précédente (cf. chapitre 2) [6].

Tableau 27: Contenu en polyphénols, flavonoïdes totaux et activité antioxydante de l'EEPF

Paramètres	TPC (mg EAG/g)	TFC (mg EQ/g)	DPPH IC_{50} (µg/mL)	ABTS IC_{50} (µg/mL)	FRAP (µmol Fe^{2+}/g)
EEPF	15,75 ± 0,09	5, 68± 0,23	95,15 ± 0,91	387,79 ± 7,18	191,64 ± 3,13

La composition chimique et minérale du pollen dépend étroitement de plusieurs facteurs tels que l'origine botanique et géographique des plantes butinées, la saison de récole, les conditions climatiques et les conditions et la durée de stockage [2].

X.2 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction hématologique

Dans la présente étude, les résultats présentés dans le Tableau 28 montrent que le MTX a induit une hématotoxicité chez les rats après une injection intrapéritonéale unique (20 mg/kg). Vers la fin de la deuxième semaine, une anémie est observée chez les rats traités par le MTX cette anémie est caractérisée par une diminution significative de nombres d'érythrocytes, de l'hémoglobine, et de l'hématocrite par apport au groupe contrôle. Une hausse légère du MCV a été observée chez le groupe MTX mais reste non significative.

Ces changements sont accompagnés par une thrombocytopénie et une leucopénie notamment une neutropénie, ce que l'on appelle « la pancytopénie » (l'association d'une anémie, une leucopénie et une thrombopénie). La leucopénie observée chez le groupe traité par le MTX est caractérisée par une neutropénie sévère.

Ces résultats sont conformes avec les résultats cliniques rapportés par de nombreuses études de cas réalisé sur des patients sous traitement par le MTX. Ces études indiquent que le traitement par le MTX provoque une myélosuppression le plus souvent caractérisée par une pancytopénie dose dépendante fatale avec une incidence de 1,4% qui peut apparaître faible mais très mortelle avec un taux de mortalité de plus de 44 %[608–612]. D'autres études cliniques ont confirmé l'installation d'une neutropénie fatale, la neutropénie étant la forme la plus sévère de leucopénie observée lors du traitement par le MTX [613–615].

Le mécanisme de développement de la pancytopénie et de la neutropénie associée au MTX n'est pas encore clair mais il est étroitement lié à certains facteurs tels que l'âge, la déshydratation,

l'insuffisance rénale, les infections et la prise concomitante d'autres médicaments (anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs des pompes à protons, et médicaments antidiabétiques) [538,616].

L'hypoalbuminémie semble le facteur le plus fréquemment observé chez les patients sous traitement du MTX présentant une hématotoxicité. Cette protéine joue un rôle important dans la pharmacocinétique du médicament car le MTX est un acide faible qui se lie avec de nombreuses protéines essentiellement l'albumine (avec 50% de liaison) pour être transporter dans le sang [617]. Le MTX non lié à l'albumine, peut pénétrer dans les cellules via le transporteur de folate réduit puis le MTX est converti en polyglutamates intracellulaires[616]. Par conséquence, l'hypoalbuminémie observée chez les sujets âgés ou bien avec des défaillances rénales provoque une prolongation du temps de clairance du MTX par les reins, l'élimination retardée du MTX provoque une accumulation intracellulaires des polyglutamates de MTX au niveau des érythrocytes, des globules blancs, des hépatocytes et des cellules synoviales ce qui augmente potentiellement sa toxicité. Les polyglutamates sont des produits qui peuvent rester longtemps dans les érythrocytes qui servent comme « dépôt » après que le MTX soit éliminé du plasma permettant ainsi une libération prolongée du médicament et affectant ainsi sa toxicité [533,617,618].

Le traitement par le MTX provoque non seulement une augmentation du signal de l'apoptose des lymphocytes T activées via l'inhibition des enzymes folate-dépendantes par les glutamates intracellulaires mais aussi une inhibition des molécules d'adhésion exprimées sur les lymphocytes T et responsables à la communication cellule-cellule. Cet effet est associé à la génération des ROS et dépend de la dose et de la durée du traitement [559,619,620]. La lymphocytopénie observée dans cette étude est non significative en raison de la courte durée de traitement (15 jours). L'effet myélosuppresseur du MTX est responsable aussi à la monocytopénie hautement significative observé chez les rats traité par le MTX dans cette étude. Contrairement à la littérature qui décrit le phénomène d'une éosinophilie associé à la pancytopénie lors d'une toxicité pulmonaire (réaction allergique du MTX au niveau interstitiel pulmonaire) [621–623]. Nous avons observé une éosinopénie chez le groupe traité par le MTX. Cette diminution du nombre des éosinophiles pourrait s'expliquer par l'effet myélosuppresseur du MTX.

Les résultats de la présente étude montrent clairement que l'administration orale et quotidienne de l'EEPF a inversé ces effets toxiques et a significativement augmenté tous les paramètres abaissés par le MTX. Ces résultats vont de pair avec ceux décrit par David Banji et al. qui ont pu démontrer l'effet protecteur du curcumin contre l'hématotoxicité induite par le MTX chez

le rat [624].L'administration de l'EEPF seul chez les rats a provoqué une augmentation significative du nombre des érythrocytes et de l'hémoglobine ainsi qu'une augmentation moins significative des plaquettes sanguines par rapport aux rats du groupe contrôle. Ces résultats sont similaires avec ceux trouvés par Ana Haro et al. où ils ont démontré l'effet positif du pollen sur les paramètres sanguins chez les rats [625]. D'autre part il n'y avait pas de changement significatif dans le reste des paramètres (GB, Hte, MCV, MCH, MCHC, Lymphocytes, neutrophilles, monocytes et eosinophiles) après administration de l'EEPF seul.

Tableau 28: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les paramètres hématologiques

Paramètres	Contrôle	EEPF(500mg/k)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
GR (106/ul)	8,39±0,12	16,9±0,78^{a***}	5,75±2,07 ^{a**}	12,07±1,15^{a**,b***}
GB (103/ul)	8,8±1,2	7,9±1,02	3,55±0,63^{a**}	5,95±0,35^{a**,b**}
Hte (%)	46,6±4,25	48,8±1,09	25,9±3,81^{a***}	44,8±2,6^{b***}
Hb (g/dl)	15,7±1,1	18,8±0,85^{a***}	10,3±0,42^{a***}	12,13±0,6^{a***,b*}
MCV (FL)	57,9±0,9	59,3±0,78	63,35±1,06	59,2±4,23^{b*}
MCH (pg)	19,8±1,1	20,8±1,01	18,95±0,07	19,5±2,17
MCHC (g/dl)	34,9±2,1	36,78±1	29,5±0,7 ^{a**}	35,55±1,35
PLT (10^3/ul)	638±23	742±31^{a*}	547,5±36,06^{a*}	676,33±54,15^{b**}
Lymphocytes (%)	80,2±2,9	81±3,02	78,5±4,7	78,66±2,82
Neutrophiles (%)	27±2,2	26±1,02	7±2,82^{a***}	23,5±4,94^{b***}
Monocytes (%)	3,8±0,2	4±0,32^{a*}	2 ±0,13^{a***}	4±0,41^{b***}
Éosinophiles (%)	1,3±0,2	1,1±0,1	0,5±0,07^{a***}	1±0,07 ^{a**,b***}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0, 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

L'hématotoxicité du MTX est associée à son mécanisme d'action cellulaire antifolate et antiprolifératif (antinéoplasique), les cellules progénitrices en prolifération active et rapide en phase S du cycle cellulaire dans la moelle osseuse sont soumises à un processus d'élimination irréversible[538,616,626,627].

Étant donné que le mécanisme d'action du MTX repose sur l'effet antifolate, plusieurs études ont été menées sur des cas cliniques pour évaluer l'effet d'une supplémentation du folate sur l'efficacité et la toxicité du MTX. Ces études ont démontré que la supplémentation en folate représente une « thérapie de secours » pour réduire les manifestations toxiques associées au traitement par MTX sans avoir affecter son efficacité [608,628–632]. De ce fait le pollen d'abeilles frais peut représenter une alternative naturelle et efficace pour l'atténuation de

l'hématotoxicité induite par le MTX en raison de sa composition riche en vitamines et plus particulièrement en acide folique (vitamine B9) [2,128].

X.3 Effet des différents traitements sur le poids corporel, le poids des organes et leur poids relatifs

Pour évaluer l'effet protecteur de l'EEPF contre la toxicité induite par le MTX, nous avons commencé par la mesure du poids corporel initial du jour 0 et le poids final du jour 15. Le poids du foie et des reins ainsi que leurs poids relatifs ont aussi été mesurés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 29 et montrent que l'injection intrapéritonéale du MTX (20 mg/kg) a provoqué une perte très significative du poids corporel en comparaison du poids final avec le poids initial et avec le poids du groupe contrôle, cette perte a été restaurée par l'administration quotidienne de l'EEPF (500 mg/kg). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par de nombreux auteurs qui confirment la perte extensive du poids corporel chez les rats traités par le MTX à différentes doses [624,633,634]. Le mécanisme impliqué dans la perte importante du poids pourrait être expliquée par l'effet retardateur de la croissance induit par le MTX via son mécanisme ciblant l'enzyme DHFR. Le MTX étant un médicament antifolate qui cible la voie de synthèse de l'ADN aboutissant à un retard de la croissance caractérisée par une dégénérescence des tissus en phase rapide de développement et une ostéopénie (diminution de la masse osseuse) [633,635–638]. D'autres études suggèrent que La perte du poids corporel est pourrait être liée aussi à l'effet cytotoxique du MTX sur les cellules épithéliales et les cellules souches du tractus gastro-intestinal, ou aussi à la détérioration de la barrière intestinale aboutissant ainsi à une mauvaise digestion des aliments et à une malabsorption des nutriments. La détérioration de l'équilibre du microbiote intestinal induit par le MTX est aussi suspectée [639–642]. Le maintien du poids corporel observé chez les rats traités par l'EEPF est probablement lié à sa composition en probiotiques qui possèdent un impact positif sur la muqueuse intestinale via le maintien d'une prolifération continue des cellules épithéliales intestinales assurant ainsi une augmentation de la biodisponibilité des nutriments ou encore via l'induction de la production des facteurs de croissance [65,178,190,643,644].

Le poids des organes est un indicateur important dans les études de la toxicité des médicaments, car des différences significatives du poids des organes peuvent se produire en l'absence de tout changement morphologique [645]. Dans la présente étude, les résultats montrent une augmentation significative du poids relatif du foie et du rein des rats traités par le MTX (Tableau 29), tandis que le co-traitement avec l'EEPF a inversé cet effet de manière significative. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par Prerna et Laaroussi et leurs collaborateurs qui ont

observé une augmentation du poids relatif du foie et du rein chez les rats traités par le MTX et la gentamicine [646,647]. L'augmentation du poids relatif des organes est probablement due à la formation des ROS qui conduisent aux lésions hépatiques ou rénales à l'inflammation des organes ou au dépôt du collagène dans les hépatocytes. [496–499]. Le pollen d'abeilles exerce son effet protecteur contre la toxicité du MTX au niveau des organes via son effet antiradicalaire et antioxydant due à la présence d'une multitude de polyphénols [650]. Nos résultats montrent que le traitement par le pollen seul n'affecte pas les poids des organes.

X.4 Tableau 29: Effet des différents traitements sur le poids corporel, le poids des organes et leur poids relatifs

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
Poids corporel initial (g)	201,5±3,53	203,33±5,0	205±9,10	205±6,24
Poids corporel final (g)	227,5±2,12	235,33±5,68 ^{a*}	156,5±3,53 ^{a***}	210±2 ^{a*,b**}
% de Gain	11,41±2,38	13,53±4,12	-31,41±3,03 ^{a***}	3,44±1,07 ^{a*,b***}
Poids du foie (g)	7,07±0,87	6,12±0,68	11±1,31 ^{a**}	8,57±1,24 ^{b*}
Poids relatif du foie (g/100g PC)	3,10±0,35	2,6±0,3	7,02±0,68 ^{a***}	4,55±0,34 ^{a*,b***}
Poids du rein (g)	1,59±0,24	1,46±0,3 ^{a*}	1,85±0,1 ^{a***}	1,51±0,17 ^{b***}
Poids relatif du rein (g/100g PC)	0,69±0,09	0,50±0,1	1,81±0,13 ^{a***}	0,71±0,09 ^{b***}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

X.5 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction rénale

X.5.1 Effet des différents traitements sur les paramètres biochimiques rénaux

Le rein est l'organe de drainage le plus important dans le corps, il est responsable de l'élimination d'une multitude de médicaments, de xénobiotiques et de déchets issu du métabolisme des composés endogènes [651]. Il est maintenant évident que les médicaments peuvent provoquer un dysfonctionnement rénal qui se présente sous forme de lésions cellulaires ou d'insuffisance rénale. Certains médicaments perturbent la perfusion rénale et induisent une perte de capacité de filtration, d'autres endommagent directement les cellules vasculaires, tubulaires, glomérulaires et interstitielles[652].

Cliniquement, la néphrotoxicité associée au méthotrexate est assez fréquente chez les patients sous traitement à faible ou à forte dose du MTX, avec un taux de morbidité et de mortalité significativement élevé à cause de l'insuffisance rénale résultante [653–655].

les marqueurs de la fonction rénale jouent un rôle très important dans le diagnostic de l'atteinte rénale et l'évaluation de la fonction rénale, et sont couramment utilisés comme indices de la fonction glomérulaire, alors qu'une augmentation de ces marqueurs dans le sang indique une détérioration de cette fonction [656].

Dans ce présent travail, nous avons exploré l'effet de l'EEPF (500 mg/kg) contre la néphrotoxicité induite par le MTX (20 mg/kg) chez les rats, les taux sériques de la créatinine de l'urée, l'acide urique, les protéines totales, et l'albuminémie ont été évalués comme marqueurs de la fonction rénale. Les résultats sont présenté dans le Tableau 30 et indiquent que les lésions rénales induites par le MTX étaient évidentes chez les rats traités par le MTX seul, car les taux sanguins de la créatinine, de l'urée, de l'acide urique et de la CRP ont significativement augmentés. Une diminution significative du taux de la protéinémie et de l'albuminémie a été observée chez les rats du même groupe. Nos résultats ont aussi montré que l'EEPF a significativement inversé les variations pathologiques de ces marqueurs rénaux liés à l'intoxication par le MTX, chez les groupes co-traités par l'extrait de pollen frais (Tableau 30). Le pollen a exercé le même effet dans d'autres modèles expérimentaux de néphrotoxicité induite expérimentalement par le cisplatine ou le fipronile et l'emamectine benzoate[657,658]. Nos résultats rejoignent aussi les résultats d'autres études effectuées sur les rats intoxiqués par une over dose du MTX [659–661].

Dès lors que 90% du MTX est éliminé par le rein, l'étiologie du dysfonctionnement rénal induite par le MTX est médiée par la précipitation du MTX et de ses métabolites dans les tubules rénaux provoquant l'obstruction de la lumière tubulaire, ou via un effet toxique direct sur les tubules rénaux participant à une nécrose tubulaire. Cette néphrotoxicité aboutit à une retardation de l'élimination du médicament induisant de plus en plus d'autres dégâts cellulaires [662,663]. En effet, notre étude a révélé que le MTX a exercé un effet toxique direct sur le rein, traduit par l'augmentation de l'urée et de la créatinine sériques. L'augmentation du taux sérique de l'urée indique une diminution de plus de 50% de la filtration glomérulaire et l'apparition d'une lésion parenchymateuse rénale marquée [664]. En outre, le MTX est un acide faible qui doit, obligatoirement, se lier avec l'albumine sérique pour être transporté vers le compartiment intracellulaire, par conséquence, une hypoalbuminémie, prolonge le temps de demi vie du médicament et augmente son concentration sérique ce qui implique l'augmentation de sa toxicité. En effet, une hypoalbuminémie et hypoprotéinémie significatives ont été observées chez les rats traités par le MTX par rapport au groupe contrôle (Tableau 30). Cette diminution pathologique du taux de protéines totales et de l'albumine sériques s'est inversée après traitement quotidien par l'EEPF pendant 15 jours. L'effet cytotoxique du MTX sur la synthèse

de l'ADN, de l'ARN et des protéines est à l'origine de la réduction des protéines totales sériques et de l'albumine sérique observée. Elle pourrait aussi être due à plusieurs facteurs tels que les lésion hépatiques, une augmentation de la perte de protéines intestinales, une perte des protéines due à une néphropathie et/ou une carence en protéines alimentaires, si il y a une diminution de la nutrition du au traitement par le MTX [665].

Tableau 30: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur les paramètres biochimiques rénaux

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF +MTX
Créatinine (mg/l)	4,5±0,7	4,75±0,5	7±1,08[a**]	5,33±0,57[b*]
Urée (g/l)	0,35±0,03	0,35±0,08	0,55±0,05[a**]	0,32±0,05[b***]
Acide urique (mg/l)	10±0,53	10,5±1,78	14±1,02 [a**]	12±1,09
Protéines totales (g/l)	64± 4,24	65,5± 7,50	36± 7,07 [a***]	60,68± 6,56 [b***]
Albumine (g/l)	30,70± 8,06	29,65± 3,27	11,70± 0,89 [a***]	26± 2,64 [b**]
CRP (mg/l)	< 1	<1	1,45±0,07 [a***]	0±0,0 [b***]

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX et l'EEPF+MTX.

La faible solubilité des métabolites du MTX dans les urines à faible pH, la diminution des transporteurs d'anions organiques OATs responsables de la rétention et du transport des métabolites du MTX vers les cellules du tubule proximale, peuvent être à l'origine de la néphrotoxicité du MTX observée [618,654,666].

X.5.2 Effet des différents traitements sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau du rein

Le rein a un taux élevé de métabolisme oxydatif comme en témoigne le fait que les reins intacts qui représentent moins de 1% du poids corporel total représente néanmoins environ 10% de la consommation totale d'oxygène, ce qui expose le tissu rénal à un risque continu de lésion tissulaire oxydante [667].

Il est actuellement évident que le MTX exerce son effet létale sur les cellules via l'activation de la NADPH oxydase, des neutrophiles et via le dysfonctionnement des mitochondries et la perturbation de la chaîne respiratoire entraînant ainsi à une production excessive de ROS qui peuvent endommager les protéines, les lipides cellulaires et l'ADN. La surproduction des ROS entraine l'apoptose des cellules épithéliales via l'inhibition des gènes anti-apoptotiques et

l'activation des gènes pro-apoptotiques [668–670]. La surexpression des médiateurs de l'inflammation tels que le TNF-α et la COX-2 ainsi que d'autres molécules pro-inflammatoires peuvent jouer un rôle clé dans la pathogenèse de la néphrotoxicité induite par le MTX [661]. Dans ce contexte, nos résultats (Tableau 31) ont montré une augmentation significative de la MDA, un marqueur de la peroxydation lipidique, dans le rein des rats injectés par le MTX. De plus, les enzymes antioxydantes endogènes; glutathion (GSH), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx) ont été significativement diminués en réponse à l'administration de MTX, ces données sont en harmonie avec des études antérieures dans lesquelles le MTX a augmenté le Taux de MDA et à diminuer les taux de GSH, CAT et GPx cellulaires [661,671–673].

Dans des conditions normales, le NADPH est un donneur d'électrons essentiel et un cofacteur indispensable utilisé pour transférer et réserver le potentiel de réduction pour de nombreuses réactions anaboliques, il est nécessaire pour générer des formes réduites de molécules antioxydantes comme la GSH et la thiorédoxine (TRX). la GSH réductase convertit la glutathion oxydée GSSG en GSH en utilisant le NADPH comme cofacteur, puis le GSH agit comme co-substrat pour la GSH peroxydase (GPx) qui réduit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'autres peroxydes en H_2O ou en alcool pour désactiver les ROS [674,675]. Ainsi, la réduction significative des niveaux de glutathion (GSH) favorisée par le MTX conduit à une réduction de l'efficacité du système de défense enzymatique antioxydant sensibilisant les cellules aux ROS. Par conséquent, les niveaux de GSH ont diminués, perturbant ainsi l'activité de la GPx, ce qui exacerbe l'état de stress oxydatif rénal. Ces événements entraînent une peroxydation lipidique excessive avec des troubles membranaires et un dysfonctionnement mitochondrial associés [672,676]. Contrairement au GSH et GPX, la catalase est une enzyme auto-catalytique qui se lie étroitement au NADPH pour potentialiser son activité, mais elle ne l'utilise pas comme cofacteur [677]. Il reste à noter que le NADPH est nécessaire pour maintenir une activité de l'enzyme DHFR des mammifères induisant à un bon métabolisme du folate [678]. Ce qui nous mène à croire que l'augmentation du NADH peut agir à ce niveau pour contrarier l'effet du MTX.

Il est intéressant de noter que les résultats (Tableau 31) de la présente étude ont démontré que l'EEPF a exercé des actions rénoprotectrices marquées, comme le confirme la diminution de la peroxydation lipidique, l'augmentation des niveaux tissulaire de la GSH, la GPx et la Catalase. Ces résultats rejoignent ceux d'autres auteurs qui ont montré l'effet protecteur du pollen contre néphrotoxicité induite par le stress oxydatif, chez le rat traité par le cisplatine, les pesticides comme le propoxur, et l'acide propionique [679–682].

Tableau 31: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les marqueurs du stress oxydatif dans le rein

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
CAT (µmol H2O2/min/mg pr)	15,53±1,52	19,93±3,02	8,15±2,07[a**]	17,07±3,59[b**]
GSH (µg/g tissu)	229,53±17,10	230,63±18,11	176,87±19,53[a***]	217,04±21,67[b***]
GPx (nmol GSH/min/mg pr)	3,79±0,78	4,58±0,94	1,68±0,62[a*]	4,07±1,19[b*]
MDA (nmol/g tissu)	43,26±8,15	38,50±5,50	79,32±10,19[a***]	53,36±10,19 [b**]

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

Le pollen d'abeilles frais riche en polyphénols est capable d'améliorer les changement pathologiques dus au traitement par le MTX via son effet antioxydant et anti-inflammatoire en inhibant les différentes voie de signalisation moléculaires et enzymatiques déclenchées par la surproduction des ROS [673,683–687]. L'analyse de la composition chimique de notre échantillon a confirmé ce constat et a montré que le l'EEPF est composé d'une variété de composés phénoliques (Tableau 26), principalement ; la naringine, l'acide ferulique, la quercétine et le résveratrol. Des études récentes effectuées sur des rats intoxiqués par le méthotrexate à différentes doses et durées de traitement, ont rapporté que ces molécules se sont avérées protectrices contre la néphrotoxicité induite par le MTX. En se basant sur ces données, on pourrait suggérer que l'EEPF a exercé son effet néphroprotecteur via ces mêmes molécules avec les mêmes mécanismes d'action précédemment élucidés.

X.6 Effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur la fonction hépatique

X.6.1 Effet des différents traitements sur les paramètres biochimiques hépatiques

X.6.1.1 Effet des différents traitements sur les enzymes hépatiques

Le foie est le plus critique et important organe assurant de nombreux processus physiologiques y compris le métabolisme des macronutriments, la régulation du volume sanguin, le soutien du système immunitaire, et le contrôle endocrinien des voies de signalisation de croissance. L'homéostasie des lipides et du cholestérol, la détoxification des toxines, et la dégradation des composés xénobiotiques, tels que les pesticides et plusieurs médicaments actuels sont également attribués au foie. La pathogenèse des maladies hépatiques d'origine médicamenteuses implique généralement la participation du médicament lui-même ou des

métabolites qui affectent directement la biochimie cellulaire ou provoquent une réponse immunitaire inadéquate [688,689].

Cliniquement, il a été rapporté que, soit à forte dose ou bien à faible dose, dans le traitement des différentes maladies nécessitant une thérapie par les anti-métabolites (arthrite rhumatoïdes, psoriasis, leucémie, cancer du sein…), l'administration du MTX augmente les taux sériques des transaminases et augmente le risque de stéatose hépatique non alcoolique. Le MTX provoque une nécrose hépatocellulaire aiguë, une cholestase, une hyperplasie régénérative nodulaire, une fibrose/cirrhose. A forte dose, l'administration du MTX chez des patients atteints de leucémie a provoqué une lésion hépatique médicamenteuse sévère en augmentant les taux de bilirubine de 25 % et de transaminases sériques de 60 % [690–693].

Expérimentalement, de nombreuses études ont utilisé le MTX comme modèle pour induire une hépatotoxicité. Une injection intrapéritonéale unique de MTX (20 mg/kg) chez le rat a été capable de provoquer un stress oxydatif, une toxicité mitochondriale, une fibrose hépatique et une apoptose des hépatocytes [476,694–697].

Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'installation d'une hépatotoxicité par le MTX repose sur une régulation positive des marqueurs pro-inflammatoires tels que ; les facteurs de nécrose tumorale-α (TNF-α) et le NF-κB, les interleukines 6 (IL-6), IL-β1, IL-12 et une régulation négative du récepteur gamma activé par les prolifférateurs des peroxysomes (PPAR-γ ou PPARG) également connu sous le nom de récepteur de la glitazone. Une régulation négative des facteurs antioxydants intrinsèques dans le tissu hépatique, tels que le facteur nucléaire 2 (Nrf2), l'hémoxygénase-1 (HO-1), la NAD(P)H déshydrogénase est aussi impliqué dans la pathogénèse du MTX au niveau hépatique [698–701].

Dans le cas physiologique, le MTX est transporté vers l'hépatocyte par les transporteurs du folate et y converti en MTX polyglutamates (MTX-PGs), après, les MTX-PGs sont reconvertis en MTX par libération des glutamates sous l'action de l'enzymes gamma-glutamyl hydrolase, ainsi le MTX libre est éliminé par les transporteurs unidirectionnels appelés transporteurs à cassettes liant l'ATP (ABCA1) [654,702,703]. Dans le cas pathologique, les MTX-PG ne sont pas éliminés et restent longtemps dans les cellules cibles et déclenche ainsi divers événements pathologiques intracellulaires liés à l'inflammation, au stress oxydatif, à la fibrose et à l'apoptose [700].

En se basant sur nos résultats, l'injection du MTX (20 mg/kg) a provoqué une augmentation significative des transaminases (ALT, AST), du Gamma-glutamyl-transférase (GGT), du lactate déshydrogénase (LDH) chez les rats injectés par le MTX seul par rapport au groupe contrôle. La phosphatase alcaline a augmenté aussi mais de façon moins significative (Tableau

32). Comme mentionné ci-dessus, l'élévation des transaminases et des autres enzymes hépatiques est supposée être liée à la dégénérescence hépatocellulaire induite par les métabolites MTX-PGs MTX via une peroxydation lipidique, qui déclenche une libération des ROS. Les radicaux libres excessifs dans la cellule hépatique provoque une dégénérescence de la membrane hépatocellulaire et par conséquence, une libération de leur contenu intracellulaire dans le liquide extracellulaire, ceci est peut être la cause de l'augmentation des enzymes hépatiques dans le sérum observée suite à l'administration du MTX[704].

Les résultats de notre étude ont démontré un effet protecteur de l'EEPF sur la fonction hépatique via la diminution très marquée des taux sériques de l'ALT, l'AST, la LDH, et l'ALP chez le groupe de rats simultanément traité par l'EEPF après injection du MTX. Nos résultats sont similaires avec ceux de Hend M. Tag et Mojtaba Kalantar et al. où ils ont indiqué l'effet protecteur de l'extrait de feuilles du *Morus nigra* et du crocine, un caroténoïde soluble dans l'eau et responsable de la couleur rouge du safran, qui ont diminué de façon significative les enzymes hépatiques (ALT, AST, LDH et PAL)[649,705]. Le pollen est connu avoir cet effet protecteur dans d'autres modèles animaux d'hépatotoxicité tels que, l'hépatotoxicité induite par le diabète ou par intoxication par le cadmium[706,707].

Tableau 32: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur les paramètres hépatiques

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
AST (U/L)	188±7,07	173,66±16,09	240±2,12 ^{a***}	180,5±7,77 ^{b***}
ALT (U/L)	26,6±7,67	25,50±4,12	56,50±7,77 ^{a***}	25,33±3,51 ^{b***}
GGT (U/L)	5,5±0,7	4,12±0,85	8,94±0,70 ^{a**}	4,3±0,81 ^{b***}
LDH (U/L)	1938,50±68,50	1801,25±239,53	2409,5±91,21 ^{a**}	1844,68±107,61 ^{b**}
PAL (U/L)	265±23,33	260±30,4	322±7,01 ^{a*}	219±20,26 ^{b**}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

X.6.1.2 Effet des différents traitements sur le profil lipidique et la glycémie

Les taux sériques du cholestérol total CT, du cholestérol LDL et HDL, des triglycérides TG et du glucose ont été mesurés et présentés dans le Tableau 33, les résultats indiquent que le MTX a diminué de façon non significative le taux du CT, du LDL-C, et du HDL-C. Par contre le taux des TG et du glucose ont significativement augmenté chez le groupe MTX. En outre le l'EEPF

a augmenté significativement le taux de l'HDL-c indiquant ainsi un effet bénéfique sur l'équilibre lipidique des rats traités que par l'EEPF. A l'exception des TG et de la glycémie, nos résultats rejoignent ceux de Lina Tariq Al Kury et Farideh Doostan et leurs collaborateurs dans leurs études de l'effet du *ginko biloba* et du *Punica Granatum L* sur l'hépatotoxicité induite par le MTX et qui ont rapporté un effet hypolipidémiant du MTX [694,708]. Cette tendance du MTX à diminuer les lipides et les lipoprotéines est liée au fait que l'atteinte du foie est toujours liée à une diminution du profil lipidique [694,709]. L'augmentation du glucose dans notre étude est en accord avec les résultats de Bhakti A. Mhatre et al. [634]. Le mécanisme cellulaire induisant une hyperglycémie n'est pas encore clair mais il est probablement lié à l'hypo-insulinémie induite par la destruction des cellules β-pancréatiques suite à l'injection d'une over dose du MTX.

Tableau 33: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500mg/kg) sur le profil lipidique et la glycémie

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
CT (g/l)	0,57±0,09	0,42±0,04	0,54±0,04	0,43±0,05 ^{b*}
HDL- C (g/l)	0,15±0,03	0,22±0,09^{a***}	0,12±0,04 ^{a*}	0,23±0,02^{a***,b***}
LDL- C (g/l)	0,28±0,09	0,22±0,07	0,21±0,03^{a***}	0,25±0,03^{a***,b***}
TG (g/l)	0,55±0,07	0,57±0,09	0,63±0,02	0,58±0,06 ^{b**}
Glucose (mg/dl)	103 ± 11,31	106,50± 10,01	218,50± 13,43 ^{a***}	119,30±10,10^{b***}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

X.6.2 Effet des différents traitements sur les marqueurs du stress oxydatif au niveau du foie

Comme nous avons vu précédemment, le MTX est un médicament capable de déclencher le stress oxydatif à travers ses polyglutamates qui provoquent une peroxydation lipidique et par la suite une libération excessive du NO, et des ROS ce processus est important pour la cytotoxicité du MTX contre les cellules immunitaires activées ou cellules cancéreuses[668,670].

Physiologiquement, la surproduction des ROS nécessite une élimination immédiate et efficace pour protéger les cellules et les tissus des endommagements induits par ces espèces réactives. Pour cela, le corps humain a développé un système antioxydant sophistiqué très complexe impliquant une variété de composants d'origine endogène et/ou exogène qui interagissent simultanément pour neutraliser les radicaux libres en excès. En plus des antioxydants

alimentaires, le corps repose sur le système antioxydant enzymatique tel que la GPx, la CAT, l'hème peroxydase, la superoxyde dismutase SOD qui dépendent dans leur fonction des cofacteurs tel que le zinc, le sélénium, le cuivre, le fer et le manganèse, et la glutathion GSH qui interagit avec la vitamine C pour piéger directement les radicaux et pour conjuguer les différents xénobiotiques et les rendre moins toxiques [710].

Dans cette étude le statut enzymatique antioxydant des rats suite à l'injection du MTX (20mg/kg) et l'administration orale concomitante de l'EEPF (500 mg/kg) ont été évalué et les résultats ont été présentés dans le Tableau 34. Les résultats ont révélé que l'injection du MTX chez les rats a provoqué une élévation légère de la MDA, ainsi qu'une une réduction très significative des activités tissulaires de la GSH, de la GPx et de la catalase (CAT) par rapport aux rats du groupe contrôle. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Prerna Chauhan et al. lors d'une étude de l'effet protecteur de *Glycyrrhiza glabra* contre l'hépatotoxicité du MTX chez le rat dans laquelle le MTX a provoqué une diminution de la GSH, la GPx, la CAT et une augmentation de l'MDA [646]. L'administration de l'EEPF a inversé cet effet et a augmenté très significativement le taux des différentes enzymes antioxydantes étudiées. Ces résultats sont similaires avec ceux de Kalantar et al. où le crocine du safran a augmenté le taux des enzymes antioxydantes, telles que la SOD, CAT, la GSH, la GPx et a diminué le MDA [705]. Nos résultats rejoignent ceux de la plus part des auteurs qui ont pu démontré un effet protecteur des différents extraits de plantes médicinales contre l'hépatotoxicité induite par le MTX [593,645,646]. Nos résultats sont aussi similaires à ceux de Haibo Huang et al. qui a démontré l'effet hépato et néphroprotecteur du pollen monofloral de *Schisandra chinensis* contre la toxicité induite par la cisplatine qui est un médicament utilisé en chimiothérapie ayant des effets similaires que le MTX. Dans cette étude, l'extrait de pollen a provoqué une élévation dose-dépendante des enzymes CAT, SOD, GPX, et GSH et une diminution de MDA chez les rats traités simultanément par le pollen et la cisplatine [658].

Tableau 34: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur les marqueurs du stress oxydatif dans le foie

Paramètres	Contrôle	EEPF (500mg/kg)	MTX (20mg/kg)	EEPF+MTX
CAT (µmol H2O2/min/mg pr)	20,15±2,19	24,74±4,01	5,81±2,01[a**]	21,31±5,13[b***]
GSH (µg/g tissu)	380,73±17,53	384,09±21,10	196,10±20,25[a***]	315,20±20,96[b***]
GPx (nmol GSH/min/mg pr)	12,2±1,94	13,39±1,72	4,10±1,87[a***]	8,14±1,29[b***]
MDA (nmol/g tissu)	93,75±9,19	77,88±10,23	118,33±12,02[a*]	92,57±10,55[b*]

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, *p <0,05, **p <0,01, ***p <0. 001 ; a comparaison entre le groupe contrôle et tous les groupes. b comparaison entre le groupe MTX avec de l'EEPF+MTX.

Le pollen d'abeilles est riche en flavonoïdes, polyphénols, vitamines et une variété de nutriments, cette composition lui confère la propriété antioxydante protectrice contre les différentes toxicités induites par les ROS. De ce fait, l'effet hépatoprotecteur de notre EEPF pourrait être lié à sa composition riche en polyphénols, en vitamines et en éléments minéraux nécessaire pour le bon fonctionnement des enzymes antioxydantes.

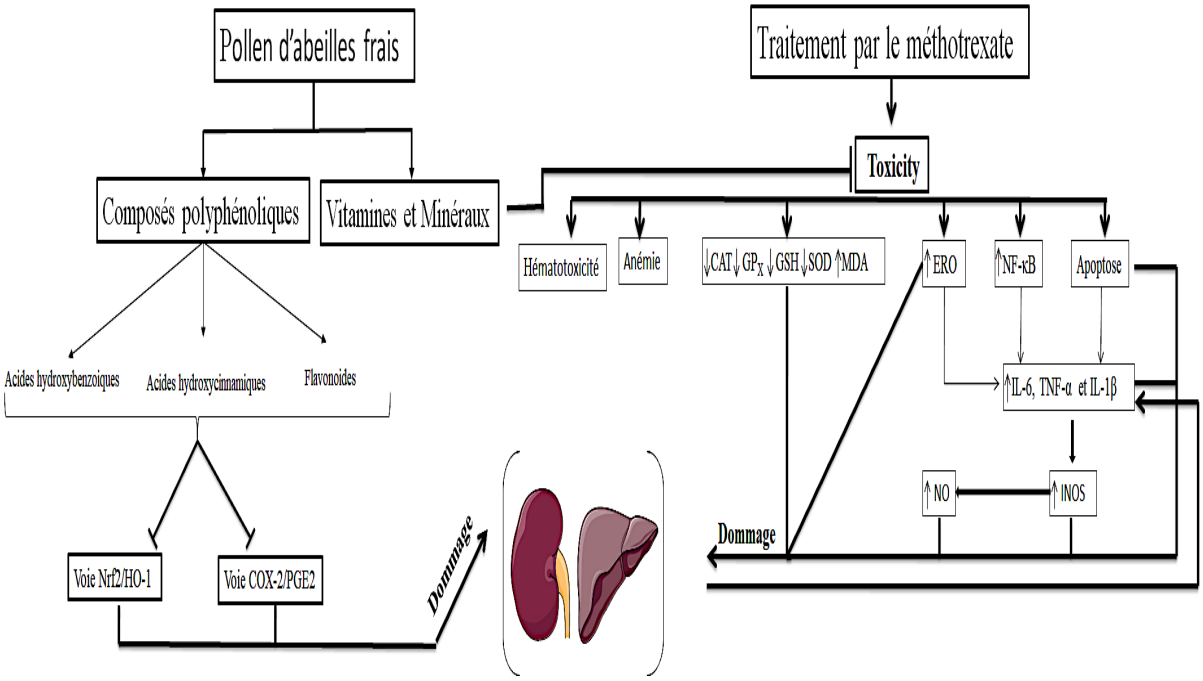


Figure 40: Mécanisme d'action proposé du pollen d'abeilles frais contre les toxicités du MTX

Dans ce contexte, des études expérimentales récentes ont été menées sur des composés phénoliques et caractéristiques du pollen d'abeilles comme l'acide ellagique, l'acide rosmarinique, la rutine, la naringine, l'apigénine, la quercétine, et le résveratrol sur des rats modèles d'hépatotoxicité induite par le MTX. Les résultats ont indiqué que ces molécules possèdent des effets bénéfiques protecteurs contre la détérioration des marqueurs antioxydants endogènes due au MTX (Figure 40 [699,711–716].

X.6.3 Comparaison de l'effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur les paramètres du stress oxydatif dans le rein et le foie

Les résultats relatifs à l'effet des différents traitements sur les enzymes antioxydantes et MDA au niveau du rein et du foie, sont présentés dans le Tableau 35. Les résultats montrent que le MTX a provoqué une diminution significative ($p<0,05$) du GSH (48,5 % dans le foie vs 22,93 % dans le rein), une diminution ($p=0,05$) de la CAT au niveau hépatique par rapport à la CAT au niveau rénale (51,28 % vs 47,52 %) et une augmentation très significative ($p<0,05$) de MDA au niveau du rein 83,33 contre 26,22% au niveau hépatique. Les résultats indiquent que la toxicité du MTX est plus importante dans le tissu hépatique que rénal sauf dans le cas de MDA où le MTX a provoqué une peroxydation lipidique plus élevée dans le rein (26,22 % vs 83,33 %).

Ce résultat a été prouvé par M. Sayed et al. dans leur étude anatomopathologique sur la toxicité du MTX sur le tissu rénal et hépatique, dans laquelle ils ont trouvé que le MTX est plus toxique sur les cellules et les structures hépatiques avec des lésions qui peuvent aller jusqu'au grade IV selon la classification de kremer, tandis que l'effet sur les reins était minimal [717]. L'augmentation de la peroxydation lipidique dans le tissu rénal est hautement liée à la surproduction des ROS par le MTX. Ceci est probablement dû au grand nombre d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne dans la composition lipidique des reins. Il existe des preuves substantielles suggérant que les ROS sont impliqués dans la pathogenèse ischémique, toxique et à médiation immunologique des lésions rénales [718].

Nos résultats ont révélé une correction des effets délétères du MTX après l'administration de l'EEPF qui a augmenté très significativement les taux de la CAT, la GSH, la GPx et en diminuant le taux de l'MDA. Cet effet pourrait être dû à l'activité antioxydante du pollen d'abeilles associée à sa composition en flavonoïdes en caroténoïdes et en vitamine E [200].

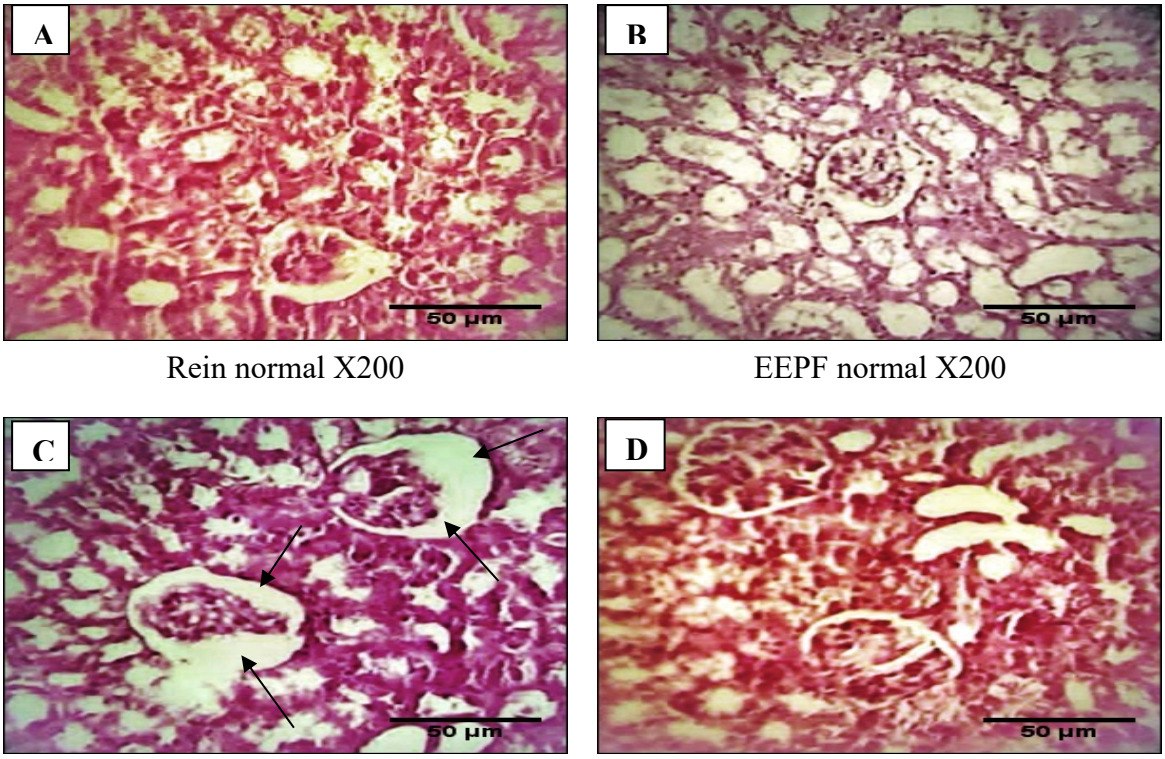
Tableau 35: Comparaison de l'effet du traitement par le MTX et l'EEPF sur les paramètres du stress oxydatif dans le rein et le foie

Paramètres	MTX					MTX+EEPF				
	Foie		Rein		*p*	Foie		Rein		*p*
	Effet	% A	Effet	% A		Effet	% A	Effet	% A	
CAT	Diminution	51,28	Diminution	47,52	0,5	Augmentation	117,1[a]	Augmentation	109,47	0,001
GSH	Diminution	48,49[a]	Diminution	22,93	0,001	Augmentation	60,72[a]	Augmentation	22,70	0,001
GPx	Diminution	66,39	Diminution	55,50	0,1	Augmentation	98,64[a]	Augmentation	141,93	0,001
MDA	Augmentation	26,22[a]	Augmentation	83,33	0,001	Diminution	21,76[a]	Diminution	32,72	0,01

A% :Pourcentage de changements induits par l'administration du MTX par rapport au contrôle ; %B : Pourcentage de changements induits par l'administration concomitante de l'EEPF avec le MTX par rapport au MTX. [a] $p < 0,05$ statistiquement significatif par rapport à l'effet du MTX sur les paramètres oxydatifs du rein, [b] $p < 0,05$ statistiquement significatif par rapport à l'effet du MTX+EEPF sur les paramètres oxydatifs du rein.

X.7 Effet des différents traitements sur l'architecture histologique du rein et du foie

Les analyses histologiques du rein sont illustrées dans la Figure 41, et indiquent une structure microscopique normale du rein du groupe contrôle non traité sans signe de changements histopathologiques (Figure 41.A). Le traitement au MTX a montré des changements dégénératifs importants avec une dégénérescence tubulaire, une dilatation tubulaire, et une congestion glomérulaire (Figure 41.B). Cependant, le traitement par l'EEPF a pu restaurer les changements histopathologiques induits par le MTX et on note un rein normal dans la Figure (41.C). De plus, l'indice de lésion du tissu rénal était significativement plus élevé dans le groupe MTX par rapport au groupe MTX + EEPF (Figure 41.D) .



Rein normal X200 EEPF normal X200

MTX X200 EEPF+MTX X200

Figure 41: Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur l'histopathologie du rein

A : Rein normal du groupe contrôle ; B : Rein normal du groupe l'EEPF seul ; C : Rein du groupe MTX seul (augmentation de l'espace de la capsule de Bowman avec une désorganisation de la structure rénale et une dilatation de la veine rénale) ; D : Rein normal du groupe MTX + EEPF

Les analyses histologiques du foie sont présentées dans la Figure 42 et montrent que chez le groupe contrôle (Figure 42.A), le foie est normal et ne représente aucun signe d'histopathologie avec une veine centrale et zone porte claires. Dans le groupe MTX seul, les changements histopathologiques induits par le MTX étaient révélateurs d'une inflammation tissulaire caractérisée par une dilatation de la veine centro-lobulaire et une bi-nucléation de la cellule hépatique (Figure 42. C), une vacuolisation des hépatocytes, une nécrose hépatique focale, une congestion de la veine centrale et une dilatation des sinusoïdes hépatiques. L'administration quotidienne de l'EEPF chez les rats normaux a conservé la structure anatomique du foie (Figure 42. B) et chez les rats injectés par le MTX, elle a pu, dans une certaine mesure, réduire les altérations pathologiques dans l'architecture des tissus hépatiques, comme le montre la Figure 42.D.

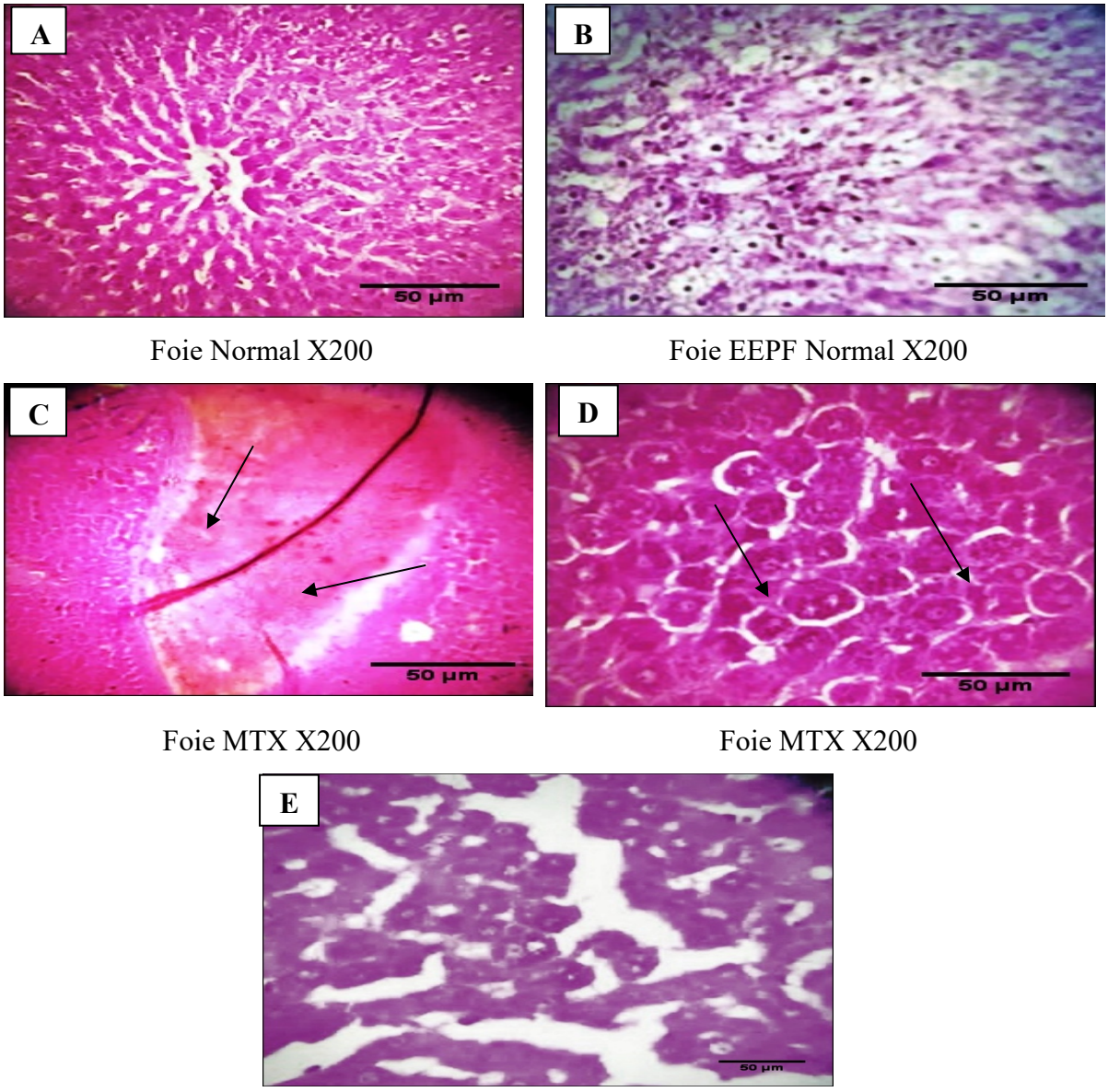


Figure 42 : Effet du MTX (20 mg/kg) et de l'EEPF (500 mg/kg) sur l'histopathologie du foie

A : foie normal du groupe contrôle ; B : Foie normal du groupe EEPF seul ; C : Foie du groupe MTX seul (dilatation des veines centro-lobulaire) ; D : Foie du groupe MTX seul (Bi-nucléation) ; E : Foie normal du groupe MTX + EEPF.

XI. Conclusion

Le MTX est un médicament toxique qui, soit à faible ou à forte dose, favorise la surproduction des radicaux libres, induisant ainsi des lésions cellulaires hépatique, rénale et hématologique. Le pollen d'abeilles est composé d'une multitude de nutriments et de composés phénoliques lui attribuant sa forte capacité antioxydantes. Notre étude a montré clairement que le pollen

d’abeilles frais pourrait être utilisé comme thérapie adjuvante avec le MTX pour minimiser sa néphro, hépato et hématotoxicité. Cependant, des études cliniques sont recommandées pour valider nos résultats et également, d'autres études sont nécessaires pour explorer les mécanismes moléculaires possibles de pollen frais.

Conclusion et perspectives

Le pollen d'abeilles est un produit de la ruche prometteur qui renferme entre ces parois non seulement des nutriments nécessaires à la survie des abeilles, mais aussi, des « phytomédicaments » ou des molécules hautement actives indispensables pour leur bien-être. Depuis l'antiquité, l'Homme a pu se procurer des bienfaits des produits de l'abeille notamment le miel, la propolis, le pollen et le pain d'abeille. L'Homme actuelle n'est jamais satisfait et ne cesse de creuser dans ce petit trésor, pour explorer d'autres merveilles de ces produits qui seront bénéfiques pour sa santé et pour vaincre sa vieillesse.

Le pollen d'abeilles Marocain est peu ou pas étudié en matière d'études scientifiques, notre travail s'est inscrit donc dans le cadre de l'évaluation physicochimique est pharmacologique de ce produit tant négligé par les acteurs agricoles et scientifiques.

Les résultats de l'analyse physicochimique de huit pollens d'abeilles Marocains ont révélé une grande richesse et variation en composés phénoliques, en flavonoïdes et en nutriments tels que les minéraux et les protéines. En se basant sur nos résultats, nous avons pu démontrer l'impact de l'origine géographique et botanique sur la composition de nos pollens et par conséquent détecter leurs biomarqueurs géographiques. La composition minérale a été caractéristique des pollens de la région Nord-Ouest du Maroc (Larache, Hed kourt et Kenitra), le contenu en protéines et en polyphénols totaux étaient caractéristiques de la région Nord-Centrale (Taza, Fès et Séfrou) et le contenu en flavonoïdes a été caractéristique de la région Nord-Ouest du Maroc (Hed Kourt et Kenitra).

En se basant sur les résultats des analyses physico-chimiques de nos échantillons, nous nous permettons de déduire que le pollen Marocain est éligible du caractère « pollen de qualité » parce qu'il a répondu de façon satisfaisante à tous les critères de qualité internationaux. Ces résultats peuvent représenter une base scientifique pour les apiculteurs Marocains pour la production d'un pollen de bonne qualité.

Les études pharmacologiques effectuées sur le modèle animal ont révélé que le pollen étudié est doté de propriétés biologiques très marquées. Les tests de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* au niveau des organes, ont montré que le pollen d'abeilles Marocain a protégé le foie et le rein contre la toxicité délétère du MTX en diminuant les biomarqueurs de la toxicité rénale et hépatiques et en augmentant le taux des enzymes antioxydantes au niveau de ces organes. En outre, le pollen a protégé les rats aussi contre l'anémie induite par la myélosuppression des cellules sanguines tout en gardant les rats dans un bon statut. Les résultats de cette étude ont

montré que le pollen étudié a ciblé les cellules hépatique de façon plus importante que les cellules rénales suggérant ainsi un effet détoxifiant puissant sur le foie.

Le pollen d'abeilles frais a montré aussi un effet néphroprotecteur et hépatoprotecteur contre la toxicité de l'EG, et a protégé le rein en prévenant la formation des calculs rénaux.

Les résultats ont révélé aussi un effet diurétique très prononcé du pollen d'abeilles chez le modèle animal ce qui suggère son utilisation dans les maladies lié à la rétention de l'eau comme les œdèmes les congestions et les atteinte cardiovasculaires.

L'identification des biomolécules de deux échantillons de pollens d'abeilles a révélé la présence d'une gamme variée de flavonoïdes (quercétine, rutine, apigénine, lutéoline…etc.) d'acides phénolique (acide rosmarinique, acide férulique, acide ellagique… etc.) de stilbènes (résveratrol) et de spermidines.

Les composés identifiés dans le pollen d'abeilles étudié sont des substances dotées d'allégations de santé telles que le zinc et le cuivre utilisés comme anti-stress oxydatif, comme boosters du système immunitaire contre les infections bactériennes et virales et qui sont impliqués aussi dans la fonction cognitive. Le calcium qui est utilisé dans le processus de la coagulation, le magnésium qui est nécessaire pour l'équilibre hydro-électrolytique et le fer qui est primordial pour la synthèse de l'hémoglobine et des globules rouges. Le pollen d'abeille et une source de protéines qui sont nécessaires pour la synthèse des anticorps et la formation et la réparation des tissus de l'organisme notamment les muscles.

Les résultats émanant de ce travail serviront comme première brique dans le fondement des standards nationaux pour le pollen d'abeilles local et pour l'orientation des apiculteurs Marocains vers la production de pollen de qualité à usage médical, participant ainsi à une apiculture durable.

Notre travail constitue une étude pilote pour des futures analyses physicochimiques approfondies du pollen d'abeilles Marocain à fin d'identifier toutes les biomolécules qui pourraient être responsables de ses effets pharmacologiques.

Des études cliniques avancées sont aussi nécessaires pour justifier son utilisation médicale dans le traitement des maladies infectieuses, auto-immunes, métaboliques et neurologiques. Nos résultats suggèrent l'utilisation du pollen d'abeilles pour la renutrition des patients en réanimation et qui souffrent du syndrome de dénutrition ou encore chez les sujets âgés dénutris ou malnutris. Le pollen d'abeilles pourrait aussi être utilisé pour l'atténuation des effets délétères du stress oxydatif provoquant un vieillissement cellulaire accéléré.

Références bibliographiques

[1] Campos MGR, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. Journal of Apicultural Research 2008;47:154–61. https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443.

[2] De-Melo AAM, de Almeida-Muradian LB. Chemical Composition of Bee Pollen. In: Alvarez-Suarez JM, editor. Bee Products - Chemical and Biological Properties, Cham: Springer International Publishing; 2017, p. 221–59. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_11.

[3] De-Melo AAM, de Almeida-Muradian LB. Chemical composition of bee pollen. Bee products-chemical and biological properties, Springer; 2017, p. 221–59.

[4] Knox RB. The Pollen Grain. In: Johri BM, editor. Embryology of Angiosperms, Berlin, Heidelberg: Springer; 1984, p. 197–271. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_5.

[5] Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażejak S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. Trends in Food Science & Technology 2018;71:170–80. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021.

[6] Asmae EG, Nawal EM, Bakour M, Lyoussi B. Moroccan Monofloral Bee Pollen: Botanical Origin, Physicochemical Characterization, and Antioxidant Activities. Journal of Food Quality 2021;2021:e8877266. https://doi.org/10.1155/2021/8877266.

[7] Mohamed NA, Ahmed OM, Hozayen WG, Ahmed MA. Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemic state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-Induced diabetic wistar rats. Biomed Pharmacother 2018;97:9–18. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.117.

[8] Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from Cistus sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. BMC Complement Altern Med 2010;10:30. https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-30.

[9] Kaškonienė V, Adaškevičiūtė V, Kaškonas P, Mickienė R, Maruška A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural and fermented bee pollen. Food Bioscience 2020;34:100532. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100532.

[10] Wang B, Diao Q, Zhang Z, Liu Y, Gao Q, Zhou Y, et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from Rosa rugosa. Molecular Medicine Reports 2013;7:1555–8. https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1382.

[11] Llnskens HF, Jorde W. Pollen as food and medicine—A review. Econ Bot 1997;51:78. https://doi.org/10.1007/BF02910407.

[12] Bennett KD, Willis KJ. Pollen. In: Smol JP, Birks HJB, Last WM, Bradley RS, Alverson K, editors. Tracking Environmental Change Using Lake Sediments: Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators, Dordrecht: Springer Netherlands; 2001, p. 5–32. https://doi.org/10.1007/0-306-47668-1_2.

[13] Borg M, Twell D. Pollen: Structure and Development. eLS, American Cancer Society; 2011. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002039.pub2.

[14] Davies JM. Pollen Allergens. In: Nriagu J, editor. Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition), Oxford: Elsevier; 2019, p. 300–22. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-

9.11537-4.

[15] Dumas C. Reproduction et développement des plantes à fleurs. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 2001;324:517–21. https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01320-8.

[16] Pacini E. Pollination. In: Fath B, editor. Encyclopedia of Ecology (Second Edition), Oxford: Elsevier; 2008, p. 562–5. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63768-0.00859-3.

[17] Panawala L. Difference Between Pollen Grain and Ovule 2017.

[18] Georgia Tech Biological Sciences. Plant Reproduction | Organismal Biology n.d. https://organismalbio.biosci.gatech.edu/growth-and-reproduction/plant-reproduction/ (accessed November 15, 2021).

[19] Erdtman G. Palynology. In: Preston RD, editor. Advances in Botanical Research, vol. 1, Academic Press; 1963, p. 149–208. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60181-0.

[20] Katifori E, Alben S, Cerda E, Nelson DR, Dumais J. Foldable structures and the natural design of pollen grains. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:7635–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0911223107.

[21] Edlund AF, Swanson R, Preuss D. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. The Plant Cell 2004;16:S84–97. https://doi.org/10.1105/tpc.015800.

[22] Frenguelli G. Pollen structure and morphology. Adv Dermatol Allergol 2004;20:200–4.

[23] Hesse M. Pollen wall stratification and pollination. In: Dafni A, Hesse M, Pacini E, editors. Pollen and Pollination, Vienna: Springer; 2000, p. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6306-1_1.

[24] Ma X, Wu Y, Zhang G. Formation pattern and regulatory mechanisms of pollen wall in Arabidopsis. Journal of Plant Physiology 2021;260:153388. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153388.

[25] Pacini E. From anther and pollen ripening to pollen presentation. In: Dafni A, Hesse M, Pacini E, editors. Pollen and Pollination, Vienna: Springer; 2000, p. 19–43. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6306-1_2.

[26] Bedinger P. The remarkable biology of pollen. Plant Cell 1992;4:879–87.

[27] Bryś MS, Skowronek P, Strachecka A. Pollen Diet—Properties and Impact on a Bee Colony. Insects 2021;12:798. https://doi.org/10.3390/insects12090798.

[28] Daood A, Ribeiro E, Bush M. Pollen Grain Recognition Using Deep Learning. In: Bebis G, Boyle R, Parvin B, Koracin D, Porikli F, Skaff S, et al., editors. Advances in Visual Computing, Cham: Springer International Publishing; 2016, p. 321–30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50835-1_30.

[29] Dunker S, Motivans E, Rakosy D, Boho D, Mäder P, Hornick T, et al. Pollen analysis using multispectral imaging flow cytometry and deep learning. New Phytologist 2021;229:593–606. https://doi.org/10.1111/nph.16882.

[30] France I, Duller AWG, Duller GAT, Lamb HF. A new approach to automated pollen analysis. Quaternary Science Reviews 2000;19:537–46. https://doi.org/10.1016/S0277-3791(99)00021-9.

[31] Li P, Flenley JR. Pollen texture identification using neural networks. Grana 1999;38:59–64. https://doi.org/10.1080/001731300750044717.

[32] Stillman EC, Flenley JR. The needs and prospects for automation in palynology. Quaternary Science Reviews 1996;15:1–5. https://doi.org/10.1016/0277-3791(95)00076-3.

[33] De Klerk P, Joosten H. The difference between pollen types and plant taxa: a plea for clarity and scientific freedom. E&G Quaternary Science Journal 2007;56:162–71. https://doi.org/10.3285/eg.56.3.02.

[34] Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al. How to Describe and Illustrate Pollen Grains. In: Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al., editors. Illustrated Pollen Terminology, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 85–95. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_5.

[35] Bradley RS. Chapter 12 - Pollen. In: Bradley RS, editor. Paleoclimatology (Third Edition), San Diego: Academic Press; 2015, p. 405–51. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386913-5.00012-0.

[36] Knight CA, Clancy RB, Götzenberger L, Dann L, Beaulieu JM. On the Relationship between Pollen Size and Genome Size. Journal of Botany 2010;2010:e612017. https://doi.org/10.1155/2010/612017.

[37] Erdtman G. Palynology. Advances in Botanical Research, vol. 1, Elsevier; 1963, p. 149–208. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60181-0.

[38] Blackmore S, Crane PR. The evolution of apertures in the spores and pollen grains of embryophytes. Reproductive Biology 1998:159–82.

[39] Božič A, Šiber A. Mechanical design of apertures and the infolding of pollen grain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2020;117:26600–7. https://doi.org/10.1073/pnas.2011084117.

[40] Furness CA. Why does some pollen lack apertures? A review of inaperturate pollen in eudicots. Botanical Journal of the Linnean Society 2007;155:29–48. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00694.x.

[41] Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al. Aperture. In: Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al., editors. Illustrated Pollen Terminology, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 207–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_9.

[42] Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al. Ornamentation. In: Halbritter H, Ulrich S, Grímsson F, Weber M, Zetter R, Hesse M, et al., editors. Illustrated Pollen Terminology, Cham: Springer International Publishing; 2018, p. 295–378. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_10.

[43] Roy R, Schmitt AJ, Thomas JB, Carter CJ. Nectar biology: from molecules to ecosystems. Plant Science 2017;262:148–64.

[44] Wodehouse RP. Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. Pollen Grains Their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine 1935.

[45] Dolezal AG, Toth AL. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. Current Opinion in Insect Science 2018;26:114–9.

[46] Nepi M, Grasso DA, Mancuso S. Nectar in plant–insect mutualistic relationships: from food reward to partner manipulation. Frontiers in Plant Science 2018;9:1063.

[47] Glover BJ. Pollinator Attraction: The Importance of Looking Good and Smelling Nice. Current Biology 2011;21:R307–9. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.061.

[48] Garbuzov M, Ratnieks FLW. Quantifying variation among garden plants in attractiveness to bees and other flower-visiting insects. Functional Ecology 2014;28:364–74. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12178.

[49] Lawrence T. Pollination and Protecting Bees and Other Pollinators 2015. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3099.1203.

[50] Page RE, Scheiner R, Erber J, Amdam GV. 8. The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (Apis mellifera L.). Curr Top Dev Biol 2006;74:253–86. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)74008-X.

[51] Abou-Shaara HF. The foraging behaviour of honey bees, Apis mellifera: a review. Veterinarni Medicina 2014;59.

[52] Vance JT, Williams JB, Elekonich MM, Roberts SP. The effects of age and behavioral development on honey bee (Apis mellifera) flight performance. Journal of Experimental Biology 2009;212:2604–11.

[53] Seeley TD. The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies. Harvard University Press; 2009.

[54] Thorp RW. The collection of pollen by bees. In: Dafni A, Hesse M, Pacini E, editors. Pollen and Pollination, Vienna: Springer; 2000, p. 211–23. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6306-1_11.

[55] Nicolson SW, Da Silva Das Neves S, Human H, Pirk CWW. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (Apis mellifera scutellata). Journal of Insect Physiology 2018;107:302–8. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.12.008.

[56] DOZUOTŲ BDTIJ, KŪRIMAS F. Investigation of bee bread and development of its dosage forms. Proteins 2014;24:20.30-21.70.

[57] Crane E. The Past and Present Importance of Bee Products to Man. In: Mizrahi A, Lensky Y, editors. Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy, Boston, MA: Springer US; 1997, p. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9371-0_1.

[58] Khalifa SAM, Elashal MH, Yosri N, Du M, Musharraf SG, Nahar L, et al. Bee Pollen: Current Status and Therapeutic Potential. Nutrients 2021;13:1876. https://doi.org/10.3390/nu13061876.

[59] Stefan Bogdanov. Pollen: Collection, Harvest, Compostion, Quality. pollen book, vol. 1, 2016.

[60] Aylanc V, Falcão SI, Ertosun S, Vilas-Boas M. From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. Trends in Food Science & Technology 2021;109:464–81. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042.

[61] Pollen, healthy with hony n.d. https://healthywithhoney.com/pollen/ (accessed November 15, 2021).

[62] Carpes ST, de Alencar SM, Cabral ISR, Oldoni TLC, Mourão GB, Haminiuk CWI, et al. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of Apis mellifera L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. CyTA - Journal of Food 2013;11:150–61. https://doi.org/10.1080/19476337.2012.711776.

[63] Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. What is the future of Bee-Pollen? J of ApiProd ApiMed Sci 2010;2:131–44. https://doi.org/10.3896/IBRA.4.02.4.01.

[64] Mayda N, Özkök A, Ecem Bayram N, Gerçek YC, Sorkun K. Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. Food Measure 2020;14:1795–809. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y.

[65] Percie du Sert P. Les pollens apicoles. Phytothérapie 2009;7:75–82. https://doi.org/10.1007/s10298-009-0375-x.

[66] Bogdanov S. Quality and Standards of Pollen and Beeswax. APIACTA 2004:334–41.

[67] Barajas J, Cortes-Rodriguez M, Rodríguez-Sandoval E. Effect of Temperature on the Drying Process of Bee Pollen from Two Zones of Colombia. Journal of Food Process Engineering 2012;35:134–48. https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2010.00577.x.

[68] Anjos O, Paula V, Delgado T, Estevinho L. Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. Zemdirbyste-Agriculture 2019;106:87–94. https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.012.

[69] Roulston TH, Cane JH. Pollen nutritional content and digestibility for animals. Pl Syst Evol 2000;222:187–209. https://doi.org/10.1007/BF00984102.

[70] Nicolson SW, Da Silva Das Neves S, Human H, Pirk CWW. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (Apis mellifera scutellata). Journal of Insect Physiology 2018;107:302–8. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.12.008.

[71] Aylanc V, Tomás A, Russo-Almeida P, Falcão SI, Vilas-Boas M. Assessment of Bioactive Compounds under Simulated Gastrointestinal Digestion of Bee Pollen and Bee Bread: Bioaccessibility and Antioxidant Activity. Antioxidants 2021;10:651. https://doi.org/10.3390/antiox10050651.

[72] Benavides-Guevara RM, Quicazan MC, Ramírez-Toro C. Digestibility and availability of nutrients in bee pollen applying different pretreatments. Ingeniería y Competitividad 2017;19:100–5.

[73] Wu W, Qiao J, Xiao X, Kong L, Dong J, Zhang H. In vitro and In vivo digestion comparison of bee pollen with or without wall-disruption. Journal of the Science of Food and Agriculture 2021;101:2744–55. https://doi.org/10.1002/jsfa.10902.

[74] Zuluaga C, Serrato JC, Quicazan M. Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. Chemical Engineering Transactions 2015;43:79–84. https://doi.org/10.3303/CET1543014.

[75] Zuluaga-Domínguez C, Serrato-Bermudez J, Quicazán M. Influence of drying-related operations on microbiological, structural and physicochemical aspects for processing of bee-pollen. Engineering in Agriculture, Environment and Food 2018;11:57–64.

https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.01.003.

[76] Zuluaga-Domínguez C, Castro-Mercado L, Quicazán MC. Effect of enzymatic hydrolysis on structural characteristics and bioactive composition of bee-pollen. Journal of Food Processing and Preservation 2019;43:e13983. https://doi.org/10.1111/jfpp.13983.

[77] Radev Z. Water Content of Honey Bee Collected Pollen from 50 Plants from Bulgaria. Modern Concepts & Developments in Agronomy 2018;3:314–6. https://doi.org/10.31031/MCDA.2018.03.000563.

[78] Kaèániová M, Fikselová M, Hašèík P, Kòazovická V, Nô J, Fatrcová-Šrámková K. CHANGES IN MICROFLORA OF BEE POLLEN TREATED WITH UV LIGHT AND FREEZING DURING STORAGE n.d.:7.

[79] Mekki I. Microbial contamination of bee pollen and impact of preservation methods 2019.

[80] Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. What is the future of Bee-Pollen? J of ApiProd ApiMed Sci 2010;2:131–44. https://doi.org/10.3896/IBRA.4.02.4.01.

[81] Coronel BB, Grasso D, Pereira SC, Fernández G. Caracterización bromatológica del polen apícola argentino 2004:38.

[82] Martins MCT, Morgano MA, Vicente E, Baggio SR, Rodriguez-Amaya DB. PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION OF BEE POLLEN FROM ELEVEN BRAZILIAN STATES. Journal of Apicultural Science 2011;55:11.

[83] Melo ILP de, Almeida-Muradian LB de. Comparison of methodologies for moisture determination on dried bee pollen samples. Food Science and Technology 2011;31:194–7. https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100029.

[84] Frias BED, Barbosa CD, Lourenço AP. Pollen nutrition in honey bees (Apis mellifera): impact on adult health. Apidologie 2016;47:15–25. https://doi.org/10.1007/s13592-015-0373-y.

[85] Vanderplanck M, Leroy B, Wathelet B, Wattiez R, Michez D. Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. Apidologie 2014;45:192–204. https://doi.org/10.1007/s13592-013-0239-0.

[86] Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015;2015:1–6. https://doi.org/10.1155/2015/297425.

[87] Negrão AF, Orsi RO. Harvesting Season and Botanical Origin Interferes in Production and Nutritional Composition of Bee Pollen. An Acad Bras Ciênc 2018;90:325–32. https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150192.

[88] Hendriksma HP, Pachow CD, Nieh JC. Effects of essential amino acid supplementation to promote honey bee gland and muscle development in cages and colonies. Journal of Insect Physiology 2019;117:103906. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103906.

[89] Pizzorno JE, Murray MT. Textbook of Natural Medicine - E-Book. Elsevier Health Sciences; 2020.

[90] Kaur R, Nagpal AK, Katnoria JK. Amino acids composition of pollen grains of some medicinally important plant species 2015:6.

[91] Silva GR da, Natividade TB da, Camara CA, Silva EMS da, Santos F de AR dos, Silva TMS. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). Food and Nutrition Sciences 2014;2014. https://doi.org/10.4236/fns.2014.511112.

[92] Canale A, Benelli G, Castagna A, Sgherri C, Poli P, Serra A, et al. Microwave-Assisted Drying for the Conservation of Honeybee Pollen. Materials 2016;9:363. https://doi.org/10.3390/ma9050363.

[93] Alvarez-Suarez JM. Bee Products - Chemical and Biological Properties. Springer; 2017.

[94] Gardana C, Del Bo' C, Quicazán MC, Corrrea AR, Simonetti P. Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas. Journal of Food Composition and Analysis 2018;73:29–38. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.009.

[95] Lilek N, Gonzales AP, Boži J, Borovšak AK, Bertoncelj J. Chemical composition and content of free tryptophan in Slovenian bee pollen. J Food Nutr Res 2015;54:11.

[96] Yang K, Wu D, Ye X, Liu D, Chen J, Sun P. Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. J Agric Food Chem 2013;61:708–18. https://doi.org/10.1021/jf304056b.

[97] Taha E-KA, Al-Kahtani S, Taha R. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences 2019;26:232–7.

[98] Isik A, Ozdemir M, Doymaz I, Isik A, Ozdemir M, Doymaz I. Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. Food Science and Technology 2019;39:224–31. https://doi.org/10.1590/fst.02818.

[99] Bertoncelj J, Polak T, Pucihar T, Lilek N, Borovšak AK, Korošec M. Carbohydrate composition of Slovenian bee pollens. International Journal of Food Science & Technology 2018;53:1880–8. https://doi.org/10.1111/ijfs.13773.

[100] Ares AM, Valverde S, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2018;147:110–24. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009.

[101] Bárbara MS, Machado CS, Sodré GDS, Dias LG, Estevinho LM, De Carvalho CAL. Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from Mellipona mandacaia Smith, 1983. Molecules 2015;20:12525–44. https://doi.org/10.3390/molecules200712525.

[102] de Arruda VAS, Vieria dos Santos A, Figueiredo Sampaio D, da Silva Araújo E, de Castro Peixoto AL, Estevinho MLF, et al. Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. Journal of Apicultural Research 2017;56:231–8. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1307715.

[103] Wu W, Wang K, Qiao J, Dong J, Li Z, Zhang H. Improving nutrient release of wall-disrupted bee pollen with a combination of ultrasonication and high shear technique. Journal of the Science of Food and Agriculture 2019;99:564–75. https://doi.org/10.1002/jsfa.9216.

[104] Bertoncelj J, Polak T, Pucihar T, Lilek N, Borovšak AK, Korošec M. Carbohydrate composition of Slovenian bee pollens. International Journal of Food Science & Technology 2018;53:1880–8. https://doi.org/10.1111/ijfs.13773.

[105] Kalaycıoğlu Z, Kaygusuz H, Döker S, Kolaylı S, Erim FB. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. LWT 2017;84:402–8.

[106] Sattler JAG, de Melo ILP, Granato D, Araújo E, da Silva de Freitas A, Barth OM, et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. Food Research International 2015;77:82–91. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013.

[107] Silva GR da, Natividade TB da, Camara CA, Silva EMS da, Santos F de AR dos, Silva TMS. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). Food and Nutrition Sciences 2014;2014. https://doi.org/10.4236/fns.2014.511112.

[108] Szczęsna T. Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. Undefined 2007. /paper/Study-on-the-sugar-composition-of-pollen-Szcz%C4%99sna/8e685e8bac14b679ad4d6e5c59b308b139ff4eb3 (accessed October 19, 2020).

[109] Liolios V, Tananaki C, Dimou M, Kanelis D, Rodopoulou M-A, Thrasyvoulou A. Exploring the sugar profile of unifloral bee pollen using high performance liquid chromatography. J Food Nutr Res 2018:11.

[110] Belina-Aldemita MaD, Opper C, Schreiner M, D'Amico S. Nutritional composition of pot-pollen produced by stingless bees (Tetragonula biroi Friese) from the Philippines. Journal of Food Composition and Analysis 2019;82:103215. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.003.

[111] Omar WAW, Yahaya N, Ghaffar ZA, Fadzilah NH. GC-MS Analysis of Chemical Constituents in Ethanolic Bee Pollen Extracts from Three Species of Malaysian Stingless Bee. Journal of Apicultural Science 2018;62:275–84. https://doi.org/10.2478/jas-2018-0022.

[112] Li YO, Komarek AR. Dietary fibre basics: Health, nutrition, analysis, and applications. Food Quality and Safety 2017;1:47–59. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx007.

[113] Trowell H (ed), Burkitt D (ed), Heaton K (ed). Dietary fibre, fibre-depleted foods and disease 1985.

[114] Makki K, Deehan EC, Walter J, Bäckhed F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. Cell Host & Microbe 2018;23:705–15. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012.

[115] Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. Science 2018;359:1151–6. https://doi.org/10.1126/science.aao5774.

[116] Bishehsari F, Engen PA, Preite NZ, Tuncil YE, Naqib A, Shaikh M, et al. Dietary Fiber Treatment Corrects the Composition of Gut Microbiota, Promotes SCFA Production, and Suppresses Colon Carcinogenesis. Genes 2018;9:102. https://doi.org/10.3390/genes9020102.

[117] Dayib M, Larson J, Slavin J. Dietary fibers reduce obesity-related disorders: mechanisms of

action. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care 2020;23:445–50. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000696.

[118] McRae MP. Dietary Fiber Is Beneficial for the Prevention of Cardiovascular Disease: An Umbrella Review of Meta-analyses. J Chiropr Med 2017;16:289–99. https://doi.org/10.1016/j.jcm.2017.05.005.

[119] Pituch-Zdanowska A, Banaszkiewicz A, Albrecht P. The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. Prz Gastroenterol 2015;10:135–41. https://doi.org/10.5114/pg.2015.52753.

[120] S M, O Z, M S, E O, N A. EFFECTS OF DIETARY FIBER ON HUMAN HEALTH: A REVIEW. Human Sport Medicine 2020;20:106–13. https://doi.org/10.14529/hsm200113.

[121] Fuenmayor B C, Zuluaga D C, Díaz M C, Quicazán de C M, Cosio M, Mannino S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. Revista MVZ Córdoba 2014;19:4003–14.

[122] Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. Biochemical Society Transactions 2017;45:1105–15. https://doi.org/10.1042/BST20160474.

[123] M LG, S G, D DM, G T, E T, M G. Omega 3 fatty acids: biological activity and effects on human health. Panminerva Med 2005;47:245–57.

[124] Thakur M, Nanda V. Composition and functionality of bee pollen: A review. Trends in Food Science & Technology 2020;98:82–106. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001.

[125] Ares AM, Valverde S, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2018;147:110–24. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009.

[126] Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażejak S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. Trends in Food Science & Technology 2018;71:170–80. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021.

[127] Li Q, Liang X, Zhao L, Zhang Z, Xue X, Wang K, et al. UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS-Based Lipidomics Approach To Characterize Lipid Extracts from Bee Pollen and Their in Vitro Anti-Inflammatory Properties. J Agric Food Chem 2017;65:6848–60. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02285.

[128] AL-Kahtani SN. Fatty Acids and B Vitamins Contents in Honey Bee Collected Pollen in Relation to Botanical Origin 2017:9.

[129] Conte G, Benelli G, Serra A, Signorini F, Bientinesi M, Nicolella C, et al. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. Journal of Food Composition and Analysis 2017;55:12–9. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001.

[130] Dong J, Yang Y, Wang X, Zhang H. Fatty acid profiles of 20 species of monofloral bee pollen from China. Journal of Apicultural Research 2015;54:503–11. https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173427.

[131] Conte G, Benelli G, Serra A, Signorini F, Bientinesi M, Nicolella C, et al. Lipid characterization

of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. Journal of Food Composition and Analysis 2017;55:12–9. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001.

[132] Gernand AD, Schulze KJ, Stewart CP, West KP, Christian P. Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. Nature Reviews Endocrinology 2016;12:274–89. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.37.

[133] Kangalgil M, Sahinler A, Kırkbir IB, Ozcelik AO. Associations of maternal characteristics and dietary factors with anemia and iron-deficiency in pregnancy. Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction 2021;50:102137. https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2021.102137.

[134] Khayat S, Fanaei H, Ghanbarzehi A. Minerals in Pregnancy and Lactation: A Review Article. J Clin Diagn Res 2017;11:EQ01–5. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/28485.10626.

[135] Looman M, Schoenaker DAJM, Soedamah-Muthu SS, Mishra GD, Geelen A, Feskens EJM. Pre-pregnancy dietary micronutrient adequacy is associated with lower risk of developing gestational diabetes in Australian women. Nutrition Research 2019;62:32–40. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.11.006.

[136] Moreno-Reyes R. Micronutrient deficiencies and the thyroid in pregnancy. Placenta 2017;51:102. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.019.

[137] Ibrahim MK, Zambruni M, Melby CL, Melby PC. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. Clinical Microbiology Reviews 2017;30:919–71. https://doi.org/10.1128/CMR.00119-16.

[138] Ritchie H, Roser M. Micronutrient Deficiency. Our World in Data 2017.

[139] Tan M, Yang T, Zhu J, Li Q, Lai X, Li Y, et al. Maternal folic acid and micronutrient supplementation is associated with vitamin levels and symptoms in children with autism spectrum disorders. Reproductive Toxicology 2020;91:109–15. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.11.009.

[140] Gorji A, Khaleghi Ghadiri M. Potential roles of micronutrient deficiency and immune system dysfunction in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. Nutrition 2021;82:111047. https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.111047.

[141] Hoffman R. Micronutrient deficiencies in the elderly – could ready meals be part of the solution? Journal of Nutritional Science 2017;6. https://doi.org/10.1017/jns.2016.42.

[142] Song EK, Moser DK, Kang S-M, Lennie TA. Association of Depressive Symptoms and Micronutrient Deficiency With Cardiac Event–Free Survival in Patients With Heart Failure. Journal of Cardiac Failure 2015;21:945–51. https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2015.10.007.

[143] Wang MX, Koh J, Pang J. Association between micronutrient deficiency and acute respiratory infections in healthy adults: a systematic review of observational studies. Nutrition Journal 2019;18:80. https://doi.org/10.1186/s12937-019-0507-6.

[144] Bogdanov S. Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health. Bee Product Science 2016.

[145] Campos MG, Cunha A, Markham KR. Bee-Pollen. In: Mizrahi A, Lensky Y, editors. Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy, Boston, MA: Springer US; 1997, p. 93–100.

https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9371-0_12.

[146] Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review: Bee pollen and medicine. J Sci Food Agric 2016;96:4303–9. https://doi.org/10.1002/jsfa.7729.

[147] Li Q-Q, Wang K, Marcucci MC, Sawaya ACHF, Hu L, Xue X-F, et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. Journal of Functional Foods 2018;49:472–84. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.008.

[148] Adaškevičiūtė V, Kaškonienė V, Kaškonas P, Barčauskaitė K, Maruška A. Comparison of Physicochemical Properties of Bee Pollen with Other Bee Products. Biomolecules 2019;9:819. https://doi.org/10.3390/biom9120819.

[149] Altunatmaz SS, Tarhan D, Aksu F, Barutçu UB, Or ME. Mineral element and heavy metal (cadmium, lead and arsenic) levels of bee pollen in Turkey. Food Sci Technol 2017;37:136–41. https://doi.org/10.1590/1678-457X.36016.

[150] Sattler JAG, De-Melo AAM, Nascimento KS do, Melo ILP de, Mancini-Filho J, Sattler A, et al. Essential minerals and inorganic contaminants (barium, cadmium, lithium, lead and vanadium) in dried bee pollen produced in Rio Grande do Sul State, Brazil. Food Science and Technology 2016;36:505–9. https://doi.org/10.1590/1678-457X.0029.

[151] Mellidou I, Georgiadou EC, Kaloudas D, Kalaitzis P, Fotopoulos V, Kanellis AK. Chapter 17 - Vitamins. In: Yahia EM, editor. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables, Woodhead Publishing; 2019, p. 359–83. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00017-8.

[152] Ravisankar P, Reddy AA, Nagalakshmi B, Sai O, Kumar BV, Anvith PS. The Comprehensive Review on Fat Soluble Vitamins. IOSR Journal Of Pharmacy 2015;5:12–28.

[153] Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, Kunisawa J. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. Frontiers in Nutrition 2019;6:48. https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00048.

[154] Farag S, El-Rayes T. Effect of Bee-pollen Supplementation on Performance, Carcass Traits and Blood Parameters of Broiler Chickens. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 2016;11:168–77. https://doi.org/10.3923/ajava.2016.168.177.

[155] Ecem Bayram N. Vitamin, mineral, polyphenol, amino acid profile of bee pollen from Rhododendron ponticum (source of “mad honey”): nutritional and palynological approach. Food Measure 2021;15:2659–66. https://doi.org/10.1007/s11694-021-00854-5.

[156] Estevinho LM, Dias T, Anjos O. Influence of the Storage Conditions (Frozen vs. Dried) in Health-Related Lipid Indexes and Antioxidants of Bee Pollen. European Journal of Lipid Science and Technology 2019;121:1800393. https://doi.org/10.1002/ejlt.201800393.

[157] Barbieri D, Gabriele M, Summa M, Colosimo R, Leonardi D, Domenici V, et al. Antioxidant, Nutraceutical Properties, and Fluorescence Spectral Profiles of Bee Pollen Samples from Different Botanical Origins. Antioxidants 2020;9:1001. https://doi.org/10.3390/antiox9101001.

[158] de Arruda VAS, Pereira AAS, de Freitas AS, Barth OM, de Almeida-Muradian LB. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. Journal of Food Composition and Analysis 2013;29:100–5. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.11.004.

[159] Melo ILP de, Almeida-Muradian LB de. Stability of antioxidants vitamins in bee pollen samples. Quím Nova 2010;33:514–8. https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300004.

[160] De-Melo AAM, Estevinho MLMF, Sattler JAG, Souza BR, Freitas A da S, Barth OM, et al. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. LWT - Food Science and Technology 2016;65:808–15. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014.

[161] Chawla J, Kvarnberg D. Chapter 59 - Hydrosoluble vitamins. In: Biller J, Ferro JM, editors. Handbook of Clinical Neurology, vol. 120, Elsevier; 2014, p. 891–914. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00059-0.

[162] Dattola A, Silvestri M, Bennardo L, Passante M, Scali E, Patruno C, et al. Role of Vitamins in Skin Health: a Systematic Review. Curr Nutr Rep 2020;9:226–35. https://doi.org/10.1007/s13668-020-00322-4.

[163] Oliveira KCLS, Moriya M, Azedo RAB, Almeida-Muradian LB de, Teixeira EW, Alves MLTMF, et al. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. Quím Nova 2009;32:1099–102. https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500003.

[164] Campos MG, Cunha A, Markham KR. Bee-Pollen: Composition, Properties, and Applications. In: Mizrahi A, Lensky Y, editors. Bee Products, Boston, MA: Springer US; 1997, p. 93–100. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9371-0_12.

[165] Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. Evid Based Complement Alternat Med 2015;2015. https://doi.org/10.1155/2015/297425.

[166] Reddy P, Jialal I. Biochemistry, Fat Soluble Vitamins. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

[167] Milani A, Basirnejad M, Shahbazi S, Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. British Journal of Pharmacology 2017;174:1290–324. https://doi.org/10.1111/bph.13625.

[168] Karkar B, Şahin S, Güneş ME. Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. Journal of Apicultural Research 2020;0:1–10. https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1844462.

[169] Bagchi T. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. The Indian Journal of Medical Research 2014;140:333.

[170] Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, editors. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization; 2006.

[171] Giuffrè M, Campigotto M, Campisciano G, Comar M, Crocè LS. A story of liver and gut microbes: how does the intestinal flora affect liver disease? A review of the literature. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2020;318:G889–906. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00161.2019.

[172] Gordon JI, Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R. The human

microbiome project. Nature 2007;449:804–10.

[173] Seignalet J. L'alimentation, ou, La troisième médecine. Paris: F.-X. de Guibert; 2011.

[174] Sokol H. Microbiote, ce qu'il faut savoir. Colon Rectum 2014;8:136–40. https://doi.org/10.1007/s11725-014-0536-4.

[175] Myers SP, Hawrelak JA. The causes of intestinal dysbiosis: a review. Altern Med Rev 2004;9:180–97.

[176] George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of Food and Drug Analysis 2018;26:927–39. https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002.

[177] Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. Clinical Infectious Diseases 2008;46:S96–100.

[178] Petrof EO. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistryrrent Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents) 2009;8:260–9. https://doi.org/10.2174/187152309789151977.

[179] Sun Z, Sun X, Li J, Li Z, Hu Q, Li L, et al. Using probiotics for type 2 diabetes mellitus intervention: Advances, questions, and potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2020;60:670–83. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1547268.

[180] Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. ISRN Nutrition 2013;2013:1–7. https://doi.org/10.5402/2013/481651.

[181] Soccol CR, Vandenberghe LP de S, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, Lindner JDD, et al. The Potential of Probiotics: A Review. Food Technology and Biotechnology 2010;48:413–34.

[182] GILLIAM M. MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD : THE YEASTS. Apidologie 1979;10:43–53.

[183] Belhadj H, Harzallah D, Bouamra D, Khennouf S, Dahamna S, Ghadbane M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study. Bioscience of Microbiota, Food and Health 2014;33:11–23. https://doi.org/10.12938/bmfh.33.11.

[184] Friedle C, D'Alvise P, Schweikert K, Wallner K, Hasselmann M. Changes of microorganism composition in fresh and stored bee pollen from Southern Germany. Environ Sci Pollut Res 2021;28:47251–61. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13932-4.

[185] Gilliam M. MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD : THE YEASTS. Apidologie 1979;10:43–53. https://doi.org/10.1051/apido:19790106.

[186] McFREDERICK QS, Wcislo WT, Taylor DR, Ishak HD, Dowd SE, Mueller UG. Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? Molecular Ecology 2012;21:1754–68. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x.

[187] Tajabadi N, Mardan M, Saari N, Mustafa S, Bahreini R, Manap MYA. Identification of

Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus fermentum from honey stomach of honeybee. Braz J Microbiol 2013;44:717–22. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300008.

[188] Belhadj H, Harzallah D, Khennouf S, Dahamna S, Bouharati S, Baghiani A. ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA FROM ALGERIAN HONEYBEE COLLECTED POLLEN. Acta Hortic 2010:51–8. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.854.5.

[189] Vásquez A, Olofsson TC. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. Journal of Apicultural Research 2009;48:189–95. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07.

[190] Belhamra Z, Harzallah D, Naili O, Belhadj H. Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from fresh bee pollen 2016;8:357–65.

[191] Endo A, Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. Systematic and Applied Microbiology 2013;36:444–8. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002.

[192] Kaškonienė V, Kaškonas P, Maruška A. Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania. Chemical Papers 2015;69:291–9. https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0033.

[193] Kaškonienė V, Ruočkuvienė G, Kaškonas P, Akuneca I, Maruška A. Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound Compositions and Antioxidant Properties. Food Anal Methods 2015;8:1150–63. https://doi.org/10.1007/s12161-014-9996-2.

[194] Klatt BK, Burmeister C, Westphal C, Tscharntke T, von Fragstein M. Flower Volatiles, Crop Varieties and Bee Responses. PLoS One 2013;8:e72724. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072724.

[195] Karabagias IK, Karabagias VK, Karabournioti S, Badeka AV. Aroma identification of Greek bee pollen using HS-SPME/GC–MS. Eur Food Res Technol 2021;247:1781–9. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03748-4.

[196] Starowicz M, Hanus P, Lamparski G, Sawicki T. Characterizing the Volatile and Sensory Profiles, and Sugar Content of Beeswax, Beebread, Bee Pollen, and Honey. Molecules 2021;26:3410. https://doi.org/10.3390/molecules26113410.

[197] Özcan MM, Aljuhaimi F, Babiker EE, Uslu N, Ceylan DA, Ghafoor K, et al. Determination of antioxidant activity, phenolic compound, mineral contents and fatty acid compositions of bee pollen grains collected from different locations. Journal of Apicultural Science 2019;63:69–79.

[198] Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, et al. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. Molecules 2015;20:21732–49. https://doi.org/10.3390/molecules201219800.

[199] Şahin S, Karkar B. The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. Journal of Food Biochemistry 2019;43:e12888.

[200] Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, et al. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. Molecules 2015;20:21732–49. https://doi.org/10.3390/molecules201219800.

[201] Yang Y, Zhang J, Zhou Q, Wang L, Huang W, Wang R. Effect of ultrasonic and ball-milling treatment on cell wall, nutrients, and antioxidant capacity of rose (Rosa rugosa) bee pollen, and identification of bioactive components. Journal of the Science of Food and Agriculture 2019;99:5350–7.

[202] Bridi R, Atala E, Pizarro PN, Montenegro G. Honeybee pollen load: phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. Journal of Natural Products 2019;82:559–65.

[203] Santa Bárbara MF, Moreira MM, Machado CS, Chambó ED, Pascoal A, de Carvalho CAL, et al. Storage methods, phenolic composition, and bioactive properties of Apis mellifera and Trigona spinipes pollen. Journal of Apicultural Research 2021;60:99–107.

[204] Ares AM, Soto ME, Nozal MJ, Bernal JL, Higes M, Bernal J. Determination of Resveratrol and Piceid Isomers in Bee Pollen by Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. Food Anal Methods 2015;8:1565–75. https://doi.org/10.1007/s12161-014-0048-8.

[205] Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2015;2015:e837042. https://doi.org/10.1155/2015/837042.

[206] El Ghouizi A, El Menyiy N, Falcão SI, Vilas-Boas M, Lyoussi B. Chemical composition, antioxidant activity, and diuretic effect of Moroccan fresh bee pollen in rats. Vet World 2020;13:1251–61. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1251-1261.

[207] Oroian M, Ursachi F, Dranca F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from crude pollen. Antioxidants 2020;9:322.

[208] Rocchetti G, Castiglioni S, Maldarizzi G, Carloni P, Lucini L. UHPLC-ESI-QTOF-MS phenolic profiling and antioxidant capacity of bee pollen from different botanical origin. International Journal of Food Science & Technology 2019;54:335–46.

[209] Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. Journal of the Science of Food and Agriculture 2016;96:4303–9. https://doi.org/10.1002/jsfa.7729.

[210] El-Guendouz S, Lyoussi B, Miguel MG. Insight into the chemical composition and biological properties of Mediterranean royal jelly. Journal of Apicultural Research 2020;59:890–909.

[211] Rebiai A, Lanez T. Chemical composition and antioxidant activity of Apis mellifera bee pollen from northwest Algeria. Journal of Fundamental and Applied Sciences 2012;4:155–63. https://doi.org/10.4314/jfas.v4i2.5.

[212] De-Melo AAM, Estevinho LM, Moreira MM, Delerue-Matos C, Freitas A da S de, Barth OM, et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. Food Bioscience 2018;25:91–110. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001.

[213] Vasconcelos MR dos S, Duarte AWF, Gomes EP, Silva SC da, López AMQ. Physicochemical composition and antioxidant potential of bee pollen from different botanical sources in Alagoas, Brazil. Ciência e Agrotecnologia 2017;41:447–58. https://doi.org/10.1590/1413-70542017414009317.

[214] Duarte AWF, Vasconcelos MR dos S, Oda-Souza M, Oliveira FF de, López AMQ. Honey and

bee pollen produced by Meliponini (Apidae) in Alagoas, Brazil: multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. Food Sci Technol 2018;38:493–503. https://doi.org/10.1590/fst.09317.

[215] Jin T-Y, Saravanakumar K, Wang M-H. In vitro and in vivo antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2018;13:186–9. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.010.

[216] Zhang H, Wang X, Wang K, Li C. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts from Monofloral Bee Pollen. Journal of Apicultural Science 2015;59:119–28. https://doi.org/10.1515/jas-2015-0013.

[217] Mejías E, Montenegro G. The Antioxidant Activity of C hilean Honey and Bee Pollen Produced in the L laima V olcano's Zones. Journal of Food Quality 2012;35:315–22.

[218] AbdElsalam E, Foda HS, Abdel-Aziz MS, Abd FK. Antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian bee pollen. Middle East J Appl Sci 2018;8:1248–55.

[219] Mohdaly AAA, Mahmoud AA, Roby MHH, Smetanska I, Ramadan MF. Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. Journal of Food Biochemistry 2015;39:538–47. https://doi.org/10.1111/jfbc.12160.

[220] Atsalakis E, Chinou I, Makropoulou M, Karabournioti S, Graikou K. Evaluation of Phenolic Compounds in Cistus creticus Bee Pollen from Greece. Antioxidant and Antimicrobial Properties. Natural Product Communications 2017;12:1934578X1701201141. https://doi.org/10.1177/1934578X1701201141.

[221] Zou Y, Hu J, Huang W, Zhu L, Shao M, Dordoe C, et al. The botanical origin and antioxidant, anti-BACE1 and antiproliferative properties of bee pollen from different regions of South Korea. BMC Complementary Medicine and Therapies 2020;20:1–14.

[222] Anjos O, Fernandes R, Cardoso SM, Delgado T, Farinha N, Paula V, et al. Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. LWT 2019;111:869–75. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.105.

[223] Feás X, Vázquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. Molecules 2012;17:8359–77. https://doi.org/10.3390/molecules17078359.

[224] Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. Food Chem Toxicol 2014;63:233–9. https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010.

[225] Ulusoy E, Kolayli S. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen. Journal of Food Biochemistry 2014;38:73–82. https://doi.org/10.1111/jfbc.12027.

[226] Dulger Altiner D, Sandikci Altunatmaz S, Sabuncu M, Aksu F, Sahan Y. In-vitro bioaccessibility of antioxidant properties of bee pollen in Turkey. Food Sci Technol 2020;41:133–41. https://doi.org/10.1590/fst.10220.

[227] Saral Ö, Kilicarslan M, Şahin H, Yildiz O, Dincer B. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences

2019;43:441–7.

[228] Leja M, Mareczek A, Wyżgolik G, Klepacz-Baniak J, Czekońska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chemistry 2007;100:237–40. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047.

[229] Nurdianah HF, Firdaus AA, Azam OE, Adnan WW. Antioxidant activity of bee pollen ethanolic extracts from Malaysian stingless bee measured using DPPH-HPLC assay. International Food Research Journal 2016;23:403.

[230] Kostić AŽ, Milinčić DD, Gašić UM, Nedić N, Stanojević SP, Tešić ŽLj, et al. Polyphenolic profile and antioxidant properties of bee-collected pollen from sunflower (Helianthus annuus L.) plant. LWT 2019;112:108244. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.011.

[231] Fatrcová-Šramková K, Nôžková J, Máriássyová M, Kačániová M. Biologically active antimicrobial and antioxidant substances in the Helianthus annuus L. bee pollen. Journal of Environmental Science and Health, Part B 2016;51:176–81. https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1108811.

[232] Bleha R, Shevtsova T, Kruzik V, Brindza J, Sinica A. Morphology, physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollens. Czech Journal of Food Sciences 2019;37 (2019):1–8. https://doi.org/10.17221/139/2018-CJFS.

[233] Fatrcová-Šramková K, Nôžková J, Kačániová M, Máriássyová M, Rovná K, Stričík M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. Journal of Environmental Science and Health, Part B 2013;48:133–8. https://doi.org/10.1080/03601234.2013.727664.

[234] Futui W, Thongwai N. Antimicrobial and Antioxidant Activities, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Bee Pollen Crude Extracts. Int J Biosci Biochem Bioinform 2020;10:42–8.

[235] Aličić D, Flanjak I, Ačkar Đ, Jašić M, Babić J, Šubarić D. Physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollen collected in Tuzla Canton (B&H). Journal of Central European Agriculture 2020;21:42–50. https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.1.2533.

[236] Mizrahi A, Lensky Y, editors. Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy. Springer US; 1997. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9371-0.

[237] Arivarasu NA, Priyamvada S, Mahmood R. Oral administration of caffeic acid ameliorates the effect of cisplatin on brush border membrane enzymes and antioxidant system in rat intestine. Experimental and Toxicologic Pathology 2013;65:21–5. https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.05.004.

[238] Derochette S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Neven P, Serteyn D. Intra- and extracellular antioxidant capacities of the new water-soluble form of curcumin (NDS27) on stimulated neutrophils and HL-60 cells. Chem Biol Interact 2013;201:49–57. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.12.010.

[239] Carpes ST, Begnini R, Alencar SM de, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. Ciênc Agrotec 2007;31:1818–25. https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000600032.

[240] Alekhya Sita GJ, Gowthami M, Srikanth G, Krishna MM, Rama Sireesha K, Sajjarao M, et al. Protective role of luteolin against bisphenol A-induced renal toxicity through suppressing oxidative

stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/HO-1 pathway. IUBMB Life 2019;71:1041–7.

[241] Hemmati AA, Alboghobeish S, Ahangarpour A. Effects of cinnamic acid on memory deficits and brain oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology 2018;22:257–67.

[242] Ince E. The protective effect of quercetin in the alcohol-induced liver and lymphoid tissue injuries in newborns. Molecular Biology Reports 2020;47:451–9.

[243] Nafees S, Rashid S, Ali N, Hasan SK, Sultana S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. Chemico-Biological Interactions 2015;231:98–107.

[244] Pari L, Karthikesan K. Protective role of caffeic acid against alcohol-induced biochemical changes in rats. Fundamental & Clinical Pharmacology 2007;21:355–61.

[245] Saad MA, Salam RMA, Kenawy SA, Attia AS. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. Pharmacological Reports 2015;67:115–22.

[246] Afsharpour F, Javadi M, Hashemipour S, Koushan Y. Propolis supplementation improves glycemic and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Complementary Therapies in Medicine 2019;43:283–8.

[247] Senyuk B, Boreyko L, Yurnyuk S. CORRECTION OF CLINICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS USING BEE POLLEN IN PATIENTS WITH DIABETES. The Unity of Science: International Scientific Periodical Journal 2016:137–9.

[248] Daudu OM. Bee Pollen Extracts as Potential Antioxidants and Inhibitors of α-Amylase and α-Glucosidase Enzymes In Vitro Assessment. Journal of Apicultural Science 2019;63:315–25.

[249] Adisakwattana S. Cinnamic acid and its derivatives: mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. Nutrients 2017;9:163.

[250] Alkhalidy H, Moore W, Wang Y, Luo J, McMillan RP, Zhen W, et al. The flavonoid Kaempférol ameliorates streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic glucose production. Molecules 2018;23:2338.

[251] El-Sonbaty YA, Suddek GM, Megahed N, Gameil NM. Protocatechuic acid exhibits hepatoprotective, vasculoprotective, antioxidant and insulin-like effects in dexamethasone-induced insulin-resistant rats. Biochimie 2019;167:119–34.

[252] Hossain CM, Ghosh MK, Satapathy BS, Dey NS, Mukherjee B. Apigenin causes biochemical modulation, GLUT4 and Cd38 alterations to improve diabetes and to protect damages of some vital organs in experimental diabetes. Am J Pharmacol Toxicol 2014;9:39–52.

[253] Esrefoglu M, Iraz M, Ates B, Gul M. Melatonin and CAPE are Able to Prevent the Liver from Oxidative Damage in Rats: An Ultrastructural and Biochemical Study. Ultrastructural Pathology 2012;36:171–8. https://doi.org/10.3109/01913123.2011.647262.

[254] Cheng N, Ren N, Gao H, Lei X, Zheng J, Cao W. Antioxidant and hepatoprotective effects of Schisandra chinensis pollen extract on CCl4-induced acute liver damage in mice. Food Chem Toxicol

2013;55:234–40. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.022.

[255] Bispo VS, Dantas LS, CHAVES AB, Pinto IF, SILVA RP, Otsuka FA, et al. Reduction of the DNA damages, hepatoprotective effect and antioxidant potential of the coconut water, ascorbic and caffeic acids in oxidative stress mediated by ethanol. Anais Da Academia Brasileira de Ciências 2017;89:1095–109.

[256] Ebrahimi R, Sepand MR, Seyednejad SA, Omidi A, Akbariani M, Gholami M, et al. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the IκBα/NFκB in rats. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2019;27:721–33.

[257] Malayeri A, Badparva R, Mombeini MA, Khorsandi L, Goudarzi M. Naringenin: a potential natural remedy against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. Drug and Chemical Toxicology 2020:1–8.

[258] Rašković A, Gigov S, Čapo I, Kusturica MP, Milijašević B, Kojić-Damjanov S, et al. Antioxidative and protective actions of apigenin in a paracetamol-induced hepatotoxicity rat model. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 2017;42:849–56.

[259] Yang C, Li L, Ma Z, Zhong Y, Pang W, Xiong M, et al. Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. Experimental and Therapeutic Medicine 2018;15:2228–38.

[260] Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;95:1765–76. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.083.

[261] Hassan SM, Khalaf MM, Sadek SA, Abo-Youssef AM. Protective effects of apigenin and myricetin against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. Pharmaceutical Biology 2017;55:766–74. https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1275704.

[262] Mohammed ET, Hashem KS, Abdelazem AZ, Foda FAMA. Prospective Protective Effect of Ellagic Acid as a SIRT1 Activator in Iron Oxide Nanoparticle-Induced Renal Damage in Rats. Biol Trace Elem Res 2020;198:177–88. https://doi.org/10.1007/s12011-020-02034-w.

[263] Owumi S, Ajijola I, Agbeti O. Hepatorenal protective effects of protocatechuic acid in rats administered with anticancer drug methotrexate. Hum Exp Toxicol 2019;38:1254–65. https://doi.org/10.1177/0960327119871095.

[264] Promsan S, Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chatsudthipong V, Arjinajarn P, et al. Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Can J Physiol Pharmacol 2016;94:808–18. https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0468.

[265] Vijayaprakash S, Langeswaran K, Gowtham Kumar S, Revathy R, Balasubramanian MP. Nephro-protective significance of Kaempférol on mercuric chloride induced toxicity in Wistar albino rats. Biomedicine & Aging Pathology 2013;3:119–24. https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.05.004.

[266] Belhamra Z, Harzallah D, Naili O, Belhadj H. Probiotic potential of lactobacillus strains isolated from fresh bee pollen 2016:10.

[267] Almeida AAP. Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados

do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar 2007.

[268] Kačániová M, Vaťľák A, Vuković N, Petrová J, Brindza J, Nôžková J, et al. Antimicrobial Activity of Bee Collected Pollen against Clostridia. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies 2015;47:362–5.

[269] Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażejak S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. Trends in Food Science & Technology 2018;71:170–80. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021.

[270] Ali NGE-DM, Abuoghaba AA-K, El-Kholy K. Effect of bee pollen at different levels as natural additives on immunity and productive performance in rabbit males. Egyptian Poultry Science Journal 2018;37:213–31.

[271] Dudov IA, Starodub NF. Antioxidant system of rat erythrocytes under conditions of prolonged intake of honeybee flower pollen load. Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal (1978) 1994;66:94–6.

[272] SUN L, LIAO L, WANG D, PENG W. Effects of Rape Bee Pollen and Its Different Extracts on Immune Function in Mice [J]. Food Science 2008;9.

[273] Kędzierski W, Janczarek I, Kowalik S, Jamioł M, Wawak T, Borsuk G, et al. Bee Pollen Supplementation to Aged Horses Influences Several Blood Parameters. Journal of Equine Veterinary Science 2020;90:103024. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103024.

[274] Wang J, Jin G-M, Zheng Y-M, Li S-H, Wang H. [Effect of bee pollen on development of immune organ of animal]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2005;30:1532–6.

[275] Ishikawa Y, Tokura T, Nakano N, Hara M, Niyonsaba F, Ushio H, et al. Inhibitory Effect of Honeybee-Collected Pollen on Mast Cell Degranulation In Vivo and In Vitro. Journal of Medicinal Food 2008;11:14–20. https://doi.org/10.1089/jmf.2006.163.

[276] Medeiros KCP, Figueiredo CAV, Figueredo TB, Freire KRL, Santos FAR, Alcântara-Neves NM, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology 2008;119:41–6.

[277] Jannesar M, Shoushtari MS, Majd A, Pourpak Z. Bee pollen flavonoids as a therapeutic agent in allergic and immunological disorders. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology 2017:171–82.

[278] Medeiros KCP, Figueiredo CAV, Figueredo TB, Freire KRL, Santos FAR, Alcantara-Neves NM, et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. Journal of Ethnopharmacology 2008;119:41–6. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.036.

[279] Ugusman A, Zakaria Z, Chua KH, Megat Mohd Nordin NA, Abdullah Mahdy Z. Role of Rutin on Nitric Oxide Synthesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. The Scientific World Journal 2014;2014:e169370. https://doi.org/10.1155/2014/169370.

[280] Abuoghaba AA-K. IMPACT OF BEE POLLEN SUPPLEMENTATION ON PRODUCTIVE PERFORMANCE, SOME HEMATOLOGICAL PARAMETERS, BLOOD CONSTITUENTS AND SEMEN PHYSICAL CHARACTERISTICS OF SINAI CHICKENS. Egyptian Poultry Science Journal 2018;38:621–35.

[281] Aotari W, Sartini, Hadju V. The Effect Of Date Combination Syrup (Phoenix Dactylifera) And Bee Pollen On Erythrocite Index And Body Weight Of Birth Wistar White Rats (Rattus Norvegiccus). European Journal of Molecular & Clinical Medicine 2021;7:4034–46.

[282] Fahriani, Sartini, Hadju V. The Effect Of Giving Dates Syrup Combination (Phoenix Dactylifera) And Bee Pollen On Hemoglobin Levels In Pregnant Wistar Rats (Rattus Novergicus). European Journal of Molecular & Clinical Medicine 2020;7:182–9.

[283] Ahn-Jarvis JH, Parihar A, Doseff AI. Dietary Flavonoids for Immunoregulation and Cancer: Food Design for Targeting Disease. Antioxidants (Basel) 2019;8. https://doi.org/10.3390/antiox8070202.

[284] Chen F, Ran L, Mi J, Yan Y, Lu L, Jin B, et al. Isolation, Characterization and Antitumor Effect on DU145 Cells of a Main Polysaccharide in Pollen of Chinese Wolfberry. Molecules 2018;23:2430. https://doi.org/10.3390/molecules23102430.

[285] Sobral F, Calhelha RC, Barros L, Dueñas M, Tomás A, Santos-Buelga C, et al. Flavonoid Composition and Antitumor Activity of Bee Bread Collected in Northeast Portugal. Molecules 2017;22:248. https://doi.org/10.3390/molecules22020248.

[286] Nainu F, Masyita A, Bahar MA, Raihan M, Prova SR, Mitra S, et al. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. Antibiotics 2021;10:822. https://doi.org/10.3390/antibiotics10070822.

[287] Saisavoey T, Sangtanoo P, Srimongkol P, Reamtong O, Karnchanatat A. Hydrolysates from bee pollen could induced apoptosis in human bronchogenic carcinoma cells (ChaGo-K-1). Journal of Food Science and Technology 2021;58:752–63.

[288] Afaf D. Abd El-Magied, Mahmoud E. A. Abou-El-Roos, Abd El-Haleem H. El-Kasapy, M. A. Yuonis. The biochemical effects of bee pollen suspension on prostatitis induced experimentally in rats. International Journal of Advanced Research 2015;3:10.

[289] Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, Aslam Gondal T, Saeed F, Imran A, et al. Kaempférol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. Molecules 2019;24:2277. https://doi.org/10.3390/molecules24122277.

[290] Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. Nutrients 2020;12:457. https://doi.org/10.3390/nu12020457.

[291] Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. European Journal of Medicinal Chemistry 2017;142:213–28. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034.

[292] Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydrate Polymers 2012;90:1395–410. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026.

[293] Kelainy EG, Ibrahim Laila IM, Ibrahim SR. The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats. Environ Sci Pollut Res 2019;26:31675–84. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06099-6.

[294] Karimi MY, Fatemi I, Kalantari H, Mombeini MA, Mehrzadi S, Goudarzi M. Ellagic Acid Prevents Oxidative Stress, Inflammation, and Histopathological Alterations in Acrylamide-Induced

Hepatotoxicity in Wistar Rats. Journal of Dietary Supplements 2020;17:651–62. https://doi.org/10.1080/19390211.2019.1634175.

[295] Feng H, Cao J, Zhang G, Wang Y. Kaempférol Attenuates Cardiac Hypertrophy via Regulation of ASK1/MAPK Signaling Pathway and Oxidative Stress. Planta Med 2017;83:837–45. https://doi.org/10.1055/s-0043-103415.

[296] Aloud AA, Veeramani C, Govindasamy C, Alsaif MA, El Newehy AS, Al-Numair KS. Galangin, a dietary flavonoid, improves antioxidant status and reduces hyperglycemia-mediated oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Redox Report 2017;22:290–300. https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1273437.

[297] El Khashab IH, Abdelsalam RM, Elbrairy AI, Attia AS. Chrysin attenuates global cerebral ischemic reperfusion injury via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019;112:108619. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108619.

[298] Al Olayan EM, Aloufi AS, AlAmri OD, El-Habit OH, Abdel Moneim AE. Protocatechuic acid mitigates cadmium-induced neurotoxicity in rats: Role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. Science of The Total Environment 2020;723:137969. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137969.

[299] Pan X, Shao Y, Wang F, Cai Z, Liu S, Xi J, et al. Protective effect of apigenin magnesium complex on H2O2-induced oxidative stress and inflammatory responses in rat hepatic stellate cells. Pharmaceutical Biology 2020;58:553–60. https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1772840.

[300] Han X-Y, Du W-L, Huang Q-C, Xu Z-R, Wang Y-Z. Changes in Small Intestinal Morphology and Digestive Enzyme Activity with Oral Administration of Copper-Loaded Chitosan Nanoparticles in Rats. Biol Trace Elem Res 2012;145:355–60. https://doi.org/10.1007/s12011-011-9191-x.

[301] Chen L, Gnanaraj C, Arulselvan P, El-Seedi H, Teng H. A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. Trends in Food Science & Technology 2019;85:149–62. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.026.

[302] Ramar M, Manikandan B, Raman T, Priyadarsini A, Palanisamy S, Velayudam M, et al. Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice. European Journal of Pharmacology 2012;690:226–35. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.019.

[303] Fatima N, Hafizur RM, Hameed A, Ahmed S, Nisar M, Kabir N. Ellagic acid in Emblica officinalis exerts anti-diabetic activity through the action on β-cells of pancreas. European Journal of Nutrition 2017;56:591–601.

[304] Shi G-J, Li Y, Cao Q-H, Wu H-X, Tang X-Y, Gao X-H, et al. In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019;109:1085–99. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.130.

[305] Sharma D, Kumar Tekade R, Kalia K. Kaempférol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: An in vitro and in vivo study in diabetic nephropathy mice model. Phytomedicine 2020;76:153235. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153235.

[306] Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. Nutr Metab (Lond) 2015;12:60. https://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7.

[307] Zhang M, He L, Liu J, Zhou L. Luteolin Attenuates Diabetic Nephropathy through Suppressing Inflammatory Response and Oxidative Stress by Inhibiting STAT3 Pathway. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2021;129:729–39. https://doi.org/10.1055/a-0998-7985.

[308] Lu Q, Hao M, Wu W, Zhang N, Isaac AT, Yin J, et al. Antidiabetic cataract effects of GbE, rutin and quercetin are mediated by the inhibition of oxidative stress and polyol pathway. Acta Biochimica Polonica 2018;65:35–41.

[309] Ren B, Qin W, Wu F, Wang S, Pan C, Wang L, et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. European Journal of Pharmacology 2016;773:13–23. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.01.002.

[310] Pei B, Sun J. Pinocembrin alleviates cognition deficits by inhibiting inflammation in diabetic mice. Journal of Neuroimmunology 2018;314:42–9. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.11.006.

[311] M. Aref A, A. Tohamy A, E. Abdel Moneim A, H. Sayed R. Cinnamic acid Attenuates Cisplatin-Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity 2016.

[312] Zhao L, Chen F, Zhang Y, Yue L, Guo H, Ye G, et al. Involvement of P450s and nuclear receptors in the hepatoprotective effect of quercetin on liver injury by bacterial lipopolysaccharide. Immunopharmacology and Immunotoxicology 2020;42:211–20. https://doi.org/10.1080/08923973.2020.1742154.

[313] Wang M, Sun J, Jiang Z, Xie W, Zhang X. Hepatoprotective Effect of Kaempférol Against Alcoholic Liver Injury in Mice. Am J Chin Med 2015;43:241–54. https://doi.org/10.1142/S0192415X15500160.

[314] Aladaileh SH, Abukhalil MH, Saghir SAM, Hanieh H, Alfwuaires MA, Almaiman AA, et al. Galangin Activates Nrf2 Signaling and Attenuates Oxidative Damage, Inflammation, and Apoptosis in a Rat Model of Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity. Biomolecules 2019;9:346. https://doi.org/10.3390/biom9080346.

[315] Pingili RB, Pawar AK, Challa SR, Kodali T, Koppula S, Toleti V. A comprehensive review on hepatoprotective and nephroprotective activities of chrysin against various drugs and toxic agents. Chemico-Biological Interactions 2019;308:51–60. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.010.

[316] Yan Y, Jun C, Lu Y, Jiangmei S. Combination of metformin and luteolin synergistically protects carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: Mechanism involves antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathway. BioFactors 2019;45:598–606. https://doi.org/10.1002/biof.1521.

[317] Reddy MK, Reddy AG, Kumar BK, Madhuri D, Boobalan G, Reddy MA. Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats. Vet World 2017;10:74–80. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.74-80.

[318] Wang Y, Jiang Y, Fan X, Tan H, Zeng H, Wang Y, et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1–p53 signaling pathways. Toxicology Letters 2015;236:82–9. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.05.001.

[319] Olayinka ET, Ola OS, Ore A, Adeyemo OA. Ameliorative Effect of Caffeic Acid on Capecitabine-Induced Hepatic and Renal Dysfunction: Involvement of the Antioxidant Defence System.

Medicines 2017;4:78. https://doi.org/10.3390/medicines4040078.

[320] Chowdhury S, Ghosh S, Das AK, Sil PC. Ferulic Acid Protects Hyperglycemia-Induced Kidney Damage by Regulating Oxidative Insult, Inflammation and Autophagy. Frontiers in Pharmacology 2019;10:27. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00027.

[321] El-Sayed E-SM, Abd El-Raouf OM, Fawzy HM, Manie MF. Comparative Study of the Possible Protective Effects of Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2013;27:508–14. https://doi.org/10.1002/jbt.21515.

[322] Kocahan S, Dogan Z, ErdemLi ME, Taskin E. Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stressinduced Toxicity Associated With Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue. Iranian Journal of Kidney Diseases 2017;11.

[323] Farkhondeh T, Samarghandian S, Roshanravan B. Impact of chrysin on the molecular mechanisms underlying diabetic complications. Journal of Cellular Physiology 2019;234:17144–58. https://doi.org/10.1002/jcp.28488.

[324] Chen L, Tian G, Tang W, Luo W, Liu P, Ma Z. Protective effect of luteolin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice via the regulation of RIP140/NF-κB pathway and insulin signalling pathway. Journal of Functional Foods 2016;22:93–100. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.023.

[325] Wang B, Liu D, Zhu Q, Li M, Chen H, Guo Y, et al. Rutin ameliorates kidney interstitial fibrosis in rats with obstructive nephropathy. International Immunopharmacology 2016;35:77–84. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.029.

[326] Said SE, Eldin HOH, Meghawry EKAE. RENOPROTECTIVE EFFECTS OF NARINGENIN AND OLIVE OIL AGAINST CYCLOSPORINE- INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS 2016;10:27–37.

[327] Xue H-Y, Yuan L, Cao Y-J, Fan Y-P, Chen X-L, Huang X-Z. Resveratrol ameliorates renal injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting renal micro-inflammation. Bioscience Reports 2016;36. https://doi.org/10.1042/BSR20160035.

[328] Shin K-M, Kim I-T, Park Y-M, Ha J, Choi J-W, Park H-J, et al. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-α production. Biochemical Pharmacology 2004;68:2327–36. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.002.

[329] Bumrungpert A, Lilitchan S, Tuntipopipat S, Tirawanchai N, Komindr S. Ferulic Acid Supplementation Improves Lipid Profiles, Oxidative Stress, and Inflammatory Status in Hyperlipidemic Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. Nutrients 2018;10:713. https://doi.org/10.3390/nu10060713.

[330] Abozaid OAR, Moawed FSM, Ahmed ESA, Ibrahim ZA. Cinnamic acid nanoparticles modulate redox signal and inflammatory response in gamma irradiated rats suffering from acute pancreatitis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2020;1866:165904. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165904.

[331] Mansouri MT, Hemmati AA, Naghizadeh B, Mard SA, Rezaie A, Ghorbanzadeh B. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw

edema in rats. Indian J Pharmacol 2015;47:292–8. https://doi.org/10.4103/0253-7613.157127.

[332] Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-κB pathway. European Journal of Immunology 2005;35:584–92. https://doi.org/10.1002/eji.200425778.

[333] Park MJ, Lee EK, Heo H-S, Kim M-S, Sung B, Kim MK, et al. The Anti-Inflammatory Effect of Kaempférol in Aged Kidney Tissues: The Involvement of Nuclear Factor-κB via Nuclear Factor-Inducing Kinase/IκB Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. Journal of Medicinal Food 2009;12:351–8. https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0006.

[334] Choi M-J, Lee E-J, Park J-S, Kim S-N, Park E-M, Kim H-S. Anti-inflammatory mechanism of galangin in lipopolysaccharide-stimulated microglia: Critical role of PPAR-γ signaling pathway. Biochemical Pharmacology 2017;144:120–31. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.021.

[335] Li Z, Chu S, He W, Zhang Z, Liu J, Cui L, et al. A20 as a novel target for the anti-neuroinflammatory effect of chrysin via inhibition of NF-κB signaling pathway. Brain, Behavior, and Immunity 2019;79:228–35. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.005.

[336] Lin C-Y, Huang C-S, Huang C-Y, Yin M-C. Anticoagulatory, Antiinflammatory, and Antioxidative Effects of Protocatechuic Acid in Diabetic Mice. J Agric Food Chem 2009;57:6661–7. https://doi.org/10.1021/jf9015202.

[337] Darabi P, Khazali H, Mehrabani Natanzi M. Therapeutic potentials of the natural plant flavonoid apigenin in polycystic ovary syndrome in rat model: via modulation of pro-inflammatory cytokines and antioxidant activity. Gynecological Endocrinology 2020;36:582–7. https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1706084.

[338] Xiong J, Wang K, Yuan C, Xing R, Ni J, Hu G, et al. Luteolin protects mice from severe acute pancreatitis by exerting HO-1-mediated anti-inflammatory and antioxidant effects. International Journal of Molecular Medicine 2017;39:113–25. https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2809.

[339] Alhoshani AR, Hafez MM, Husain S, Al-sheikh AM, Alotaibi MR, Al Rejaie SS, et al. Protective effect of rutin supplementation against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats. BMC Nephrology 2017;18:194. https://doi.org/10.1186/s12882-017-0601-y.

[340] Fan R, Pan T, Zhu A-L, Zhang M-H. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of naringenin via attenuation of NF-κB and activation of the heme oxygenase (HO)-1/related factor 2 pathway. Pharmacol Rep 2017;69:1021–9. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.03.020.

[341] Gu X, Zhang Q, Du Q, Shen H, Zhu Z. Pinocembrin attenuates allergic airway inflammation via inhibition of NF-κB pathway in mice. International Immunopharmacology 2017;53:90–5. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.005.

[342] Chen X, Lu J, An M, Ma Z, Zong H, Yang J. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. Molecular Medicine Reports 2014;9:2592–8. https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2070.

[343] Fazayeli-Rad AR, Afzali N, Farhangfar H, Asghari MR. Effect of bee pollen on growth performance, intestinal morphometry and immune status of broiler chicks. European Poultry Science

2015;79.

[344] Kolesarova A, Bakova Z, Capcarova M, Galik B, Juracek M, Simko M, et al. Consumption of bee pollen affects rat ovarian functions. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2013;97:1059–65. https://doi.org/10.1111/jpn.12013.

[345] Münstedt K, Voss B, Kullmer U, Schneider U, Hübner J. Bee pollen and honey for the alleviation of hot flushes and other menopausal symptoms in breast cancer patients. Molecular and Clinical Oncology 2015;3:869–74. https://doi.org/10.3892/mco.2015.559.

[346] Yan S, Wang K, Wang X, Ou A, Wang F, Wu L, et al. Effect of fermented bee pollen on metabolic syndrome in high-fat diet-induced mice. Food Science and Human Wellness 2021;10:345–55. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2021.02.026.

[347] Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Composition and biological properties of bee pollen particular regard to the possibility of use in cosmetics. Postępy Fitoterapii 2015.

[348] Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee Products in Dermatology and Skin Care. Molecules 2020;25:556. https://doi.org/10.3390/molecules25030556.

[349] Xi X, Li J, Guo S, Li Y, Xu F, Zheng M, et al. The Potential of Using Bee Pollen in Cosmetics: a Review. Journal of Oleo Science 2018;67:1071–82. https://doi.org/10.5650/jos.ess18048.

[350] Moujanni A, Essamadi AK, Terrab A. Beekeeping in Morocco: focus on honey production. International Journal of Innovation and Applied Studies 2017;20:52–78.

[351] Filière apicole | Ministère de l'agriculture n.d. https://www.agriculture.gov.ma/fr/filiere/apicole (accessed October 11, 2021).

[352] Bakour M, Laaroussi H, El Menyiy N, Elaraj T, El Ghouizi A, Lyoussi B. The Beekeeping State and Inventory of Mellifero-Medicinal Plants in the North-Central of Morocco. ScientificWorldJournal 2021;2021:9039726. https://doi.org/10.1155/2021/9039726.

[353] Almeida J de F, Reis AS dos, Heldt LFS, Pereira D, Bianchin M, Moura C de, et al. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. LWT - Food Science and Technology 2017;76:299–305. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017.

[354] Maurizio A, Louveaux J. Les méthodes et la terminologie en mélissopalynologie. Review of Palaeobotany and Palynology 1967;3:291–5. https://doi.org/10.1016/0034-6667(67)90062-0.

[355] Bakour M, Campos M da G, Imtara H, Lyoussi B. Antioxidant content and identification of phenolic/flavonoid compounds in the pollen of fourteen plants using HPLC-DAD. Journal of Apicultural Research 2020;59:35–41. https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1675336.

[356] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265–75.

[357] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Am J Enol Vitic 1965;16:144–58.

[358] Miguel M da G, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, Antunes MD. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. Food and Chemical

Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 2010;48:3418–23. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.014.

[359] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 1999;269:337–41. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019.

[360] Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry 2004;84:329–39. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4.

[361] Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. Food Chem Toxicol 2008;46:3482–5. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025.

[362] Miguel M da G, Doughmi O, Aazza S, Antunes D, Lyoussi B. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. Food Sci Biotechnol 2014;23:313–22. https://doi.org/10.1007/s10068-014-0044-1.

[363] Atalay Z, Celep F, Bilgili B, Doğan M. Pollen morphology of the genus Lamium L.(Lamiaceae) and its systematic implications. Flora 2016;219:68–84.

[364] Cubas P, Pardo C. Pollen wall stratification trends in Ulex (Genisteae, papilionoideae: Leguminosae) in the Iberian Peninsula. Grana 1992;31:177–85.

[365] D'Ávila VA, Aguiar-Menezes EL, Gonçalves-Esteves V, Mendonça CBF, Pereira RN, Santos TM. Morphological characterization of pollens from three Apiaceae species and their ingestion by twelve-spotted lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). Brazilian Journal of Biology 2016;76:796–803.

[366] El Naggar SM. Taxonomic significance of pollen morphology in some taxa of Resedaceae. Feddes Repertorium: Zeitschrift Für Botanische Taxonomie Und Geobotanik 2002;113:518–27.

[367] Hamzaoğlu E, Aksoy A, Martin E, PINAR M, Çölgeçen H. A new record for the flora of Turkey: Scorzonera ketzkhovelii Grossh.(Asteraceae). Turkish Journal of Botany 2010;34:57–61.

[368] Koçyiğit M, DAŞTAN MKT, Koçyiğit M, Keskin M, Daştan T. Pollen morphology of some Trifolium species which are favorite plants of honey bees in Istanbul. Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University 2013;43:85–94.

[369] Polyakova TA, Gataulina GN. Morphology and variability of pollen of the genus Spiraea L.(Rosaceae) in Siberia and the Far East. Contemporary Problems of Ecology 2008;1:420–4.

[370] Carpes ST, Cabral IS, Luz CFP, Capeletti JP, Alencar SM, Masson ML. Palynological and physicochemical characterization of Apis mellifera L. bee pollen in the Southern region of Brazil. J Food Agric Environ 2009;7:667–73.

[371] ROXANA SPULBER, MUHSIN DOĞAROĞLU, NARCISA BĂBEANU, OVIDIU POPA. Physicochemical characteristics of fresh bee pollen from different botanical origins. Romanian Biotechnol Lett 2018;23:13357–65.

[372] Bobis O, Marghitas LA, Dezmirean D, Morar O, Bonta V, Chirila F. Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies 2010;67.

https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:67:1-2:5254.

[373] Human H, Nicolson SW. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of Aloe greatheadii var. davyana (Asphodelaceae). Phytochemistry 2006;67:1486–92. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.023.

[374] Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of Food Composition and Analysis 2005;18:105–11. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008.

[375] Brasil. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geleia Real, de Geleia Real Liofilizada, de Polen Apicola, de Propolis, de Extrato de Propolis) from the World Wide 2001.

[376] Carpes ST, Mourão GB, Alencar SM de, Masson ML. Chemical composition and free radical scavenging activity of Apis mellifera bee pollen from Southern Brazil. Brazilian Journal of Food Technology 2009;12:220–9.

[377] Villanueva MTO, Marquina AD, Serrano RB, Abellán GB. The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. International Journal of Food Sciences and Nutrition 2002;53:217–24. https://doi.org/10.1080/09637480220132832.

[378] Ganesan K, Xu B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. Nutrients 2017;9. https://doi.org/10.3390/nu9050455.

[379] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid Med Cell Longev 2009;2:270–8.

[380] Cook NC, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. The Journal of Nutritional Biochemistry 1996;7:66–76. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9.

[381] Sun L, Guo Y, Zhang Y, Zhuang Y. Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities of Phenolic Extracts from Rape Bee Pollen and Inhibitory Melanogenesis by cAMP/MITF/TYR Pathway in B16 Mouse Melanoma Cells. Front Pharmacol 2017;8:104. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00104.

[382] Mărghitaş LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobiş O, Popescu O, Bogdanov S, et al. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry 2009;115:878–83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.014.

[383] Serra Bonvehí J, Soliva Torrentó M, Centelles Lorente E. Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain. J Agric Food Chem 2001;49:1848–53. https://doi.org/10.1021/jf0012300.

[384] Tavdidishvili D, Khutsidze T, Pkhakadze M, Vanidze M, Kalandia A. Flavonoids in Georgian Bee Bread and Bee Pollen. J Chem Chem Eng 2014;8:676–81.

[385] Kostić AŽ, Barać MB, Stanojević SP, Milojković-Opsenica DM, Tešić ŽL, Šikoparija B, et al. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. LWT - Food Science and Technology 2015;62:301–9. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.031.

[386] Stanciu OG, Marghitas LA, Dezmirean D. Macro-and oligo-mineral elements from honeybee-

collected pollen and beebread harvested from Transylvania (Romania). Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Anim Sci Biotechnol 2009;66:1–2.

[387] Laaroussi H, Bouddine T, Bakour M, Ousaaid D, Lyoussi B. Physicochemical properties, mineral content, antioxidant activities, and microbiological quality of Bupleurum spinosum Gouan honey from the middle atlas in Morocco. Journal of Food Quality 2020;2020.

[388] Singh S, Shankar R, Singh GP. Prevalence and Associated Risk Factors of Hypertension: A Cross-Sectional Study in Urban Varanasi. Int J Hypertens 2017;2017. https://doi.org/10.1155/2017/5491838.

[389] Mishra S. Diuretics in primary hypertension – Reloaded. Indian Heart J 2016;68:720–3. https://doi.org/10.1016/j.ihj.2016.08.013.

[390] Alexander W. Hypertension: Is It Time to Replace Drugs With Nutrition and Nutraceuticals? P T 2014;39:291–5.

[391] Ozemek C, Laddu DR, Arena R, Lavie CJ. The role of diet for prevention and management of hypertension. Curr Opin Cardiol 2018;33:388–93. https://doi.org/10.1097/HCO.0000000000000532.

[392] WHO. More than 700 million people with untreated hypertension. Geneva, Switzerland: 2021.

[393] Zhou B, Carrillo-Larco RM, Danaei G, Riley LM, Paciorek CJ, Stevens GA, et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. The Lancet 2021;398:957–80. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01330-1.

[394] Delacroix S, Chokka RG. Hypertension: Pathophysiology and Treatment. J Neurol Neurophysiol 2014;05. https://doi.org/10.4172/2155-9562.1000250.

[395] Kakar P, Lip GYH. Towards understanding the aetiology and pathophysiology of human hypertension: where are we now? J Hum Hypertens 2006;20:833–6. https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002082.

[396] Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. BMJ 2001;322:912–6. https://doi.org/10.1136/bmj.322.7291.912.

[397] Mark AL. The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. J Hypertens Suppl 1996;14:S159-165.

[398] Mayet J, Hughes A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. Heart 2003;89:1104–9. https://doi.org/10.1136/heart.89.9.1104.

[399] Cain AE, Khalil RA. Pathophysiology of essential hypertension: role of the pump, the vessel, and the kidney. Semin Nephrol 2002;22:3–16.

[400] Sander M, Chavoshan B, Victor RG. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. Hypertension 1999;33:937–42. https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.4.937.

[401] Appel LJ, Brands MW, Daniels SR, Karanja N, Elmer PJ, Sacks FM, et al. Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. Hypertension 2006;47:296–308. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000202568.01167.B6.

[402] Börjesson M, Onerup A, Lundqvist S, Dahlöf B. Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: narrative review of 27 RCTs. Br J Sports Med 2016;50:356–61. https://doi.org/10.1136/bjsports-2015-095786.

[403] Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, Smith West D, et al. Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. Ann Intern Med 2001;134:1–11. https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-1-200101020-00007.

[404] Whelton PK, He J, Cutler JA, Brancati FL, Appel LJ, Follmann D, et al. Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. JAMA 1997;277:1624–32. https://doi.org/10.1001/jama.1997.03540440058033.

[405] Xin X, He J, Frontini MG, Ogden LG, Motsamai OI, Whelton PK. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. Hypertension 2001;38:1112–7. https://doi.org/10.1161/hy1101.093424.

[406] Parving HH, Rossing P. Therapeutic benefits of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 2001;24:177–80. https://doi.org/10.2337/diacare.24.1.177-a.

[407] Tocci G, Battistoni A, Passerini J, Musumeci MB, Francia P, Ferrucci A, et al. Calcium Channel Blockers and Hypertension. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2015;20:121–30. https://doi.org/10.1177/1074248414555403.

[408] Mullens W, Damman K, Harjola V-P, Mebazaa A, Brunner-La Rocca H-P, Martens P, et al. The use of diuretics in heart failure with congestion — a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. European Journal of Heart Failure 2019;21:137–55. https://doi.org/10.1002/ejhf.1369.

[409] Roush GC, Kaur R, Ernst ME. Diuretics: A Review and Update. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2014;19:5–13. https://doi.org/10.1177/1074248413497257.

[410] Aslam S, Gupta V. Carbonic Anhydrase Inhibitors. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

[411] Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2010;20:3467–74. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.009.

[412] all_diuretics [TUSOM | Pharmwiki] n.d. https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/all_diuretics (accessed November 16, 2021).

[413] Carbonic Anhydrase Inhibitors. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.

[414] Alexander RT, Dimke H. Effect of diuretics on renal tubular transport of calcium and magnesium. American Journal of Physiology-Renal Physiology 2017;312:F998–1015. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00032.2017.

[415] Casey G. Understanding diuretics. Kai Tiaki: Nursing New Zealand 2019;25:20–4.

[416] Guignard J-P. Diuretics. Paediatric Clinical Pharmacology, CRC Press; 2010.

[417] Oh SW, Han SY. Loop Diuretics in Clinical Practice. Electrolyte Blood Press 2015;13:17–21. https://doi.org/10.5049/EBP.2015.13.1.17.

[418] Wargo KA, Banta WM. A comprehensive review of the loop diuretics: should furosemide be first line? Ann Pharmacother 2009;43:1836–47. https://doi.org/10.1345/aph.1M177.

[419] Akbari P, Khorasani-Zadeh A. Thiazide Diuretics. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

[420] Zillich AJ, Garg J, Basu S, Bakris GL, Carter BL. Thiazide diuretics, potassium, and the development of diabetes: a quantitative review. Hypertension 2006;48:219–24.

[421] Cuculi F, Suter A, Erne P. Spironolactone-induced gynecomastia. CMAJ 2007;176:620. https://doi.org/10.1503/cmaj.061286.

[422] Horisberger J-D, Giebisch G. Potassium-Sparing Diuretics. KBR 1987;10:198–220. https://doi.org/10.1159/000173130.

[423] Svensson M, Gustafsson F, Galatius S, Hildebrandt PR, Atar D. Hyperkalaemia and impaired renal function in patients taking spironolactone for congestive heart failure: retrospective study. BMJ 2003;327:1141–2. https://doi.org/10.1136/bmj.327.7424.1141.

[424] Burrell LM, Risvanis J, Johnston CI, Naitoh M, Balding LC. Vasopressin receptor antagonism — a therapeutic option in heart failure and hypertension. Experimental Physiology 2000;85:259s–65s. https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.tb00031.x.

[425] Greenberg A, Verbalis JG. Vasopressin receptor antagonists. Kidney International 2006;69:2124–30. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000432.

[426] Rosner MH. Lixivaptan: a vasopressin receptor antagonist for the treatment of hyponatremia. Kidney International 2012;82:1154–6. https://doi.org/10.1038/ki.2012.317.

[427] Kumar BS, Swamy BV, Archana S, Anitha M. A review on natural diuretics. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2010;1:615–34.

[429] Wright CI, Van-Buren L, Kroner CI, Koning MMG. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. J Ethnopharmacol 2007;114:1–31. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.023.

[430] Carpes ST, Prado A, Moreno IAM, Mourão GB, Alencar SM de, Masson ML. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. Química Nova 2008;31:1660–4. https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700011.

[431] Tohamy AA, Abdella EM, Ahmed RR, Ahmed YK. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. Cytotechnology 2014;66:283–97. https://doi.org/10.1007/s10616-013-9568-0.

[432] Kalaycıoğlu Z, Kaygusuz H, Döker S, Kolaylı S, Erim FB. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. LWT 2017;84:402–8. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.003.

[433] Falcão SI, Vale N, Gomes P, Domingues MRM, Freire C, Cardoso SM, et al. Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides:

Phenolic Profiling of Portuguese Propolis. Phytochemical Analysis 2013;24:309–18. https://doi.org/10.1002/pca.2412.

[434] Parasuraman S, Zhen KM, Raveendran R. Retro-orbital Blood Sample Collection in Rats-a Video Article. PTB Reports 2015;1:37–40. https://doi.org/10.5530/PTB.1.2.1.

[435] Bakour M, Al-Waili NS, El Menyiy N, Imtara H, Figuira AC, Al-Waili T, et al. Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. Journal of Food Science and Technology 2017;54:4205–12. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2889-9.

[436] Ares AM, Valverde S, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2018;147:110–24. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.009.

[437] Sun L, Guo Y, Zhang Y, Zhuang Y. Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities of Phenolic Extracts from Rape Bee Pollen and Inhibitory Melanogenesis by cAMP/MITF/TYR Pathway in B16 Mouse Melanoma Cells. Front Pharmacol 2017;8:104. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00104.

[438] Mihajlovic L, Radosavljevic J, Burazer L, Smiljanic K, Cirkovic Velickovic T. Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (Ambrosia artemisiifolia L.) pollen and sub-pollen particles. Phytochemistry 2015;109:125–32. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.022.

[439] Dueñas M, Mingo-Chornet H, Pérez-Alonso JJ, Di Paola-Naranjo R, González-Paramás AM, Santos-Buelga C. Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. European Food Research and Technology 2008;227:1069–76. https://doi.org/10.1007/s00217-008-0821-2.

[440] Marczak Ł, Stobiecki M, Jasiński M, Oleszek W, Kachlicki P. Fragmentation pathways of acylated flavonoid diglucuronides from leaves of *Medicago truncatula*. Phytochemical Analysis 2010;21:224–33. https://doi.org/10.1002/pca.1189.

[441] Catarino MD, Alves-Silva JM, Falcão S, Vilas-Boas M, Jordão M, Cardoso SM. Chromatography as a tool for identification of bioactive compounds in honeybee products of botanical origin. Chemistry, Biology and Potential Applications of Honeybee Plant-Derived Products 2016:89–149. https://doi.org/10.2174/9781681082370116010007.

[442] Bassard J-E, Ullmann P, Bernier F, Werck-Reichhart D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. Phytochemistry 2010;71:1808–24. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.003.

[443] Elejalde-Palmett C, de Bernonville TD, Glevarec G, Pichon O, Papon N, Courdavault V, et al. Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in Malus domestica highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. J Exp Bot 2015;66:7271–85. https://doi.org/10.1093/jxb/erv423.

[444] Zamble A, Sahpaz S, Hennebelle T, Carato P, Bailleul F. N1,N5,N10-Tris(4-hydroxycinnamoyl)spermidines from Microdesmis keayana Roots. Chemistry & Biodiversity 2006;3:982–9. https://doi.org/10.1002/cbdv.200690107.

[445] Bokern M, Witte L, Wray V, Nimtz M, Meurer-Grimes B. Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from Quercus dentata pollen. Phytochemistry n.d.;39:1371–5.

[446] Lin S, Mullin CA. Lipid, polyamide, and flavonol phagostimulants for adult western corn rootworm from sunflower (Helianthus annuus L.) pollen. J Agric Food Chem 1999;47:1223–9. https://doi.org/10.1021/jf980858w.

[447] Sobolev VS, Sy AA, Gloer JB. Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (Arachis hypoEAGa) flowers. J Agric Food Chem 2008;56:2960–9. https://doi.org/10.1021/jf703652a.

[448] Kite GC, Larsson S, Veitch NC, Porter EA, Ding N, Simmonds MSJ. Acyl spermidines in inflorescence extracts of elder (Sambucus nigra L., Adoxaceae) and elderflower drinks. J Agric Food Chem 2013;61:3501–8. https://doi.org/10.1021/jf304602q.

[449] Youhnovski N, Werner C, Hesse M. N,N′,N″-Triferuloylspermidine, a New UV Absorbing Polyamine Derivative from Pollen of Hippeastrum × hortorum. Zeitschrift Für Naturforschung C 2014;56:526–30. https://doi.org/10.1515/znc-2001-7-809.

[450] Loew D. Diuréticos: química, farmacología y terapéutica incluida fitoterapia. Salvat Ed.; 1991.

[451] El-Guendouz S, Al-Waili N, Aazza S, Elamine Y, Zizi S, Al-Waili T, et al. Antioxidant and diuretic activity of co-administration of Capparis spinosa honey and propolis in comparison to furosemide. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2017;10:974–80. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.009.

[452] Menyiy NE, Al-Waili N, El-Haskoury R, Bakour M, Zizi S, Al-Waili T, et al. Potential effect of Silybum marianum L. and Cistus ladaniferus L. extracts on urine volume, creatinine clearance and renal function. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2018;11:393. https://doi.org/10.4103/1995-7645.234768.

[453] Dussol B. Équilibre potassique, hypokaliémie et hyperkaliémie. Néphrologie & Thérapeutique 2010;6:180–99. https://doi.org/10.1016/j.nephro.2010.03.004.

[454] Jackson EK. Drugs Affecting Renal Excretory Function. In: Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, editors. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13th ed., New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.

[455] Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B. Diuretic activity of the aqueous extracts of Carum carvi and Tanacetum vulgare in normal rats. J Ethnopharmacol 2007;110:458–63. https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.005.

[456] Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from Spergularia purpurea Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. J Ethnopharmacol 2001;76:159–63. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00209-4.

[457] Wu J, Muir AD. Isoflavone content and its potential contribution to the antihypertensive activity in soybean Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. J Agric Food Chem 2008;56:9899–904. https://doi.org/10.1021/jf801181a.

[458] Sinha N, Kumar Dabla P. Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension–A Current Review. Current Hypertension Reviews 2015;11:132–42.

[459] Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, et al. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2004;370:290–8.

[460] Si H, Wyeth RP, Liu D. The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation. European Journal of Nutrition 2014;53:269–75.

[461] Jones HS, Gordon A, Magwenzi SG, Naseem K, Atkin SL, Courts FL. The dietary flavonol quercetin ameliorates angiotensin II-induced redox signaling imbalance in a human umbilical vein endothelial cell model of endothelial dysfunction via ablation of p47phox expression. Molecular Nutrition & Food Research 2016;60:787–97.

[462] Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. Advances in Nutrition 2012;3:39–46.

[463] Oyagbemi AA, Omobowale TO, Ola-Davies OE, Asenuga ER, Ajibade TO, Adejumobi OA, et al. Quercetin attenuates hypertension induced by sodium fluoride via reduction in oxidative stress and modulation of HSP 70/ERK/PPARγ signaling pathways. Biofactors 2018;44:465–79.

[464] Satoh H, Nishida S. Cardio-electopharmacology and vasodilating mechanisms of quercetin. Med Chem 2014;4:523–30.

[465] Fusi F, Spiga O, Trezza A, Sgaragli G, Saponara S. The surge of flavonoids as novel, fine regulators of cardiovascular Cav channels. European Journal of Pharmacology 2017;796:158–74. https://doi.org/DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.12.033.

[466] Svenningsen P, Andersen K, Thuesen AD, Shin H-S, Vanhoutte PM, Skøtt O, et al. T-type Ca 2+ channels facilitate NO-formation, vasodilatation and NO-mediated modulation of blood pressure. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 2014;466:2205–14.

[467] Chung MJ. Urolithiasis and nephrolithiasis. Journal of the American Academy of Physician Assistants 2017;30:49–50. https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000522145.52305.aa.

[468] Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, Gambaro G, Canales BK, Doizi S, et al. Kidney stones. Nat Rev Dis Primers 2016;2:16008. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.8.

[469] Tefekli A, Cezayirli F. The History of Urinary Stones: In Parallel with Civilization. The Scientific World Journal 2013;2013:1–5. https://doi.org/10.1155/2013/423964.

[470] Ahmed S, Hasan MM, Khan H, Mahmood ZA, Patel S. The mechanistic insight of polyphenols in calcium oxalate urolithiasis mitigation. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018;106:1292–9. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.080.

[471] Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis: an update. Clin Cases Miner Bone Metab 2008;5:101–6.

[472] El Lekhlifi Z, Laziri F, Boumzaoued H, Maouloua M, Louktibi M. Étude épidémiologique rétrospective sur la lithiase urinaire chez l'enfant dans la région de Meknès au Maroc (2000–2012). Journal de Pédiatrie et de Puériculture 2014;27:23–8. https://doi.org/10.1016/j.jpp.2013.10.003.

[473] Makasana A, Ranpariya V, Desai D, Mendpara J, Parekh V. Evaluation for the anti-urolithiatic activity of Launaea procumbens against ethylene glycol-induced renal calculi in rats. Toxicology Reports 2014;1:46–52. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.03.006.

[474] Selvam R, Kalaiselvi P, Govindaraj A, Bala Murugan V, Sathish Kumar AS. Effect of A. lanata leaf extract and Vediuppu chunnam on the urinary risk factors of calcium oxalate urolithiasis during

experimental hyperoxaluria. Pharmacol Res 2001;43:89–93. https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0745.

[475] Gupta K, Gill GS, Mahajan R. Possible role of elevated serum testosterone in pathogenesis of renal stone formation. Int J Appl Basic Med Res 2016;6:241–4. https://doi.org/10.4103/2229-516X.192593.

[476] Yucel Y, Oguz E, Kocarslan S, Tatli F, Gozeneli O, Seker A, et al. The effects of lycopene on methotrexate-induced liver injury in rats. Bratisl Lek Listy 2017;118:212–6. https://doi.org/10.4149/bll_2017_042.

[477] Zhao Z, Mai Z, Ou L, Duan X, Zeng G. Serum Estradiol and Testosterone Levels in Kidney Stones Disease with and without Calcium Oxalate Components in Naturally Postmenopausal Women. PLOS ONE 2013;8:e75513. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075513.

[478] Howles SA, Thakker RV. Genetics of kidney stone disease. Nat Rev Urol 2020;17:407–21. https://doi.org/10.1038/s41585-020-0332-x.

[479] Abeywickarama B, Ralapanawa U, Chandrajith R. Geoenvironmental factors related to high incidence of human urinary calculi (kidney stones) in Central Highlands of Sri Lanka. Environ Geochem Health 2016;38:1203–14. https://doi.org/10.1007/s10653-015-9785-x.

[480] Schwille PO, Herrmann U. Environmental factors in the pathophysiology of recurrent idiopathic calcium urolithiasis (RCU), with emphasis on nutrition. Urological Research 1992;20:72–83.

[481] Bet VV, Deshpande KH, Suryakar AN, Ankush RD, Katkam RV. Depleted nitrite and enhanced oxidative stress in urolithiasis. Indian J Clin Biochem 2006;21:177. https://doi.org/10.1007/BF02912938.

[482] Ozbek E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. International Journal of Nephrology 2012;2012:e465897. https://doi.org/10.1155/2012/465897.

[483] Yu S-L, Gan X-G, Huang J-M, Cao Y, Wang Y-Q, Pan S-H, et al. Oxalate Impairs Aminophospholipid Translocase Activity in Renal Epithelial Cells Via Oxidative Stress: Implications for Calcium Oxalate Urolithiasis. Journal of Urology 2011;186:1114–20. https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.04.106.

[484] Patel M, Yarlagadda V, Adedoyin O, Saini V, Assimos DG, Holmes RP, et al. Oxalate induces mitochondrial dysfunction and disrupts redox homeostasis in a human monocyte derived cell line. Redox Biology 2018;15:207–15. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.003.

[485] Sharma M, S.Naura A, Singla SK. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Nephrolithiasis. Archives of Biochemistry and Molecular Biology 2019;10:71–84.

[486] Singh D, Kaur R, Chander V, Chopra K. Antioxidants in the Prevention of Renal Disease. Journal of Medicinal Food 2006;9:443–50. https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.443.

[487] King Jr JS, Boyce WH. Immunological studies on serum and urinary proteins in urolith matrix in man. Annals of the New York Academy of Sciences 1963;104:579–91.

[488] Boyce WH. Organic matrix of human urinary concretions. The American Journal of Medicine 1968;45:673–83.

[489] Grover PK, Ryall RL, Marshall VR. Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? Clinica Chimica Acta 1990;190:223–38.

[490] Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR. Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. Kidney International 2002;62:2062–72.

[491] Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Presence of lipids in urinary stones: results of preliminary studies. Calcified Tissue International 1988;42:91–6.

[492] Boyce WH, Garvey FK. The amount and nature of the organic matrix in urinary calculi: a review. The Journal of Urology 1956;76:213–27.

[493] Nishio S, Abe Y, Wakatsuki A, Iwata H, Ochi K, Takeuchi M, et al. Matrix glycosaminoglycan in urinary stones. The Journal of Urology 1985;134:503–5.

[494] Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. Biomed Res Int 2013;2013:292953. https://doi.org/10.1155/2013/292953.

[495] Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. J Clin Invest 2005;115:2598–608. https://doi.org/10.1172/JCI26662.

[496] Daudon M, Dessombz A, Frochot V, Letavernier E, Haymann J-P, Jungers P, et al. Comprehensive morpho-constitutional analysis of urinary stones improves etiological diagnosis and therapeutic strategy of nephrolithiasis. Comptes Rendus Chimie 2016;19:1470–91. https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.008.

[497] Gwaltney-Brant SM. Chapter 68 - Oxalate-Containing Plants. In: Peterson ME, Talcott PA, editors. Small Animal Toxicology (Third Edition), Saint Louis: W.B. Saunders; 2013, p. 725–30. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0717-1.00068-5.

[498] Callens A, Bartges JW. Chapter 51 - Update on Feline Urolithiasis. In: Little SE, editor. August's Consultations in Feline Internal Medicine, Volume 7, St. Louis: W.B. Saunders; 2016, p. 499–508. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-22652-3.00051-7.

[499] Hsu Y-C, Pan L-C, Shiau L-D. A Photomicroscopic Study on the Growth Rates of Calcium Oxalate Crystals in a New Synthetic Urine without Inhibitors and with Various Inhibitors. Crystals 2021;11:223. https://doi.org/10.3390/cryst11030223.

[500] Hornberger B, Bollner MR. Kidney stones. Physician Assistant Clinics 2018;3:37–54.

[501] Ratkalkar VN, Kleinman JG. Mechanisms of Stone Formation. Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism 2011;9:187–97. https://doi.org/10.1007/s12018-011-9104-8.

[502] Bhasin B, Ürekli HM, Atta MG. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. World J Nephrol 2015;4:235–44. https://doi.org/10.5527/wjn.v4.i2.235.

[503] Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. Urol Res 1995;23:71–9.

[504] Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. Antiurolithic activity of Origanum vulgare is mediated through multiple pathways. BMC Complement Altern Med 2011;11:96. https://doi.org/10.1186/1472-

6882-11-96.

[505] Siddiqui WA, Shahzad M, Shabbir A, Ahmad A. Evaluation of anti-urolithiatic and diuretic activities of watermelon (Citrullus lanatus) using in vivo and in vitro experiments. Biomed Pharmacother 2018;97:1212–21. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.162.

[506] Tang X, Lieske JC. Acute and chronic kidney injury in nephrolithiasis: Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2014;23:385–90. https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000447017.28852.52.

[507] Mulay SR, Evan A, Anders H-J. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. Nephrology Dialysis Transplantation 2014;29:507–14. https://doi.org/10.1093/ndt/gft248.

[508] Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, Migliorini A. darisipudi MN, Vilaysane A, Muruve d, Shi Y, Munro F, Liapis H and Anders HJ: calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1β secretion. J Clin Invest 2013;123:236–46.

[509] Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR, Green JL, Rumack BH, Giffin SL. 2009 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 27th Annual Report. Clin Toxicol (Phila) 2010;48:979–1178. https://doi.org/10.3109/15563650.2010.543906.

[510] Porter WH. Ethylene glycol poisoning: quintessential clinical toxicology; analytical conundrum. Clin Chim Acta 2012;413:365–77. https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.034.

[511] Erickson SB, Vrtiska TJ, Lieske JC. Effect of Cystone® on urinary composition and stone formation over a one year period. Phytomedicine 2011;18:863–7. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.01.018.

[512] El Menyiy N, Al Waili N, Bakour M, Al-Waili H, Lyoussi B. Protective Effect of Propolis in Proteinuria, Crystaluria, Nephrotoxicity and Hepatotoxicity Induced by Ethylene Glycol Ingestion. Archives of Medical Research 2016;47:526–34. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.12.010.

[513] Karamakar D, Patki PS. Evaluation of efficacy and safety of a herbal formulation Cystone in the management of urolithiasis: Meta-analysis of 50 clinical studies. Int J Altern Med 2010;8:1–18.

[514] Vargas Solis R, Perez Gutierrez RM. Diuretic and urolithiatic activities of the aqueous extract of the fruit of Randia echinocarpa on rats. J Ethnopharmacol 2002;83:145–7.

[515] Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. Pediatr Nephrol 2010;25:831–41. https://doi.org/10.1007/s00467-009-1116-y.

[516] Shah JG, Patel BG, Patel SB, Patel RK. Antiurolithiatic and antioxidant activity of Hordeum vulgare seeds on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. Indian J Pharmacol 2012;44:672–7. https://doi.org/10.4103/0253-7613.103237.

[517] Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Myers CB, Seely JC, Heindel JJ, et al. Developmental toxicity evaluation of ethylene glycol by gavage in New Zealand white rabbits. Fundam Appl Toxicol 1993;20:402–12.

[518] Ashok P, Koti BC, Vishwanathswamy AHM. Antiurolithiatic and antioxidant activity of Mimusops elengi on ethylene glycol-induced urolithiasis in rats. Indian J Pharmacol 2010;42:380–3.

https://doi.org/10.4103/0253-7613.71925.

[519] Balaji KC, Menon M. Mechanism of stone formation. Urol Clin North Am 1997;24:1–11.

[520] Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. Pediatric Nephrology 2010;25:831–41. https://doi.org/10.1007/s00467-009-1116-y.

[521] Makasana A, Ranpariya V, Desai D, Mendpara J, Parekh V. Evaluation for the anti-urolithiatic activity of Launaea procumbens against ethylene glycol-induced renal calculi in rats. Toxicology Reports 2014;1:46–52. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.03.006.

[522] Patel N, Badole S, Gupta P, Jain B, Thakurdesai P, Bhardwaj S, et al. Effect of ethanolic extract of leaves of Cocculus hirsutus (L.) diels on experimentally induced urothiliasis in rats. Journal of Natural Remedies 2008;8:8.

[523] Bergsland KJ, Worcester EM, Coe FL. Role of proximal tubule in the hypocalciuric response to thiazide of patients with idiopathic hypercalciuria. Am J Physiol Renal Physiol 2013;305:F592-599. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00116.2013.

[524] Rk P, Sb P, Jg S, Patel RK. Anti-Urolithiatic Activity of Ethanolic Extract of Seeds of Benincasa Hispida (Thumb). Pharmacologyonline 2011;3:586–91.

[525] Kohri K, Garside J, Blacklock NJ. The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. Br J Urol 1988;61:107–15.

[526] Rushton HG, Spector M. Effects of magnesium deficiency on intratubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluric rats. J Urol 1982;127:598–604.

[527] Robijn S, Hoppe B, Vervaet BA, D'Haese PC, Verhulst A. Hyperoxaluria: a gut–kidney axis? Kidney International 2011;80:1146–58. https://doi.org/10.1038/ki.2011.287.

[528] Gupta P, Patel N, Bhatt L, Zambare GN, Bodhankar SL, Jain BB, et al. Anti-urolithiatic Effect of Petroleum Ether Extract Stem Bark of *Crataeva adansonii* . in Rats. Pharmaceutical Biology 2006;44:160–5. https://doi.org/10.1080/13880200600686400.

[529] Guzel A, Yunusoglu S, Calapoglu M, Candan IA, Onaran I, Oncu M, et al. Protective Effects of Quercetin on Oxidative Stress-Induced Tubular Epithelial Damage in the Experimental Rat Hyperoxaluria Model. Medicina 2021;57:566.

[530] Den Hartogh DJ, Tsiani E. Health Benefits of Resveratrol in Kidney Disease: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. Nutrients 2019;11:1624. https://doi.org/10.3390/nu11071624.

[531] Yuan P, Sun X, Liu X, Hutterer G, Pummer K, Hager B, et al. Kaempférol alleviates calcium oxalate crystal-induced renal injury and crystal deposition via regulation of the AR/NOX2 signaling pathway. Phytomedicine 2021;86:153555.

[532] Chan ESL, Cronstein BN. Methotrexate—how does it really work? Nat Rev Rheumatol 2010;6:175–8. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.5.

[533] Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. Mol Biol Rep 2020;47:4699–708. https://doi.org/10.1007/s11033-020-05481-9.

[534] Dalkilic E, Coskun BN, Yağız B, Tufan AN, Ermurat S, Pehlivan Y. Methotrexate intoxication: Beyond the adverse events. Int J Rheum Dis 2018;21:1557–62. https://doi.org/10.1111/1756-185X.13339.

[535] Conway R, Carey JJ. Risk of liver disease in methotrexate treated patients. World J Hepatol 2017;9:1092–100. https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i26.1092.

[536] Feinsilber D, Leoni RJ, Siripala D, Leuck J, Mears KA. Evaluation, Identification, and Management of Acute Methotrexate Toxicity in High-dose Methotrexate Administration in Hematologic Malignancies. Cureus n.d.;10. https://doi.org/10.7759/cureus.2040.

[537] Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. Toxicol Ind Health 2006;22:241–7. https://doi.org/10.1191/0748233706th265oa.

[538] Rajnics P, Kellner VS, Kellner A, Karadi E, Kollar B, Egyed M. The Hematologic Toxicity of Methotrexate in Patients with Autoimmune Disorders. Journal of Neoplasm 2017;2. https://doi.org/10.21767/2576-3903.100010.

[539] Sotoudehmanesh R, Anvari B, Akhlaghi M, Shahraeeni S, Kolahdoozan S. Methotrexate Hepatotoxicity in Patients with Rheumatoid Arthritis. Middle East J Dig Dis 2010;2:104–9.

[540] Weinblatt ME, Fraser P. Elevated mean corpuscular volume as a predictor of hematologic toxicity due to methotrexate therapy. Arthritis & Rheumatism 1989;32:1592–6. https://doi.org/10.1002/anr.1780321214.

[541] Čabarkapa A, Živković L, Borozan S, Zlatković-Švenda M, Dekanski D, Jančić I, et al. Dry Olive Leaf Extract in Combination with Methotrexate Reduces Cell Damage in Early Rheumatoid Arthritis Patients-A Pilot Study: Combined Treatment Reduces Cell Damage in Rheumatoid Arthritis. Phytother Res 2016;30:1615–23. https://doi.org/10.1002/ptr.5662.

[542] Lu S, Shao J, Li X. [Clinical observation on treatment of rheumatoid arthritis by combined therapy with methotrexate, sulfasalazine and Chinese herbal medicine]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2002;22:571–3.

[543] Mantecón AML, Garrido G, Delgado-Hernández R, Garrido-Suárez BB. Combination of Mangifera indica L. Extract Supplementation Plus Methotrexate in Rheumatoid Arthritis Patients: A Pilot Study. Phytotherapy Research 2014;28:1163–72. https://doi.org/10.1002/ptr.5108.

[544] Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. Front Pharmacol 2017;8. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00412.

[545] Kocot J, Kiełczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018. https://doi.org/10.1155/2018/7074209.

[546] Fatma A. Khalil AAAE-KEAK and NGE-R. BENEFICIAL EFFECT OF PROPOLIS EXTRACT (BEE GLUE) AGAINST METHOTREXATE-INDUCED STRESS IN LIVER AND BRAIN OF ALBINO RATS. Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences 2016;3:24–35. https://doi.org/10.5281/zenodo.54549.

[547] Kaynar L, Cetin AA, Hacioglu SK, Eser B, Koã‡yigit Ä, Canã–Z Ã, et al. EFFICACY OF

ROYAL JELLY ON METHOTREXATE-INDUCED SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS AND DAMAGE TO SMALL INTESTINE IN RATS. 1 2012;9:412–7.

[548] Khanal L, Yadav P, Baral P, Shah R, Rauniar GP. Effect of local bee honey on dihydrofolate reductase enzyme inhibitor-induced mucositis: A histological study on albino wistar rats. Indian Journal of Dental Research 2019;30:708. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_689_17.

[549] Hannoodee M, Mittal M. Methotrexate. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

[550] Khan ZA, Tripathi R, Mishra B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. Expert Opinion on Drug Delivery 2012;9:151–69. https://doi.org/10.1517/17425247.2012.642362.

[551] Montemurro M, De Zan MM, Robles JC. Optimized high performance liquid chromatography–ultraviolet detection method using core-shell particles for the therapeutic monitoring of methotrexate. Journal of Pharmaceutical Analysis 2016;6:103–11. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.12.001.

[552] Stamp LK, Hazlett J, Roberts RL, Frampton C, Highton J, Hessian PA. Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: a basis for methotrexate action. Arthritis Research & Therapy 2012;14:R138. https://doi.org/10.1186/ar3871.

[553] Mello SBV, Barros DM, Silva ASF, Laurindo IMM, Novaes GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 2000;39:533–6.

[554] Sperling RI, Benincaso AI, Anderson RJ, Coblyn JS, Austen KF, Weinblatt ME. Acute and chronic suppression of leukotriene B4 synthesis ex vivo in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis beginning treatment with methotrexate. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology 1992;35:376–84.

[555] Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard J-P. Mechanisms of action of methotrexate. Immunopharmacology 2000;47:247–57. https://doi.org/10.1016/S0162-3109(00)00189-2.

[556] Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. J Clin Invest 1998;102:322–8. https://doi.org/10.1172/JCI2676.

[557] Herman S, Zurgil N, Langevitz P, Ehrenfeld M, Deutsch M. The Immunosuppressive Effect of Methotrexate in Active Rheumatoid Arthritis Patients vs. its Stimulatory Effect in Nonactive Patients, as Indicated by Cytometric Measurements of CD4 + T Cell Subpopulations. Immunological Investigations 2004;33:351–62. https://doi.org/10.1081/IMM-120039865.

[558] Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, et al. Methotrexate an Old Drug with New Tricks. Int J Mol Sci 2019;20. https://doi.org/10.3390/ijms20205023.

[559] Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. Br J Pharmacol 2003;138:501–11. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705054.

[560] Arai S, Hara T, Matsui Y, Koido K, Hashimoto H, Shinoda Y, et al. Tolerability and Efficacy

of Neoadjuvant Chemotherapy with a Tri-Weekly Interval Methotrexate, Doxorubicin, Vinblastine, and Cisplatin Regimen for Patients with Locally Advanced Bladder Cancer. CRO 2018;11:450–60. https://doi.org/10.1159/000490458.

[561] Sayılmaz A, Karabulut YY, Özgörgülü A. The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. Turk J Urol 2016;42:235–9. https://doi.org/10.5152/tud.2016.63903.

[562] Walling J. From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. Investigational New Drugs 2006;24:37–77.

[563] Yang V, Gouveia MJ, Santos J, Koksch B, Amorim I, Gärtner F, et al. Breast cancer: insights in disease and influence of drug methotrexate. RSC Med Chem 2020;11:646–64. https://doi.org/10.1039/D0MD00051E.

[564] McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. New England Journal of Medicine 2011;365:2205–19.

[565] Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2001;60:729–35. https://doi.org/10.1136/ard.60.8.729.

[566] Rajitha P, Biswas R, Sabitha M, Jayakumar R. Methotrexate in the treatment of psoriasis and rheumatoid arthritis: mechanistic insights, current issues and novel delivery approaches. Current Pharmaceutical Design 2017;23:3550–66.

[567] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. International Journal of Molecular Sciences 2019;20:1475. https://doi.org/10.3390/ijms20061475.

[568] Yélamos O, Puig L. Systemic methotrexate for the treatment of psoriasis. Expert Review of Clinical Immunology 2015;11:553–63. https://doi.org/10.1586/1744666X.2015.1026894.

[569] Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. Primary Care: Clinics in Office Practice 2017;44:673–92. https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.07.010.

[570] Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology 2017;152:313-321.e2. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.020.

[571] Sawczenko A, Sandhu BK, Logan RF, Jenkins H, Taylor CJ, Mian S, et al. Prospective survey of childhood inflammatory bowel disease in the British Isles. Lancet 2001;357:1093–4. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04309-9.

[572] Pierik M, Yang H, Barmada MM, Cavanaugh JA, Annese V, Brant SR, et al. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. Inflamm Bowel Dis 2005;11:1–7. https://doi.org/10.1097/00054725-200501000-00001.

[573] Abraham C, Cho JH. Mechanisms of disease. N Engl J Med 2009;361:2066–78.

[574] Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. Int J Clin Exp Med 2015;8:22529–42.

[575] Gabbani T, Deiana S, Lunardi S, Manetti N, Annese V. Safety profile of methotrexate in inflammatory bowel disease. Expert Opinion on Drug Safety 2016;15:1427–37. https://doi.org/10.1080/14740338.2016.1218468.

[576] Herfarth HH, Kappelman MD, Long MD, Isaacs KL. Use of Methotrexate in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. Inflammatory Bowel Diseases 2016;22:224–33. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000589.

[577] Cesarini M, Festa S, Papi C. Methotrexate in Crohn's disease: a new face for an old drug? Expert Review of Gastroenterology & Hepatology 2016;10:1135–44. https://doi.org/10.1080/17474124.2016.1185363.

[578] Gaies E, Jebabli N, Trabelsi S, Salouage I, Charfi R, Lakhal M, et al. Methotrexate side effects: review article. J Drug Metab Toxicol 2012;3:1–5.

[579] Howard SC, McCormick J, Pui C-H, Buddington RK, Harvey RD. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. Oncologist 2016;21:1471–82. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0164.

[580] Rau R, Herborn G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis n.d.:12.

[581] Diouf ML, Diallo S, Mbengue M, Moreira-Diop T. [Methotrexate, liver and rheumatoid arthritis in tropical areas]. Sante 2001;11:195–200.

[582] Sandoval C, Kutscher M, Jayabose S, Tenner M. Neurotoxicity of Intrathecal Methotrexate: MR Imaging Findings. American Journal of Neuroradiology 2003;24:1887–90.

[583] Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Aviner S, Steinmetz A, et al. Methotrexate Treatment Protocols and the Central Nervous System: Significant Cure With Significant Neurotoxicity. J Child Neurol 2000;15:573–80. https://doi.org/10.1177/088307380001500902.

[584] Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. Biochemical and Clinical Aspects of Methotrexate Neurotoxicity. CHE 2003;49:92–104. https://doi.org/10.1159/000069773.

[585] Campbell JM, Bateman E, Stephenson MD, Bowen JM, Keefe DM, Peters MDJ. Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Cancer Chemother Pharmacol 2016;78:27–39. https://doi.org/10.1007/s00280-016-3043-5.

[586] Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. Scandinavian Journal of Gastroenterology 2004;39:1119–27. https://doi.org/10.1080/00365520410003605.

[587] Papaconstantinou HT, Xie C, Zhang W, Ansari NH, Hellmich MR, Townsend CM, et al. The role of caspases in methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. Surgery 2001;130:859–65. https://doi.org/10.1067/msy.2001.117376.

[588] Imokawa S, Colby TV, Leslie KO, Helmers RA. Methotrexate pneumonitis: review of the literature and histopathological findings in nine patients. European Respiratory Journal 2000;15:373–81.

[589] Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Tsukadaira A, Haniuda M, Kurai M, et al. Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities. Exp Lung Res

2003;29:91–111. https://doi.org/10.1080/01902140303768.

[590] Lyman GH, Lyman CH, Agboola O, Group AS. Risk models for predicting chemotherapy-induced neutropenia. The Oncologist 2005;10:427–37.

[591] Ferreira-Santos P, Genisheva Z, Pereira RN, Teixeira JA, Rocha CMR. Moderate Electric Fields as a Potential Tool for Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from Pinus pinaster Bark. ACS Sustainable Chem Eng 2019;7:8816–26. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00780.

[592] Ferreira-Santos P, Zanuso E, Genisheva Z, Rocha CMR, Teixeira JA. Green and Sustainable Valorization of Bioactive Phenolic Compounds from Pinus By-Products. Molecules 2020;25:2931. https://doi.org/10.3390/molecules25122931.

[593] Khalifa MMA, Bakr AG, Osman AT. Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;95:529–35. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.121.

[594] Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Meth Enzymol 1990;186:421–31. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i.

[595] Aebi H. Catalase in vitro. Meth Enzymol 1984;105:121–6. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3.

[596] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 1959;82:70–7. https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.

[597] Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Meth Enzymol 1984;105:114–21. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1.

[598] Glasauer A, Chandel NS. Ros. Current Biology 2013;23:R100–2.

[599] Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. The Journal of Immunology 2013;191:5230–8.

[600] Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. International Journal of Molecular Sciences 2021;22:4642. https://doi.org/10.3390/ijms22094642.

[601] Abbas Yavari MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Asian Journal of Sports Medicine 2015;6. https://doi.org/10.5812/asjsm.24898.

[602] Heyland DK, Dhaliwal R, Suchner U, Berger MM. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. Intensive Care Med 2005;31:327–37. https://doi.org/10.1007/s00134-004-2522-z.

[603] Cheynier V. Phenolic compounds: from plants to foods. Phytochem Rev 2012;11:153–77. https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8.

[604] Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MSV, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits – an overview. International Journal of Food Science & Technology 2012;47:2023–44.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.

[605] Huyut Z, Beydemir Ş, Gülçin İ. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. Biochemistry Research International 2017;2017:e7616791. https://doi.org/10.1155/2017/7616791.

[606] Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HAG, Lima C-YOC and GPP. Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. IntechOpen; 2017. https://doi.org/10.5772/66368.

[607] Özcan MM, Aljuhaimi F, Babiker EE, Uslu N, Ceylan DA, Ghafoor K, et al. Determination of Antioxidant Activity, Phenolic Compound, Mineral Contents and Fatty Acid Compositions of Bee Pollen Grains Collected from Different Locations. Journal of Apicultural Science 2019;63:69–79. https://doi.org/10.2478/jas-2019-0004.

[608] Ajmani S, Preet Singh Y, Prasad S, Chowdhury A, Aggarwal A, Lawrence A, et al. Methotrexate-induced pancytopenia: a case series of 46 patients. International Journal of Rheumatic Diseases 2017;20:846–51. https://doi.org/10.1111/1756-185X.13004.

[609] Gutierrez-Ureña S, Molina JF, García CO, Cuéllar ML, Espinoza LR. Pancytopenia secondary to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism 1996;39:272–6. https://doi.org/10.1002/art.1780390214.

[610] Knoll K, Anzengruber F, Cozzio A, French LE, Murer C, Navarini AA. Mucocutaneous Ulcerations and Pancytopenia due to Methotrexate Overdose. CDE 2016;8:287–93. https://doi.org/10.1159/000446692.

[611] Preet Singh Y, Aggarwal A, Misra R, Agarwal V. Low-dose methotrexate-induced pancytopenia. Clin Rheumatol 2007;26:84–7. https://doi.org/10.1007/s10067-006-0301-7.

[612] Yildiz H, Tayci I, Yildiz Ö, Demir M. Pancytopenia and stomatitis induced by low-dose methotrexate use. CHRISMED J Health Res 2017;4:52. https://doi.org/10.4103/2348-3334.196068.

[613] Cheng K k.-F. Association of plasma methotrexate, neutropenia, hepatic dysfunction, nausea/vomiting and oral mucositis in children with cancer. European Journal of Cancer Care 2008;17:306–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2007.00843.x.

[614] Lazaro E, Morel J. Management of neutropenia in patients with rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2015;82:235–9. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2015.01.005.

[615] Mayall B, Poggi G, Parkin JD. Neutropenia due to low-dose methotrexate therapy for psoriasis and rheumatoid arthritis may be fatal. Medical Journal of Australia 1991;155:480–4. https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1991.tb93847.x.

[616] Mori S, Hidaka M, Kawakita T, Hidaka T, Tsuda H, Yoshitama T, et al. Factors Associated with Myelosuppression Related to Low-Dose Methotrexate Therapy for Inflammatory Rheumatic Diseases. PLOS ONE 2016;11:e0154744. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154744.

[617] Mohassel L, Griffin S, Binder N, Barnett SD, Cuevo R. Evaluation of Methotrexate Clearance in Adult and Pediatric Patients with Hypoalbuminemia. Blood 2019;134:2906–2906. https://doi.org/10.1182/blood-2019-121892.

[618] Reiss SN, Buie LW, Adel N, Goldman DA, Devlin SM, Douer D. Hypoalbuminemia is significantly associated with increased clearance time of high dose methotrexate in patients being treated for lymphoma or leukemia. Ann Hematol 2016;95:2009–15. https://doi.org/10.1007/s00277-016-2795-7.

[619] Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. Nat Rev Rheumatol 2016;12:731–42. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.175.

[620] Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Runar Ludviksson B, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. Clinical Immunology 2005;114:154–63. https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.09.001.

[621] Bruyn GA, Velthuysen E, Joosten P, Houtman PM. Pancytopenia related eosinophilia in rheumatoid arthritis: a specific methotrexate phenomenon. J Rheumatol 1995;22:1373–6.

[622] Fragoulis GE, Nikiphorou E, Larsen J, Korsten P, Conway R. Methotrexate-Associated Pneumonitis and Rheumatoid Arthritis-Interstitial Lung Disease: Current Concepts for the Diagnosis and Treatment. Front Med (Lausanne) 2019;6:238. https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00238.

[623] Sato E, Camhi SL, Koyama S, Robbins RA. Methotrexate stimulates lung fibroblasts and epithelial cells to release eosinophil chemotactic activity. The Journal of Rheumatology 2001;28:502–8.

[624] Banji D, Pinnapureddy J, Banji OJF, Kumar AR, Reddy KN. Evaluation of the concomitant use of methotrexate and curcumin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis and hematological indices in rats. Indian J Pharmacol 2011;43:546–50. https://doi.org/10.4103/0253-7613.84970.

[625] Haro A, López-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos MS. Beneficial Effect of Pollen and/or Propolis on the Metabolism of Iron, Calcium, Phosphorus, and Magnesium in Rats with Nutritional Ferropenic Anemia. J Agric Food Chem 2000;48:5715–22. https://doi.org/10.1021/jf000635h.

[626] FAIRBANKS LD, RüCKEMANN K, QIU Y, HAWRYLOWICZ CM, RICHARDS DF, SWAMINATHAN R, et al. Methotrexate inhibits the first committed step of purine biosynthesis in mitogen-stimulated human T-lymphocytes: a metabolic basis for efficacy in rheumatoid arthritis? Biochemical Journal 1999;342:143–52.

[627] Lim AYN, Gaffney K, Scott DGI. Methotrexate-induced pancytopenia: serious and under-reported? Our experience of 25 cases in 5 years. Rheumatology 2005;44:1051–5. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh685.

[628] DIJKMANS BAC. FOLATE SUPPLEMENTATION AND METHOTREXATE. Rheumatology 1995;34:1172–4. https://doi.org/10.1093/rheumatology/34.12.1172.

[629] Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. Arthritis & Rheumatism 1986;29:832–5. https://doi.org/10.1002/art.1780290703.

[630] Strober BE, Menon K. Folate supplementation during methotrexate therapy for patients with psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 2005;53:652–9.

https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.06.036.

[631] Strober BE, Menon K. Folate supplementation during methotrexate therapy for patients with psoriasis. Journal of the American Academy of Dermatology 2005;53:652–9. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.06.036.

[632] Whittle SL, Hughes RA. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. Rheumatology 2004;43:267–71. https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh088.

[633] Iqbal MP, Saeed SA, Pertani S, Mehboobali N. Additive effect of indomethacin and methotrexate on suppression of growth in rats. Biopharm Drug Dispos 1999;20:389–95. https://doi.org/10.1002/1099-081X(199911)20:8<389::AID-BDD201>3.0.CO;2-1.

[634] Mhatre BA, Marar T. Protective effect of Morinda citrifolia L. (fruit extract) on methotrexate-induced toxicities—hematological and biochemical studies. Cogent Biology 2016;2:1207879. https://doi.org/10.1080/23312025.2016.1207879.

[635] Fan C, Georgiou KR, King TJ, Xian CJ. Methotrexate Toxicity in Growing Long Bones of Young Rats: A Model for Studying Cancer Chemotherapy-Induced Bone Growth Defects in Children. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011;2011:e903097. https://doi.org/10.1155/2011/903097.

[636] May KP, West SG, Mcdermott MT, Huffer WE. The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology 1994;37:201–6.

[637] Morgan SL, Chen D-T, Carlee J, Baggott JE. Effect of methotrexate therapy on bone mineral density and body composition in rat adjuvant arthritis. The Journal of Rheumatology 2004;31:1693–7.

[638] Wheeler DL, Vander Griend RA, Wronski TJ, Miller GJ, Keith EE, Graves JE. The short- and long-term effects of methotrexate on the rat skeleton. Bone 1995;16:215–21. https://doi.org/10.1016/8756-3282(94)00032-U.

[639] Lee Y-S, Kim T-Y, Kim Y, Lee S-H, Kim S, Kang SW, et al. Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development. Cell Host & Microbe 2018;24:833-846. e6.

[640] Letertre MPM, Munjoma N, Wolfer K, Pechlivanis A, McDonald JAK, Hardwick RN, et al. A Two-Way Interaction between Methotrexate and the Gut Microbiota of Male Sprague–Dawley Rats. J Proteome Res 2020;19:3326–39. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00230.

[641] Tang D, Zeng T, Wang Y, Cui H, Wu J, Zou B, et al. Dietary restriction increases protective gut bacteria to rescue lethal methotrexate-induced intestinal toxicity. Gut Microbes 2020;12:1714401. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1714401.

[642] Tinkum KL, StemLer KM, White LS, Loza AJ, Jeter-Jones S, Michalski BM, et al. Fasting protects mice from lethal DNA damage by promoting small intestinal epithelial stem cell survival. Proceedings of the National Academy of Sciences 2015;112:E7148–54.

[643] Aabed K, Shafi Bhat R, Moubayed N, Al-Mutiri M, Al-Marshoud M, Al-Qahtani A, et al. Ameliorative effect of probiotics (Lactobacillus paracaseii and Protexin®) and prebiotics (propolis and bee pollen) on clindamycin and propionic acid-induced oxidative stress and altered gut microbiota in a rodent model of autism. Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand) 2019;65:1–7.

[644] Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, et al. The effects of Lactobacillus strains and oat fiber on methotrexate- induced enterocolitis in rats. Gastroenterology 1996;111:334–44. https://doi.org/10.1053/gast.1996.v111.pm8690198.

[645] Famurewa AC, Ufebe OG, Egedigwe CA, Nwankwo OE, Obaje GS. Virgin coconut oil supplementation attenuates acute chemotherapy hepatotoxicity induced by anticancer drug methotrexate via inhibition of oxidative stress in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;87:437–42. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.123.

[646] Chauhan P, Sharma H, Kumar U, Mayachari A, Sangli G, Singh S. Protective effects of Glycyrrhiza glabra supplementation against methotrexate-induced hepato-renal damage in rats: An experimental approach. Journal of Ethnopharmacology 2020;263:113209. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113209.

[647] Laaroussi H, Bakour M, Ousaaid D, Ferreira-Santos P, Genisheva Z, El Ghouizi A, et al. Protective Effect of Honey and Propolis against Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Hepatorenal Damages. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2021;2021:e9719906. https://doi.org/10.1155/2021/9719906.

[648] Soliman ME. Evaluation of the possible protective role of folic acid on the liver toxicity ınduced experimentally by methotrexate in adult male albino rats. Egypt J Histol 2009;32:118–28.

[649] Tag HM. Hepatoprotective effect of mulberry (Morus nigra) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. BMC Complementary and Alternative Medicine 2015;15:252. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0744-y.

[650] Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2001;2:171–4.

[651] Miners J, Yang X, Knights K, Zhang L. The Role of the Kidney in Drug Elimination: Transport, Metabolism, and the Impact of Kidney Disease on Drug Clearance. Clinical Pharmacology & Therapeutics 2017;102:436–49. https://doi.org/10.1002/cpt.757.

[652] Choudhury D, Ahmed Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. Nat Rev Nephrol 2006;2:80–91. https://doi.org/10.1038/ncpneph0076.

[653] Pannu AK. Methotrexate overdose in clinical practice. Current Drug Metabolism 2019;20:714–9. https://doi.org/10.2174/1389200220666190806140844.

[654] Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. European Journal of Medicinal Chemistry 2018;158:502–16. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.027.

[655] Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, et al. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. Cancer 2004;100:2222–32. https://doi.org/10.1002/cncr.20255.

[656] Salazar JH. Overview of urea and creatinine. Laboratory Medicine 2014;45:e19–20.

[657] El-Ballal SS, Amer HA, Tahoun EA, EL-BORAI NB, Zahra MAA. Bee pollen alleviates fipronil and emamectin benzoate induced-hepatorenal toxicity in rats. Assiut Vet Med J 2019;65:164–73.

[658] Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;95:1765–76.

[659] Elsawy H, Alzahrani AM, Alfwuaires M, Abdel-Moneim AM, Khalil M. Nephroprotective effect of naringin in methotrexate induced renal toxicity in male rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2021;143:112180. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112180.

[660] Mahmoud AM, Hozayen WG, Ramadan SM. Berberine ameliorates methotrexate-induced liver injury by activating Nrf2/HO-1 pathway and PPARγ, and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;94:280–91. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.101.

[661] Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Rifaai RA, Hassan MK. Curcumin Ameliorates Methotrexate-Induced Nephrotoxicity in Rats. Advances in Pharmacological Sciences 2013;2013:e387071. https://doi.org/10.1155/2013/387071.

[662] Deray G, Khayat D, Cacoub P, Bourbouze R, Musset L, Baumelou A, et al. The effects of diltiazem on methotrexate-induced nephrotoxicity. Eur J Clin Pharmacol 1989;37:337–40. https://doi.org/10.1007/BF00558496.

[663] Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. Oncologist 2006;11:694–703. https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-6-694.

[664] Condit PT, Chanes RE, Joel W. Renal toxicity of methotrexate. Cancer 1969;23:126–31.

[665] Patel NN, Ghodasara DJ, Pandey S, Ghodasara PD, Khorajiya JH, Joshi BP, et al. Subacute toxicopathological studies of methotrexate in Wistar rats. Veterinary World 2014;7.

[666] Wiedermann CJ, Wiedermann W, Joannidis M. Causal relationship between hypoalbuminemia and acute kidney injury. World J Nephrol 2017;6:176–87. https://doi.org/10.5527/wjn.v6.i4.176.

[667] Kobayashi M, Sugiyama H, Wang D-H, Toda N, Maeshima Y, Yamasaki Y, et al. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. Kidney Int 2005;68:1018–31. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00494.x.

[668] Heidari R, Ahmadi A, Mohammadi H, Ommati MM, Azarpira N, Niknahad H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are involved in the mechanism of methotrexate-induced renal injury and electrolytes imbalance. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018;107:834–40. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.050.

[669] Kolli VK, Natarajan K, Isaac B, Selvakumar D, Abraham P. Mitochondrial dysfunction and respiratory chain defects in a rodent model of methotrexate-induced enteritis. Human & Experimental Toxicology 2014;33:1051–65.

[670] Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. British Journal of Pharmacology 2003;138:501–11. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705054.

[671] Ahmed W, Zaki A, Nabil T. Prevention of methotrexate-induced nephrotoxicity by concomitantadministration of garlic aqueous extract in rat. Turk J Med Sci 2015;45:507–16.

[672] Arab HH, Salama SA, Maghrabi IA. Camel milk attenuates methotrexate-induced kidney injury

via activation of PI3K/Akt/eNOS signaling and intervention with oxidative aberrations. Food Funct 2018;9:2661–72. https://doi.org/10.1039/C8FO00131F.

[673] Mahmoud AM, Hussein OE, Abd El-Twab SM, Hozayen WG. Ferulic acid protects against methotrexate nephrotoxicity via activation of Nrf2/ARE/HO-1 signaling and PPARγ, and suppression of NF-κB/NLRP3 inflammasome axis. Food & Function 2019;10:4593–607.

[674] Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, İmge Ergüder B, Avcı A, Durak İ. Methotrexate Causes Oxidative Stress in Rat Kidney Tissues. Renal Failure 2005;27:771–3. https://doi.org/10.1080/08860220500244823.

[675] Ju H-Q, Lin J-F, Tian T, Xie D, Xu R-H. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. Sig Transduct Target Ther 2020;5:1–12. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0.

[676] Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. Biofactors 2008;34:171–80.

[677] Fernandez-Marcos PJ, Nóbrega-Pereira S. NADPH: new oxygen for the ROS theory of aging. Oncotarget 2016;7:50814–5. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10744.

[678] Chen L, Zhang Z, Hoshino A, Zheng HD, Morley M, Arany Z, et al. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism. Nat Metab 2019;1:404–15. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0043-x.

[679] Al-Salem HS, Al-Yousef HM, Ashour AE, Ahmed AF, Amina M, Issa IS, et al. Antioxidant and hepatorenal protective effects of bee pollen fractions against propionic acid-induced autistic feature in rats. Food Science & Nutrition 2020;8:5114–27. https://doi.org/10.1002/fsn3.1813.

[680] Eraslan G, Kanbur M, Silici S, Cem Liman B, Altınordulu Ş, Soyer Sarıca Z. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. Ecotoxicology and Environmental Safety 2009;72:931–7. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.06.008.

[681] Huang H, Shen Z, Geng Q, Wu Z, Shi P, Miao X. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2017;95:1765–76. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.083.

[682] Pınar N, Kaplan M, Özgür T, Özcan O. Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018;102:758–64. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.147.

[683] El-Sheikh AAK, Morsy MA, Al-Taher AY. Protective mechanisms of resveratrol against methotrexate-induced renal damage may involve BCRP/ABCG2. Fundamental & Clinical Pharmacology 2016;30:406–18. https://doi.org/10.1111/fcp.12205.

[684] Erboga M, Aktas C, Erboga ZF, Donmez YB, Gurel A. Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. Renal Failure 2015;37:1492–7. https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1074521.

[685] Mahbub A, Le Maitre C, Haywood-Small S, Cross N, Jordan-Mahy N. Dietary polyphenols influence antimetabolite agents: methotrexate, 6-mercaptopurine and 5-fluorouracil in leukemia cell lines. Oncotarget 2017;8:104877–93. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20501.

[686] Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2006;142:317–27. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.002.

[687] Zhu H, Song D, Zhao X. Potential applications and preliminary mechanism of action of dietary polyphenols against hyperuricemia: A review. Food Bioscience 2021;43:101297. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101297.

[688] Kaplowitz N. Drug-Induced Liver Injury. Clinical Infectious Diseases 2004;38:S44–8. https://doi.org/10.1086/381446.

[689] Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Curr Biol 2017;27:R1147–51. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019.

[690] Andrade RJ, Chalasani N, Björnsson ES, Suzuki A, Kullak-Ublick GA, Watkins PB, et al. Drug-induced liver injury. Nat Rev Dis Primers 2019;5:58. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0105-0.

[691] Khera S, Ranjan R, Ramachandran S, Beriwal A. High-dose methotrexate-induced reversible grade 4 hyperbilirubinaemia and transaminitis in an adolescent with Burkitt Leukaemia. BMJ Case Reports CP 2021;14:e237512.

[692] Mori S, Arima N, Ito M, Fujiyama S, Kamo Y, Ueki Y. Non-alcoholic steatohepatitis-like pattern in liver biopsy of rheumatoid arthritis patients with persistent transaminitis during low-dose methotrexate treatment. PloS One 2018;13:e0203084.

[693] Ricart AD. Drug-induced liver injury in Oncology. Annals of Oncology 2017;28:2013–20.

[694] Al Kury LT, Dayyan F, Ali Shah F, Malik Z, Khalil AAK, Alattar A, et al. Ginkgo biloba Extract Protects against Methotrexate-Induced Hepatotoxicity: A Computational and Pharmacological Approach. Molecules 2020;25:2540. https://doi.org/10.3390/molecules25112540.

[695] Chauhan P, Sharma H, Kumar U, Mayachari A, Sangli G, Singh S. Protective effects of Glycyrrhiza glabra supplementation against methotrexate-induced hepato-renal damage in rats: An experimental approach. Journal of Ethnopharmacology 2020;263:113209. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113209.

[696] Ebrahimi R, Sepand MR, Seyednejad SA, Omidi A, Akbariani M, Gholami M, et al. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the IκBα/NFκB in rats. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2019;27:721–33.

[697] Pınar N, Kaplan M, Özgür T, Özcan O. Ameliorating effects of tempol on methotrexate-induced liver injury in rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018;102:758–64. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.147.

[698] Cao Y, Shi H, Sun Z, Wu J, Xia Y, Wang Y, et al. Protective Effects of Magnesium Glycyrrhizinate on Methotrexate-Induced Hepatotoxicity and Intestinal Toxicity May Be by Reducing COX-2. Frontiers in Pharmacology 2019;10:119. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00119.

[699] Ebrahimi R, Sepand MR, Seyednejad SA, Omidi A, Akbariani M, Gholami M, et al. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the IκBα/NFκB in rats. DARU J Pharm Sci 2019;27:721–33.

https://doi.org/10.1007/s40199-019-00309-9.

[700] Ezhilarasan D. Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. Toxicology 2021;458:152840. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152840.

[701] Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Abd El-Twab SM. Methotrexate hepatotoxicity is associated with oxidative stress, and down-regulation of PPARγ and Nrf2: Protective effect of 18β-Glycyrrhetinic acid. Chemico-Biological Interactions 2017;270:59–72. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.04.009.

[702] Hou Z, Matherly LH. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. Current Topics in Membranes 2014;73:175–204.

[703] Yamamoto T, Shikano K, Nanki T, Kawai S. Folylpolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. Scientific Reports 2016;6:1–8.

[704] Yajima D, Motani H, Hayakawa M, Sato Y, Sato K, Iwase H. The relationship between cell membrane damage and lipid peroxidation under the condition of hypoxia-reoxygenation: analysis of the mechanism using antioxidants and electron transport inhibitors. Cell Biochemistry and Function 2009;27:338–43. https://doi.org/10.1002/cbf.1578.

[705] Kalantar M, Kalantari H, Goudarzi M, Khorsandi L, Bakhit S, Kalantar H. Crocin ameliorates methotrexate-induced liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. Pharmacological Reports 2019;71:746–52. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.004.

[706] El Shater A-ERA, Ali RA. Effect of Selenium and Bee Pollen Against Immunotoxicity and Hepatotoxicity Induced by Cadmium in Male Albino Rats. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences C, Physiology and Molecular Biology 2019;11:1–19.

[707] Laaroussi H, Bakour M, Ousaaid D, Aboulghazi A, Ferreira-Santos P, Genisheva Z, et al. Effect of antioxidant-rich propolis and bee pollen extracts against D-glucose induced type 2 diabetes in rats. Food Research International 2020;138:109802.

[708] Doostan F, Vafafar R, Zakeri-Milani P, Pouri A, Amini Afshar R, Mesgari Abbasi M. Effects of Pomegranate (Punica Granatum L.) Seed and Peel Methanolic Extracts on Oxidative Stress and Lipid Profile Changes Induced by Methotrexate in Rats. Adv Pharm Bull 2017;7:269–74. https://doi.org/10.15171/apb.2017.032.

[709] Ghadir MR, Riahin AA, Havaspour A, Nooranipour M, Habibinejad AA. The relationship between lipid profile and severity of liver damage in cirrhotic patients. Hepatitis Monthly 2010;10:285.

[710] El-Missiry MA. Antioxidant Enzyme. BoD – Books on Demand; 2012.

[711] AYDIN B. Quercetin prevents methotrexate-induced hepatotoxicity without interfering methotrexate metabolizing enzymes in liver of mice. Journal of Applied Biological Sciences 2011;5:75–80.

[712] Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. Hum Exp Toxicol 2013;32:662–71. https://doi.org/10.1177/0960327112468178.

[713] Elsawy H, Algefare AI, Alfwuaires M, Khalil M, Elmenshawy OM, Sedky A, et al. Naringin alleviates methotrexate-induced liver injury in male albino rats and enhances its antitumor efficacy in HepG2 cells. Bioscience Reports 2020;40. https://doi.org/10.1042/BSR20193686.

[714] Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E. Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats1. Acta Cirurgica Brasileira 2015;30:778–84.

[715] Goudarzi M, Kalantar M, Sadeghi E, Karamallah MH, Kalantar H. Protective effects of apigenin on altered lipid peroxidation, inflammation, and antioxidant factors in methotrexate-induced hepatotoxicity. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2021;394:523–31. https://doi.org/10.1007/s00210-020-01991-2.

[716] Jafaripour L, Naserzadeh R, Alizamani E, Mashhadi SMJ, Moghadam ER, Nouryazdan N, et al. Effects of rosmarinic acid on methotrexate-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in wistar rats. Indian Journal of Nephrology 2021;31:218. https://doi.org/10.4103/ijn.IJN_14_20.

[717] Sayed MM, Abdel-Maksoud SA, Nasr AN, Sayed AA. Effects of methotrexate (mtx) on the structure of liver and kidney of adult male albino rats and the role of folic acid. AAMJ 2006;4.

[718] Harun H. Lipid Peroxidation: Aging Kidney. IntechOpen; 2021. https://doi.org/10.5772/intechopen.95801.