



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb de Blida -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



Département des Sciences Alimentaires

Laboratoire Sciences Technologies Alimentaire et Développement Durable

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en :

Spécialité : Nutrition et Diététique Humaine

Filière : Sciences alimentaires

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Thème

Etude de la valeur nutritionnelle, diététique et des propriétés thérapeutique de la propolis Algérienne

Présenté par :

- **RIMANI YAMNA**
- **GHEMATI AMIRA**

Soutenu devant le jury composé de :

- **Présidente : Dr. AYAD.A** **MCB** **U. de Blida 1**
- **Examinatrice : Dr. DEFAIRI .D** **MCB** **U. de Blida 1**
- **Promoteur : Pr. BOUTOUMI .H** **Professeur** **U. de Blida 1**
- **Co-promotrice: Dr. BENMANSOUR .N** **MCA** **U. de Blida 1**

Année universitaire 2020- 2021

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné le savoir, la force et la patience, pour poursuivre nos études et achever ce mémoire.

A l'issue de ce travail, on tient à remercier vivement toute personne de prêt ou de loin qui a contribué à l'élaboration de ce mémoire.

- Monsieur BOUTOUMI. H, Professeur à l'université de Blida -1- d'avoir accepté de diriger notre travail, Un grand merci pour son effort moral qui nous a donné la force d'atteindre la fin de cet humble travail.
- Madame BENMANSOUR .N, Nous remercions pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements. Grâce à elle que nous avons progressé et acquis la rigueur nécessaire pour appréhender ce projet. Tout en étant toujours présent et disponible.
- Madame AYAD. A, d'avoir honoré la présidence de ce jury
- Madame DEFAIRI. Dj, Maître de Conférence à l'université de Blida -1- d'avoir d'accepter d'examiner et de juger notre travail.
- Monsieur HANED Mohamed et Monsieur Rida, Un grand merci pour sa fourniture d'échantillon de propolis et votre aide dans la réalisation de notre travail.
- TERCHI Noura. BOUKHEDDOUNI Nawal, BRIGHET Saliha, les ingénieures du Laboratoire de l'institut technique des élevages pour leur aide et leur soutien.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire de l'institut technique des élevages et le laboratoire de projet de fin d'études à Blida, département d'Agroalimentaire qui ont contribué chacun pour sa part à la réalisation de cette thèse. Nous profitons de cette dernière occasion pour exprimer notre gratitude à tout le corps enseignant et tout membre de notre université, côtoyés au cours de ces cinq années.

Dédicaces

Je dédie affectueusement cette mémoire à tous ceux que j'aime et que j'estime en particulier :

A mes Parents ; toute ma gratitude pour leurs patiences, leurs soutiens, leurs prières et leurs encouragements tout en long de mes études.

A mon cher frère **Mohamed**.

A mes chères sœurs **Maroua** et **Safaa**.

A toute ma famille **RIMANI** surtout **ma grand-mère et ma tante**.

Et tout la famille **MAYOUF** surtout **ma grand-mère et mon Grand-père**.

A celle que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de notre projet

Ma sosie et mon binôme **AMIRA** et a tous mes amis sur tous **Sara et Wissam**.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Merci d'être toujours là pour moi.

Melle RIMANI YAMNA



Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

A ceux qui ont donné un sens à mon existence, **mon très cher père et ma très chère mère** qui ont sacrifié les belles années de leur vie pour me voir un jour franchir le seuil de la réussite en m'offrant une éducation digne, pour leur amour, la confiance qu'ils ont placée en moi depuis mon très jeune âge, leur soutien moral surtout et pour Leurs encouragements tout au long de mes études.

A ma très chère Sœur : **Asmaa.**

A mes très chères Frères : **Abdel Hak, Abdel Rahman** et mon adorable ange **Maroin.**

A mon cher binôme **YAMNA**, je te souhaite la réussite dans ta vie personnelle et professionnelle, avec tout le bonheur qu'il faut pour te combler.

A ma très chère amis : **Sara.**

A ma grande famille **GHEMATI-OSMANI.**

A mon oncle et mes chères tantes.

Mes spéciales dédicacent à celui qui a été à mes côtés et qui m'a supporté durant tout ce travail et la période de ma blessure ma très chère cousin **ZAHRA.**

A tous mes amis et à toutes les personnes qui m'ont aidé de prêt comme de loin et à tous ceux qui me sont chers.

Melle GHEMATI AMIRA



Résumé

La présente étude porte sur la caractérisation physico-chimique, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes et évaluer l'effet biologique des extraits éthanoliques de la Propolis locale récoltée dans les trois régions différentes d'Algérie : Larbaa ; Les Eucalyptus et Bouinan.

Dans un souci de valorisation de ce produit et afin de lui attribuer une carte d'identité propre à lui, nous avons voulu apporter notre modeste contribution en analysant 03 échantillons de propolis récoltée dans différentes régions du pays (Montagne, Plaine et Steppe). La caractérisation physico-chimique des différents échantillons de propolis, ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques constituent un point de départ pour cette action.

Les analyses physicochimiques révèlent une variation significative entre les échantillons de propolis analysés. Ils sont très pauvres en eau et en matière volatiles car ils ont un taux faible de pertes pendant le séchage compris entre 2,98% et 3,99%, avec des taux de pourcentage de matière sèche respectifs 97,02 %, 96,12 % et 96,5%. . Leur taux de cendres varie entre 3,78% et 5,28%. Ils se dévoilent un pH variant entre 4,57 et 5.65, l'échantillon de Larbaâ est plus acide puisque sa valeur trouvée est la plus faible soit 4.57.

Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que leur teneur est élevée ($250,00 \pm 5.091 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) dans l'extrait éthanolique de la propolis de larbaa par rapport à celle de la propolis récoltée dans la région des Eucalyptus ($158,30 \pm 0.566 \mu\text{g EAG/mg}$) et de Bouinan ($200,00 \pm 5.657 \mu\text{g EAG/mg}$)

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région de Larbaa se montre plus riche en flavonoïdes ($40 \pm 3.125 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) par rapport à la quantité extraite des extraits éthanoliques des Eucalyptys et Bouinan.

L'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région de Larbaa pouvait ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 1.2 mg/ml. Elle est légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique (0.85 mg/ml). Cependant les extraits éthanoliques de propolis récoltée dans les deux régions Bouinan et les Eucalyptus sont respectivement élevés par rapport à l'acide ascorbique avec des valeurs respectives 5 mg/ml et 6.5 mg/ml.

En outre ; la comparaison des résultats antibactériennes des solution mères (extrait éthanolique de la propolis) et des extraits dilués de l'extrait éthanolique (des dilutions 10^{-1} et 10^{-2}) vis-à-vis de nos 04 souches bactériennes, dévoile d'un côté une activité bactériostatique importante des extraits de propolis récoltée dans la région de Larabaa par rapport à celles des deux autres régions, et d'un autre côté la souche *Bacillus subtilus* se montre plus sensible aux extraits par rapport aux trois autres souches bactériennes : *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylocoques aureus*.

Mots clés : Propolis, extrait éthanolique, propriétés physicochimiques, dosage des polyphénols et des flavonoïdes, pouvoir antioxydant (méthode DPPH), activité antibactérienne

Summary

The present study relates to the physicochemical characterization, the determination of polyphenols and flavonoids and to evaluate the biological effect of the ethanolic extracts of the local Propolis collected in the three different regions of Algeria: Larbaa; Eucalyptus and Bouinan.

In order to promote this product and to give it an identity card specific to it, we wanted to make our modest contribution by analyzing 03 samples of propolis collected in different regions of the country (Mountain, Plain and Steppe). Physico-chemical characterization of the different propolis samples, as well as the evaluation of their biological activities constitute a starting point for this action.

The physicochemical analyzes reveal a significant variation between the samples of propolis analyzed. They are very poor in water and volatile matter because they have a low rate of loss during drying of between 2.98% and 3.99%, with respective percentage dry matter rates 97.02%, 96.12 % and 96.5%. . Their ash content varies between 3.78% and 5.28%. They reveal a pH varying between 4.57 and 5.65, the sample of Larbaa is more acidic since its found value is the lowest, ie 4.57.

The determination of the polyphenols by the Folin-Ciocalteu method revealed that their content is high ($250.00 \pm 5.091 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$ of extract) in the ethanolic extract of the propolis of Larbaa compared to that of the harvested propolis in the region of Eucalyptus ($158.30 \pm 0.566 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$) and Bouinan ($200.00 \pm 5.657 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$)

The quantitative determination of total flavonoids by the aluminum trichloride method reveals that the ethanolic extract of propolis collected in the Larbaa region is richer in flavonoids ($40 \pm 3.125 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$ of extract) compared to the quantity extracted from the ethanolic extracts of Eucalyptus and Bouinan.

The ethanolic extract of propolis collected in the Larbaa region could bring back the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) to yellow-colored diphenylpicrylhydrazine with an IC₅₀ of 1.2 mg / ml. It is slightly lower than that of ascorbic acid (0.85 mg / ml). However, the ethanolic extracts of propolis harvested in the two regions Bouinan and the Eucalyptus are respectively high relative to ascorbic acid with respective values of 5 mg / ml and 6.5 mg / ml.

In addition ; comparison of the antibacterial results of stock solutions (ethanolic extract of propolis) and diluted extracts of ethanol extract (dilutions 10⁻¹ and 10⁻²) vis-à-vis our 04 bacterial strains, reveals on the one hand an important bacteriostatic activity of the extracts of propolis collected in the region of Larbaa compared to those of the other two regions, and on the other hand the strain *Bacillus subtilis* is more sensitive to extracts compared to the other three bacterial strains: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococci aureus*.

Keywords : Propolis, ethanol extract, physicochemical properties, dosage of polyphenols and flavonoids, antioxidant power (DPPH method), antibacterial activity

ملخص

تدقيق الدراسة الحرة بالنوصيف النيزباني والكيمياء؛ وتحديد البنزينولات والغالنوزيدات ولتؤييم التأثير البيولوجي للمسخلصات الإبنانولية من العكبر المحلي الذي تم جمعه ني ثالث مناطق مختلطة من الجزائر: Larbaa ؛ أوكالبوس وبونان.

من أجل الترويج لهذا المنتج ومنحه بطاقة هوية خاصة به ، أردنا تقديم مساهمة من خلال تحليل 03 عينات من البروبوليس تم جمعها ني مناطق مختلطة من البلاد (الجل والسهل والسوب). تشكل عينات البروبوليس المختلطة ، بالإضافة إلى توييم أنشطها البيولوجية ، نقطة انطلاق لهذا الإجراء.

تكشف التحليلات النيزبانية والكيمياءية عن تباين كبير بين عينات البروبوليس التي تم تحليلها. هم نراء جدا ني الماء والمواد المتطايرة لأن لديهم معدل خسارة منخفض أثناء التجفيف يتراوح بين 2.98% و 3.99% ، مع نسب المادة الجافة ذات الصلة 97.02% ، 96.12% و 96.5%. يتراوح محتوى الرماد فيها بين 3.78% و 5.28%. يكشفون عن درجة حموضة تتراوح بين 4.57 و 5.65 ، عينة منوعبر مركب Larbaa أكثر حمضية حيث أن توييمه المكثفة هي الأدنى ، أي 4.57.

أظهر تحديد البولفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu أن محتواها مرتفع (5.091 ± 250.00 ميكروغرام / ملغ من المسخلص) ني المسخلص الإبنانولي لدرج التربة مؤازرة بمسخلص البروبوليس المحصول ني منطقة أوكالبوس (0.566 ± 158.30 ميكروغرام EAG / ملغ) وبونان (5.657 ± 200.00 ميكروغرام EAG / ملغ).

يكشف التحديد الكمي لمجموع مركبات الغالنوزيد بواسطة طريقة ثنائي كلوريد الألومنيوم أن المسخلص الإبنانولي للعكبر الذي تم جمعه ني منطقة Larbaa أكثر ثرا (ني مركبات الغالنوزيد) 3.125 ± 40 ميكروغرام مكاني / مجم. من المسخلص (مؤازرة بالكيفية المسخرجة من المسخلصات الإبنانولية لـ أوكالبوس وبونان).

يمكن أن يعيد المسخلص الإبنانولي للعكبر الذي تم جمعه ني منطقة Larbaa الجذور الحرة الذائبة DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) إلى ثنائي نينيل بيكريل ميرازين أصفر اللون مع IC50 من 1.2 مجم / مل. وهو أول توييم من حمض الأسكوربيك (0.85 مجم / مل). ومع ذلك ، فإن المسخلصات الإبنانولية للعكبر التي يتم حصادها ني منطوي بونان وأوكالبوس مرتفعة على التوالي بالنسبة لحمض الأسكوربيك بوييم 5 مجم / مل و 6.5 مجم / مل.

بالضامة ؛ مؤازرة بين النتائج البكتيرية (مخزون) مسخلص البروبوليس الإبنانولي (والمسخلصات المختلطة من مسخلص الإبنانول) (التخيمات 1-10 و 10-2) (ني توييم سالار البكتيرية 04 ، يكشف عن نشاط جرثومي مهم لمسخلصات البروبوليس التي تم جمعها ني منطقة العكبر مؤازرة بتلك الموجبة ني البكتيريا الأخرى ، ومن ناحية أخرى البكتيريا Bacillus subtilis أكثر حساسية للمسخلصات مؤازرة بالبكتيريا الأخرى :

بكتيريا قولونية. Staphylococci aureus Pseudomonas aeruginosa.

الكلمات المفتاحية : البروبوليس ، مسخلص البانول ، خصائص الفيزيائية والكيمياءية ، جرعة البروبوليس وغانلنوزيد ، توييم ضامة البكتيرية بطريقة DPPH (، نشاط بكتيري).

Liste des figures :

Figure 1 : Morphologie de l'abeille.....	06
Figure 2 : Résine du pin.....	12
Figure 3 : Récole de la propolis par l'abeille et l'homme.....	16
Figure 4 : Tris des impuretés de la propolis.....	31
Figure 5 : Macération de la propolis dans l'éthanol.....	31
Figure 6 : Filtration des trois échantillons.....	32
Figure 7 : Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux.....	36
Figure 8 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes.....	37
Figure 9 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes totaux	38
Figure 10 : Réduction du radical libre DPPH en DPPH.....	39
Figure 11 : Les étapes de test DPPH.....	40
Figure 12 : Rendement d'extraction de propolis (EEP) récoltée dans trois régions différentes	44
Figure 13 : Teneurs en polyphénols de la propolis récoltée dans trois régions différent... ..	49
Figure 14 : Teneurs en flavonoïdes de la propolis récoltée dans trois régions différentes	50
Figure 15 : Pourcentage d'inhibition d'extrait éthanoliques de propolis récoltée dans les 03 régions <i>et</i> de l'acide ascorbique	52
Figure 16 : IC50 de l'acide ascorbique et des extraits éthanoliques de la propolis récoltés dans les 03 régions.....	53
Figure 17 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis dilués de la région de Laraba.....	55

Figure 18 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis dilués de la région des Eucalyptus55

Figure 19 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis dilués de la région de Bouinan... 56

Liste des tableaux :

Tableau N°1 : Propolis des zones tempérée	13
Tableau N°2 : Propolis des zones tropicales	14
Tableau N°3 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne	20
Tableau N°4 : Origine et date de récolte des trois échantillons de la propolis étudiée	29
Tableau N°5 : Souches bactérienne utilisées dans la réalisation de l'activité antimicrobienne	30
Tableau N°6 : Estimation de la sensibilité des souches	42
Tableau N°7 : Les taux des pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes	45
Tableau N°8 : Taux des cendres et de la matière organique des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes	46
Tableau N°9 : valeur de PH des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes	46
Tableau N°10 : acidité titrable des 03 échantillons de Propolis récoltée dans trois régions différentes	47
Tableau N°11 : Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis	48
Tableau N°12 : Teneurs en flavonoïdes des différents échantillons de propolis	50
Tableau N°13 : Valeurs des concentrations d'inhibitions IC50 de l'acide ascorbique et de l'extrait éthanolique de propolis récoltée dans les 03 régions différentes	52

LISTE DES ABREVIATIONS

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

EEP : Extrait éthanolique de propolis.

PH : Potentiel Hydrogène

AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

nm : Nanomètre

g : Gramme

h : Heure

mg : milligramme

mm : Millimètre

°C : Degré Celsius

min : Minute

T° : Température

MH : Muller-Hinton (milieu de culture)

ml : Mili litre

µl : Micro litre

ZI : Zone d'inhibition

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Sommaire

Introduction générale.....01

Partie bibliographie

Chapitre 1 : La propolis

I.1. L'apiculture	06
I.1.1. L'abeille.....	06
I.1.1.1. Définition.....	06
I.1.1.2. Organisation sociale des abeilles.....	07
I.1.2. Les produits de la ruche.....	08
I.3. Historique.....	09
I.4. Définition et étymologie.....	10
I.5. L'origine de la propolis.....	11
I.6. L'origine botanique de la propolis.....	12
I.7. Récolte de la propolis.....	14
I.7.1. Récolte de la propolis par les abeilles.....	14
I.7.2. Récolte par l'homme.....	16
I.8. Conservation de propolis.....	17
I.9. Extraction de la propolis.....	18
I.10. Aspects macroscopiques et microscopiques.....	18
I.11. Composition chimique de la propolis.....	19

I.11.1. Composition chimique de la propolis des zones tempérées.....	20
I.11.2. Composition de la propolis algérienne	20
I.11.3. Les éléments minéraux et les vitamines de la propolis.....	21
I.12. Toxicité.....	21
I.13. Utilisation de la propolis	21
A. L'utilisation par les abeilles.....	21
B. L'utilisation de la propolis par l'homme	22
I.14. Propriétés thérapeutiques	24
I.15. Travaux antérieurs sur propolis.....	25

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

II.1 Lieu du stage	29
II.2. Matériel non biologique.....	29
II.3. Matériels biologique	29
II.4. Méthodes.....	30
II.4.1. Traitement de l'échantillon.....	32
II.4.2. Analyse physico-chimique.....	32
II.4.2.1. Les méthodes physiques.....	32
a). Détermination de taux des pertes pendant le séchage.....	32
b). Détermination de la teneur en cendres.....	33
II.4.2.2. Les méthodes chimiques.....	34
a). Détermination du pH.....	34
b). Détermination de l'acidité titrable.....	34
II.5. Dosage des polyphénols totaux.....	35
II.6. Dosages des flavonoïdes.....	37
II.7. Activité antioxydant.....	38
II.8. Etude de l'activité antimicrobienne.....	40

Chapitre3 : Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extraction de la propolis	44
III.2. Résultats d'analyses physiques	45
III.2.1. Pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de la propolis	45
III.2. 2.Teneur en cendre	46
III.3. Résultats d'analyses chimiques.....	46
III.3.1. pH	46
III.3.2. Acidité titrable	47
III.4. Résultats de dosage des polyphénols.....	48
III.5. Résultats de dosage des flavonoïdes	50
III.6 Activité antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis	51
III.6.1. Détermination du pourcentage d'inhibition du radical DPPH.....	51
III.7. Résultats de l'activité microbienne	54
Conclusion	58

Références bibliographique

Annexe

Introduction

Introduction

La propolis est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. C'est un complexe fabriqué par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir de leurs sécrétions salivaires, de cire et d'une série de substances résineuses que les abeilles vont recueillir sur différents supports végétaux comme les bourgeons, jeunes rameaux, ou encore blessures d'arbres et arbustes (en Europe : principalement peupliers, bouleaux, saules, hêtres, etc.) (Caillas, 1974). Dans la ruche, la propolis a de multiples usages : c'est un mortier qui sert au colmatage des fissures ou interstices, à l'étanchéité (face à l'humidité et au développement des moisissures) et à la protection de la colonie par la réduction de l'entrée de la ruche. En effet, l'ouverture à l'entrée de la ruche est constamment remodelée afin d'ajuster ses dimensions et son orientation aux conditions climatiques. Ce passage constitue par la même occasion une sorte de "sas de décontamination" où chaque abeille rentrante et sortante devra se poser, d'où le nom de propolis qui vient du grec ancien pro pour "devant, à l'entrée de" et polis pour "communauté". La propolis est aussi une véritable arme chimique contre les microorganismes et sert à momifier les animaux intrus et morts (rats et souris par exemple) trop gros pour être évacués par les abeilles, évitant ainsi leur décomposition. Elle est généralement constituée d'environ 50 % de résines (contenant les composés polyphénoliques), 30 % de cires et d'acides gras, 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières organiques et minérales diverses. Mais la composition de la propolis est très variable car elle dépend de la végétation (Tosi et al., 2006)

Bien que sa composition soit variable, la propolis est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle, car elle présente de nombreuses activités biologiques et pharmacologiques telles que des activités anti-oxydante, antifongique, antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire ou encore anti-tumorale. C'est une matière première

La propolis est très étudiée et très utilisée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Elle est très utilisée par les consommateurs comme des aliments sains, naturels, diététiques et stimulants pour l'organisme et ses défenses immunitaires. Elle est utilisée dans l'api thérapie pour traiter de nombreuses maladies et également dans l'industrie alimentaire en tant qu'additif à des fins diverses, la cosmétologie et pour de nombreux objectifs (Pereira et al., 2002).

Peu d'études ont élucidé le pouvoir antimicrobien et la valeur nutritionnelle des propolis récoltées dans différentes régions Algériennes. C'est ce qui nous a incités, à travers ce travail, à évaluer la qualité et la quantité des métabolites secondaires plus particulièrement les polyphénols, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne, à partir d'extraits éthanoliques des propolis.

récoltées dans trois régions différentes : Larbaa, les Eucalyptus et Bouinam . En plus déterminer la valeur nutritionnelle (dosage de quelques macronutriments et quelques micronutriments) dans les extraits de propolis des trois régions

Notre thèse est structurée de façon classique en trois chapitres. Le premier chapitre portant sur une synthèse des données relatives à notre thématique. Le second chapitre décrit les démarches méthodologiques, en abordant le screening photochimique, le dosage des métabolites secondaires (les poly phénols et les flavonoïdes) des extraits éthanoliques des propolis, l'évaluation de leur activité biologique (activité antioxydante et activité antibactérienne) et déterminer la valeur nutritionnelle des propolis issus des trois différentes régions algériennes. Dans le troisième chapitre, la discussion des résultats obtenus est rapportée.

Enfin, une conclusion relatant l'essentielle des résultats, accompagnée de perspectives concluant notre manuscrit.

Partie bibliographie

Chapitre I : La propolis

I.1. L'apiculture :

L'apiculture est pratiquée depuis la plus haute antiquité connaît ces derniers temps un développement important dans notre pays. C'est un art autant qu'une science d'élevage et des soins à donner aux abeilles en vue d'obtenir de leur travail dirigé, le miel, la cire, le pollen, la propolis et la gelée royale (**Bruneau, E. 2004**).

Les produits apicoles commercialisés sont le miel, la cire, le pollen, la propolis et la gelée royale. Cette activité d'appoint contribue au développement de l'élevage et à la protection de l'environnement (**EMILLIE FREDOT. 2009**).

I.1.1. L'abeille :

I.1.1.1. Définition :

Le mot « abeille » vient du nom latin *Apis* qui signifie la « mouche à miel », elle fait partie des insectes sociaux. Il existe plus de 20000 espèces d'abeilles qui sont d'un intérêt majeur pour la pollinisation, ainsi que dans la survie, la dissémination et l'évolution de 80% de plantes à fleurs (**Ravazzi, G., 2003**).

Apis mellifera, ou abeille mellifique, est une espèce dont les diverses races sont cultivées pour produire du miel, du pollen, de la gelée royale, de la propolis, de la cire et dans certains cas, du venin. Parmi ces différentes races, la plus productive et la plus appréciée est sans aucun doute la *ligustica*, connue dans le monde entier sous le nom d'abeille italienne. Du point de vue morphologique, le corps de l'abeille se divise en trois parties : tête, thorax et, Abdomen. (**Pereira et al.2002**). (**Figure 1**).

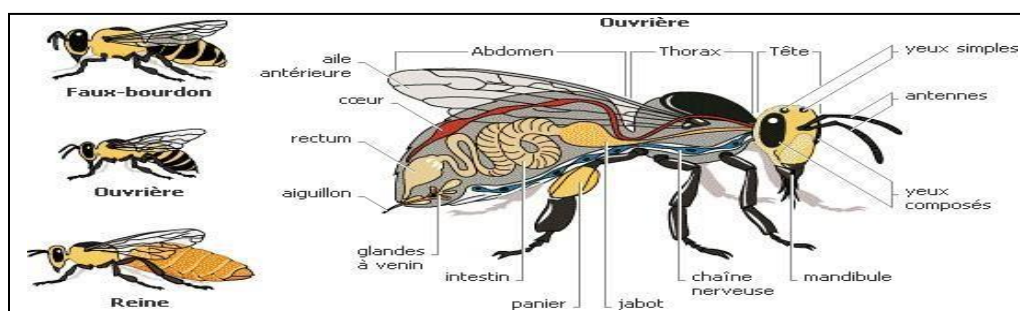


Figure 1 : Morphologie de l'abeille (Codex Stan, 1981).

I.1.1.2. Organisation sociale des abeilles :

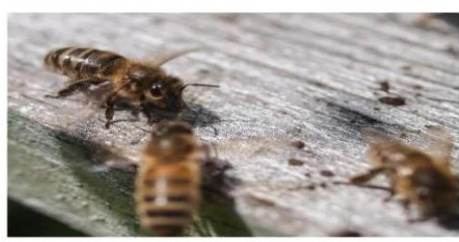
La colonie d'abeille est constituée d'une reine, des ouvrières et des faux bourdons. Fort différents sur le plan morphologique comme dans leur espérance de vie, les membres de chaque caste assurent une tâche particulière. Au sein de la ruche, aucun individu ne peut vivre seul (**Montenegro, Get al. 2003**).



La Reine

Photographie Potier Florence

C'est la mère de toutes les abeilles. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, elle ne dirige en rien la ruche. Son rôle consiste à pondre sans arrêt matin et soir, jusqu'à la fin de sa vie. Cependant, un autre rôle important de la reine est de sécréter sur son abdomen une phéromone ; celle-ci circule parmi toutes les abeilles de la colonie par trophallaxie. La Reine pond entre 500 et 2 000 œufs par jour en fonction de son âge, race et la qualité de la miellée. Elle vit jusqu'à 5 ans et se fait féconder une fois dans sa vie (**Montenegro, G et al. 2004**).



Les ouvrières

Photographie Potier Florence

Les ouvrières peuvent se consacrer à toutes les tâches nécessaires au fonctionnement de la colonie, du soin au couvain à celui de la reine mais aussi au butinage ou à la défense du nid. Les ouvrières accomplissent toutes les tâches simultanément, mais chaque ouvrière à un temps donné est spécialisée dans une tâche (**Montenegro, G et al. 2004**).



Les mâles

Photographie Potier Florence

Encore appelés faux-bourdons, sont obtenus à partir d'ovules non fécondés. Ils sont nourris par les ouvrières et ne s'approvisionnent pas directement sur les fleurs.

I.1.2. Les produits de la ruche :

Les différents produits de la ruche sont le pollen, la propolis, le miel, la gelée royale, le venin et la cire.

A. Le pollen : Le pollen d'abeille, communément appelé «poussière vivifiante», résulte de l'agglutination de pollens de fleurs avec du nectar et des substances salivaires des abeilles et sert de nourriture à tous les stades de développement de la ruche (**Almeida-Muradian et al., 2005**). La collecte de ce produit naturel est un développement relativement récent, qui dépend principalement du concept de base de racler le pollen des pattes des abeilles lorsqu'elles pénètrent dans la ruche (**Feás et al., 2012**).

B. La propolis : Le terme propolis vient de grec : propolis qui signifie « devant la ville » (**Ravazzi, 2003**). La propolis est un produit à base de résines provenant de germes résineux et d'exsudats de certaines espèces d'abeilles de l'espèce *Apis mellifera*. Lorsque les abeilles récoltent la propolis, elles mélangent la substance résineuse recueillie des plantes avec l'enzyme 13-glucosidase de leur salive. L'hydrolyse des flavonoïdes glucosylés, en provenance des flavonoïdes aglycones (**Pereira et al., 2002**). La couleur de propolis est variable selon la source florale et l'âge de la colonie (**Marcucci, 1995; Sforcin, 2007**). Elle est généralement de couleur brune à rougeâtre, voire noir (**Darrigol, 1979; Cousin, 2010**).

C. Le miel : Le miel est un produit naturel fabriqué par les abeilles *Apis mellifera* à partir du nectar des plantes mellifères, qui est transformé et modifié. Par la suite, il est stocké dans des ruches pour une utilisation ultérieure, par exemple pour l'alimentation (**Codex Stan, 1981**). Le miel hérite de tous de ses propriétés à partir des plantes ; par conséquent, ses propriétés biologiques sont liées aux espèces végétales qui ont produit le nectar (**Montenegro et al., 2003, 2004**).

D. La cire : La cire est le matériau utilisé par les abeilles pour construire leur nid. Elle sert également à operculer des alvéoles (contenant par exemple des larves ou du miel).

Les abeilles construisent des rayons du haut vers le bas. Pour se faire, elles se suspendent et forment une chaîne d'abeilles. Pour rappel, la cire est produite au niveau des glandes cirières des jeunes ouvrières, sous forme d'écailles transparentes de 1,5 mm de long sur 1 mm de large environ (**Jean-Prost, 2005**). Lorsqu'une abeille a produit une écaille, elle remonte sur le lieu de la construction pour y ajouter sa cire (**Bradbear, 2010**). La cire a au départ une couleur blanchâtre légèrement translucide, et prend une

couleur jaunâtre après avoir été malaxée par l'abeille (**Cousin, 2010**). Elle se compose d'ester 71%, acides libres 40%, sucre 12%, eau 3%, divers autres éléments (**Kameda et Tamada, 2009**).

E. La gelée royale : C'est une substance blanchâtre à jaune, gélatineuse, crémeuse, et très sucrée (**Lefief-Delcourt, 2010**), sécrétée par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des jeunes abeilles nourrices, au stade où ces glandes sont les plus développées. Elle est fabriquée à partir des protéines et des nutriments du pollen qu'elles ont ingérées (**Gharbi, 2011**). C'est la substance centrale de la ruche : elle assure son existence et son fonctionnement. En effet, elle est la nourriture unique et exclusive de toutes les larves pendant leurs trois premiers jours de vie puis de la reine pendant toute son existence (**Rossant et Desmoulière, 2011**). Elle se compose d'eau 60-70%, Lipide 18% (surtout des acides gras), glucides 11%, protéines 2%, vitamines ; des hormones ; des enzymes, et des minéraux (**Wytrychowski et al, 2013**).

F. Le venin : C'est un produit mineur de la ruche. En effet, il faut environ 10 000 abeilles pour récolter une gramme de venin (**Bradbear, 2010**). Il est produit au niveau de la glande acide de l'appareil vulnérant. La glande alcaline jouera un rôle dans la production de venin (**Jean-Prost, 2005**). C'est un liquide incolore, à forte odeur amère, qui rend les abeilles agressives. Il est utilisé par l'homme pour ses propriétés thérapeutiques, notamment contre les rhumatismes (**Bruneau, 2004**).

I.3. Historique :

Anciennement, la propolis était beaucoup moins connue que le miel, mais ses propriétés médicinales étaient déjà mises à profit vraisemblablement plusieurs millénaires avant notre ère.

Les premières traces de la propolis remontent à l'Égypte antique. Des recherches poussées ont permis aux égyptologues de découvrir les traces de propolis. Les textes hébreux la nommaient « tzori » et ses propriétés thérapeutiques sont décrites dans l'Ancien Testament, (**Krell, 1996, Bogdanov et al. 2006**).

Le mot propolis est d'origine grecque, il signifie « pro » : devant, et « polis » : cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche « Devant cité ». Cette résine nommée propolis est utilisée depuis les temps les plus reculés grâce à ces propriétés antibactériennes, immunostimulantes et cicatrisantes (**Nowotnick, 1997**), dans la médecine traditionnelle populaire, dans de nombreuses régions du monde (**Sforcin et al. 2000, Nolkemper et al. 2009**).

A Rome, au cours du 1^{er} siècle avant J.C, la propolis a été très recherchée sur la voie sacrée ou elle

se vendait plus cher que le miel. Chaque légionnaire romain en possédait, une petite quantité sur lui au moment des campagnes militaires (**Marchenay, 1977**). Elle a été réputée pour réduire les œdèmes, apaiser les douleurs nerveuses et guérissait les plaies cutanées même les abcès (**Ransome, 1937**).

Au II^{ème} siècle, c'est au tour de médecin Galien d'en faire mention dans ses traités. Au XI^{ème} siècle, le philosophe et médecin Iranien **Abu Ali Iben Sina** connu sous le nom d'Avicenne, note à son propos « la propolis a la qualité de faire éliminer les pointes de flèches et les épines, nettoie facilement et amollit fortement » (**Debuyser, 1984**).

En raison des résines végétales qu'elle renferme, elle est considérée depuis longtemps dans l'herboristerie traditionnelle comme un remède utile pour combattre les infections de toutes sortes, tant par voie interne que par voie externe. (**Pierre Le François et Françoise Ruby, 2010**). Plus tard, les perses, les Incas l'ont utilisé (**Donadieu, 1992**).

En France, ce n'est qu'au début de XVIII^{ème} siècle que le terme de propolis apparaît dans les écrits d'Amboise (chirurgien d'Henri II, de François 1^{er} de Charles IX ainsi que d'Henri III). A la fin du XIX^{ème} siècle la propolis connut un regain de popularité lorsque les médecins de l'armée anglaise l'employèrent pour désinfecter les blessures et faciliter leur cicatrisation. Durant la guerre des Boers en Afrique du Sud. (**Debuyser, 1984, Donadieu, 1992, Pierre Le François et Françoise Ruby, 2010**).

A la fin de XXI^{ème} siècle, un important marché de propolis existe en Russie et en Allemagne, c'était un remède populaire qui prétendait soigner tous les maux. On l'employait surtout en usage externe comme anti-infectieux, cicatrisant, adoucissant et anti-inflammatoire sous forme d'onguent d'emplâtre, de lotion et de fumigation (**Debuyser, 1984**).

Lors de la dernière guerre mondiale, la propolis a été expérimentée dans des cliniques soviétiques, son application est très intéressante dans la médecine vétérinaire empirique pour le traitement des hémorragies et des plaies de toute nature (**Caillas, 1974**).

I.4. Définition et étymologie :

La propolis, qu'on appelle aussi la colle d'abeille, est le nom générique d'une substance naturelle, résineuse, fortement adhésive, collectés par les abeilles *Apis mellifera L*, à partir de bourgeons et feuilles d'arbres et des plantes variées telles que les peupliers, bouleaux, saules, conifères, prunier et jamais sur le marron d'Inde. (**Bankova et al. 2000, Fenge et al. 2008, Nolkemper et al. 2009**) ; mélangé avec du pollen ainsi que des enzymes sécrétées par les abeilles (**Marcucci 1995**).

Les abeilles lui ajoutent certaines salives en la transformant en un mastic pour pouvoir enduire l'entrée de la ruche et les cadres qu'il n'est pas de courant d'air à l'intérieure de leur demeure. D'autre part

une fine couche pelliculaire est déposée aussi dans les alvéoles où les reines pondront les œufs pour désinfecter qu'il n'y ait pas de maladie nommée *Bacillus larve*. C'est ainsi que la colonie est protégée par un produit antibactérien et antifongique (**Mlagan et Sulimanovic, 1982**).

I.5. L'origine de la propolis :

Les apiculteurs se sont aperçus que les abeilles récoltaient des bourgeons de divers arbres. La propolis a une double origine :

A. Origine interne :

D'après **Kustenmacher (cité par Ferhoum, 2010)**, la propolis serait un résineux provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen dit le gésier à pollen, régurgité et craché par l'abeille qui l'utilise dans la ruche comme ciment, vernis. Toutes les cellules de la ruche, et notamment celles qui sont nouvellement construites, sont en quelque sorte imprégnées avec cette propolis interne avant que la reine y pond. La plus grande quantité de propolis produite par les abeilles aurait cette origine, elle est assez facile à reconnaître au microscope grâce à des grains de pollen qu'elle contient.

B. Origine externe :

Collectée par les abeilles de différentes plantes, elle est utilisée à des fins moins importantes telles que l'embaument de prédateurs.

Les abeilles récoltent une résine (**Figure 2**) présente sur les bourgeons, jeunes rameaux, blessures de certains arbres et arbustes prévue pour les protéger contre les attaques des micro-organismes mais aussi des insectes (un effet répulsif). En mélangeant cette résine à de la cire et à des enzymes sécrétées par leur système glandulaire, elles obtiennent une sorte de glu que l'on nomme : propolis. Les abeilles récoltent cette résine quand la température est voisine de 18–20 °C, la modifient avant de la déposer dans la ruche pour colmater les trous, pour en assurer une parfaite étanchéité associée à une excellente asepsie. Il est vrai qu'elle peut avoir la première origine mais il est bien connu de tous les praticiens que les ruches situées dans les bois ou les forêts proposent beaucoup plus que celles situées en plaine (**Caillas, 1974**).



Figure 2 : Résine du pin (Meanos, 2004).

I.6. L'origine botanique de la propolis :

La propolis est un complexe d'une série de substances résineuses gommeuses. Elle est recueillie principalement par les abeilles à partir de plantes, arbres, de bourgeons d'arbres (**Les produits de la ruche. 2012, Journée de NAMUR. 2016**).

Cependant la composition chimique de la propolis varie suivant la source végétale, c'est pour cette raison plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'origine botanique de la propolis, en se basant sur leurs observations et dans certains cas en se référant à des connaissances chimiques faibles qui comportent des comparaisons entre échantillons de propolis et matériel végétal (**Valcic et al. 1999**).

Après plusieurs études (**Bankova et al. 2000**), a établi une liste des plantes provenant de deux zones différentes tempérées et tropicales suspectées la source de la propolis. Plusieurs études ont démontré que dans les zones tempérées : en Europe, Afrique du Nord, Asie et en Amérique du Nord, la source principale de la propolis est le peuplier (*populus. sp*) avec toutes ses espèces (**Francisco A Tomas-Barberan et al 1993**). (**Tableau 1**). Dans les zones tropicales où le peuplier est inexistant, les abeilles cherchent une autre source de propolis. Chaque région et chaque colonie à une plante préférée. Elle peut provenir d'autres espèces comme : aroucacia, vernomia, diclenia, hyptis et eucalyptus. (**Tableau 2**).

Tableau N°1 : Propolis des zones tempérée.

Regions géographiques	Sources végétales	Reference
Méditerranéen Algérie	Populus spp.cistus spp.	Popova et al, 2010.
Suisse	P.tremula	Bankova et al, 1987.
Malte	Ferula spp. Probablement <i>Ferula communis</i>	Popova et al, 2010.
Turquie	Populus spp. Eucalyptus spp etCastanea sativa	Silici et al., 2007.
Grèce	Probablement Conifer spp	Popova et al 2010.
Europ, Amérique du nord, Nouvelle-Zélande	Populus spp, plus principalement P.nigra	Bankova et al, 2000.
Russie	Betulaspp,plus spécifiquement C.rosea et C.minor	Bankova et al, 2000.
Oman	Azadirachtaindica,acaciaspp.et Mangiferaindica	Popova et al 2010.
Nigeria Kenya	Probablement M.schweinfurthii	Zhang et al, 2014.

Tableau N°2 : Propolis des zones tropicales

Region geographies	Sources vegetables	Reference
USA (HawaiianIslands)	Plumeria (<i>Plumeria acuminata</i> , <i>Plumeria acutifolia</i>)	Marcucci, 1995.
Venezuela	Clusia (<i>Clusia minor</i> et <i>Clusia major</i>)	Marcucci, 1995.
Ustralia	Xanthorrhoea (<i>Xanthorrhoeasp</i>)	Burdock 1998.
Brazil	Romarin des champs (<i>Baccharisdracunculifolia</i>), Peuplier (<i>Populus sp</i>),	Silici et al., 2007.
Region Equatorial	Clusia(<i>Clusia sp</i>), <i>Delchampia sp</i>	Marcucci, 1995 Kumazawa et al., 2004.

C. L'origine de la propolis Algérienne :

Selon la flore botanique disponible en Algérie, on peut déduire que notre propolis est d'origine soit du pin (*Pinus sp*) qui occupe les zones semi arides, le chêne (chêne liège et chêne zeen) qu'on trouve au nord-est du pays, châtaignier, Cyprès (*Cupressussp*), casuarina, et le peuplier (*Populus sp*).

D'après une étude faite sur la propolis algérienne, récoltée dans quatre régions (Tlemcen, Guelma, M'sila et Tzi-Ouzou) la majorité des échantillons analysés échantillons analysés ont comme source principale le Peuplier (*Populus nigra*) avec la participation d'autres espèces (**Moudir, 2004**).

I.7. Récolte de la propolis :

I.7.1. Récolte de la propolis par les abeilles :

La fabrication de la propolis se fait à la base par les résines récoltées, ces taches sont assurées par un nombre restreint de au sein d'une colonie d'abeilles, puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail (**Figure 3**). (**Debuyser, 1984**).

A. Procédés de récolte :

La récolte de la propolis par les abeilles s'effectue suivant quatre étapes :

- A l'aide de ses antennes, l'ouvrière butineuse repère la source de résines, puis avec ses mandibules elle en détache un fragment en s'aidant parfois de pattes antérieures.
- Le morceau est modelé par les mandibules et pris avec les pattes antérieures, tout en mélangeant à d'autres substances de leurs propres sécrétions à fin de fabriquer de la propolis.
- Celui-ci est alors transféré aux pattes du milieu.
- Par un mouvement rapide la propolis est finalement déposée dans la corbeille (cornicules) des pattes postérieures, ou elle est transportée jusqu'à la ruche (**Debuyser, 1984, Philippe, 1994**).

B. Conditions de récolte par l'abeille :

Cette récolte, qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs, (**Debuyser, 1984, Donadieu, 1992**).

- **Facteurs saisonniers** : la récolte a lieu, selon les cas, soit en début de saison (c'est à dire au printemps) soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage). De plus il faut noter, que c'est au moment où la Miellée de nectar est la plus abondante, que la récolte de la propolis est la moins importante, les abeilles semblent alors y consacrer moins de temps et moins d'efforts (**Lavie, 1975**).
- **Facteurs géographiques** : il n'a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propolisent plus que les ruches de plaines (**Hegazi, 1997**).
- **Facteurs climatiques (la température)**: les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.
- **Facteurs liés à la race d'abeille** : il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) (*Apis mellifica caucasia*) propolisent,

en général, d'avantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises. Selon **Chauvin (1968)**, l'abeille punique et tellienne (Algérienne) (*Apis mellifica intermissa*) propolis également beaucoup. Certaines races utilisent peu de propolis, c'est le cas de l'abeille (*Apis mellifica lamarcki*), elle n'emploie pas de propolis.

➤ **L'Age de l'abeille** : il semble que ce soient les abeilles les plus âgées donc les plus expérimentées qui récoltent la propolis, l'étude histologique montre que leurs glandes cirières sont totalement atrophiées ; l'âge minimal est donc dix-huit jours.

I.7.2. Récolte par l'homme :

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses :

A. Technique traditionnelle :

Par raclage et grattage des cadres (**Figure 3**) et des parois de la ruche, de préférence par température assez basse, car la propolis est alors dure et friable, se détachant mieux de son support. (**Debuyser, 1983**).



Récolte de la propolis par l'abeille (**Barbarić, M et al 2011**).



Récolte de propolis par grattage du cadre (**originale 2021**)



Figure 3 : Récolte de la propolis par l'abeille et par l'homme.

B. Technique biotechnologique :

Par l'utilisation de différents dispositifs (grille moulée en matière plastique souple, en acier inoxydable, en bois ou textile synthétique), qui est posé sur les rayons de la ruche et dont les abeilles s'empressent d'obturer les orifices avec la propolis, cette utilisation permet une récolte ponctuelle durant les périodes de grande production et en dehors des périodes de traitement des ruches. La quantité récoltée par l'abeille est très variable en fonction des abeilles et de l'environnement ; elle se situe généralement entre 100 et 300 gramme par an et par ruche (Caillas 1974, Debuyser, 1983). La récolte est favorisée si on place la ruche en courant d'air, car les abeilles utilisent cette propolis pour lutter contre ces courants d'air.

La grille en bois, principalement utilisée en Asie, permet un grattage immédiat des barreaux. (Debuyser, 1983).

L'utilisation de grilles spécifiques qui se placent sur la tête des cadres sans isolant par-dessus peut améliorer la qualité du produit. (Debuyser, 1983).

I.8. Conservation de propolis :

La propolis est un produit facile à conserver, quel que soit la forme sous laquelle elle se présente. Il est toutefois préférable de la conserver dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur. Pour bénéficier de toutes ses propriétés, il est recommandé d'utiliser la propolis aussi fraîche que possible.

Elle présente un intérêt certain sous forme lyophilisée, car ce procédé de conservation assure, pendant un temps presque illimité, le maintien de toutes ses propriétés et de la composition chimique du produit. Une première méthode de lyophilisation, brevetée aux Etats-Unis, propose une solution hydro-alcoolique de propolis évaporée sous vide à basse température.

Une seconde méthode utilisée en Roumanie, propose une préparation préliminaire d'extrait mou de propolis par dissolution d'alcool éthylique. Cet extrait mou de propolis est ensuite dissout par le biais de solvants à groupe amine (amines organiques). La solution résultante est filtrée et les résidus de cire sont éliminés par précipitation. Elle devient alors soluble à l'eau et cette solution aqueuse peut être lyophilisée sous vide et congelée (**Philippe, 1999**).

I.9. Extraction de la propolis :

L'obtention de la propolis pure nécessite trois étapes fondamentales :

- **Broyage** : la propolis brute et broyée afin d'obtenir une poudre.
- **Macération** : réalisée dans un solvant qui peut être une solution hydro alcoolique à différents pourcentages d'alcool « éthanol, méthanol » (**Monti Met al 1983, Cirasino L et al 1987**) ; des extractions aqueuses (**Huang S et al 2014**). des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle) (**Gavanji S 2017**) ou encore des extractions par de l'huile de colza (**Dos Santos Pereira A et al 2003**). D'une façon assez générale, les macérations alcooliques sont de loin les méthodes d'extractions les plus répandues. Les durées et les températures d'extraction sont assez variables selon la nature de solvant d'extraction
- **Séchage de l'extrait** : différents traitements peuvent être appliqués à la propolis, dans le but d'isoler et garder les éléments solubles de celle-ci, aux propriétés pharmacologiques intéressantes. Le traitement le plus fréquemment employé est la filtration sur papier suivie par une évaporation à sec (à l'évaporateur rotatif sous pression réduite) (**Huang S et al 2014, Abu-Mellal A et al 2012**) mais ces deux opérations sont parfois précédées d'un refroidissement (à -18°C au congélateur) afin d'éliminer les cires (**Gavanji S 2017**). Parfois, la centrifugation remplace ou précède la filtration (**Huang W Y 2010, Ghedia K. 2005**).

I.10. Aspects macroscopiques et microscopiques :

- La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable en fonction de la température. Dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 25 à

45 °C et collante ou gluante en dessus, jusqu'à fondre vers 60 – 70°C en moyenne vers 65 à 82 °C. Le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C et au-delà (**Lavie 1975, Krell 1996**).

➤ Chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en 2 parties bien distinctes :

- L'une visqueuse qui tombe au fond.
- L'autre liquide (cire de propolis) surnage à la surface (**Lavie 1975**).
- De couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.) (**Lavie 1975, Krell 1996, Evangelist-Rodrigues et al 2001**).
- De saveur souvent âcre et parfois amère (, **Metzner et al 1997, Nikolaev 2006**).
- D'odeur variable selon son origine, en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille...etc.) (**Evangelist-Rodrigues et al 2001, Metzner et al 1997**). Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques (**Nikolaev 2006**).
- La structure microscopique de la propolis est maintenant assez bien connue grâce à un important travail de **Marchenay 1978**, réalisé au microscope électronique à balayage, et portant sur des échantillons de provenance de la France entière. Les résultats montrent que l'on retrouve toujours les mêmes microstructures et en nombre très limité, pour des propolis d'origines fort différentes. Ce qui prouve, d'après cet auteur, le rôle très important des abeilles ouvrières dans la formation de la structure de ce produit.
 - La propolis est peu ou pas soluble dans l'eau. Selon (**Bankova et al 1998**) quelques composants de la propolis sont solubles dans l'eau bouillante.
 - Elle est soluble partiellement dans l'alcool (éthanol, méthanol) (**Lavie 1975**), l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, le glycol...etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (**Lavie 1975**).
 - Le pourcentage d'impureté est de 18 à 34 % (**Makashvili 1978**).
 - Le pourcentage d'humidité est de 5,07 % (**Evandro et al 2001**).

I.11. Composition chimique de la propolis :

La composition chimique de la propolis est extrêmement complexe. Elle est composée essentiellement de cire, résine et produits volatiles. La cire est secrétée par les abeilles ; Les deux autres composants proviennent des sécrétions des plantes butinées lors de la collecte de la propolis

(**Marcucci 1995**).

La composition chimique de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs. Plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont abouti aux conclusions suivantes : la composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique (**Bankova et al 2000, Negri et al 2000, Popova al 2002**), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique (**Ghisalberti 1979**). La composition chimique étant différente selon la zone géographique, les propolis des zones tropicales et tempérées présentent donc des constituants différents.

I.11.1. Composition chimique de la propolis des zones tempérées :

Dans les régions tempérées où le peuplier est considéré comme la principale source de la propolis, les constituants majeurs sont les polyphénols : flavonoïdes aglycones, acides phénoliques et leurs esters (**Kujumgiev et al 1999**).

Des études concernant la propolis d'Égypte ont identifié une nouvelle classe de composés : des esters d'acide cafeïque avec une chaîne d'alcool (dodecanol, tetradecanol, hexadecanol) (**Christov et al 1998**) ont identifié les composés suivants dans la propolis de l'Égypte : des esters d'acides phénoliques (72,7%), des acides phénoliques (1,1%), Dihydrochalcones (6,5%), Chalcones (1,7%), Flavonones (1,9%) et Tetrahydrofuranes (0,7%).

D'une manière générale la propolis purifiée est composée de 45 à 55% de résine contenant principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques ainsi que leurs esters (**Bankova et al 1982**), 25 à 35% de cire, 5% de pollen (**Metzner et al 1997**) et 5% d'autres composés organiques : minéraux: calcium, magnésium, fer, zinc, silice, potassium, phosphore, manganèse, cobalt (**Metzner et al 1997**) et vitamines: A, B₁, B₂, B₃, C, E, H et la vitamine P (**Ghisalberti 1979**).

I.11.2. Composition de la propolis algérienne :

D'après une étude réalisée dans quatre régions différentes du pays (Tlemcen, Guelma, Msila et Tizi-Ouzou), la propolis algérienne est constituée de cinq familles principales : les acides aliphatiques, les acides aromatiques, les esters, les flavonoïdes et les terpènes. (**Tableau 3**).

Tableau N°3 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne (**Moudir, 2004**)

La Famille	Tlemcen	Guelma	Msila	Tizi-Ouzou
Acides aliphatiques	2,80	4,90	4,20	4,30

Acides aromatiques	3,70	3,60	2,70	8,80
Esters	17,20	9,00	9,80	2,60
Flavonoïdes	42,30	37,40	23,10	3,90
Terpènes	6,60	19,90	26,80	12,60

D'après les études déjà réalisées, on peut classer les composants de la propolis dans les groupes suivants : Les flavonoïdes ; les acides aromatiques ; les acides aliphatiques, les esters aromatiques, les sucres et les autres composés.

I.11.3. Les éléments minéraux et les vitamines de la propolis :

L'étude de la propolis montre que le taux des cendres est compris entre 1,2 à 4,5% de poids frais de la propolis brute (**Tosi et al. 2006**). Cette dernière est l'un des produits naturels les plus riches en éléments minéraux tels que le magnésium, l'iode, le sodium, le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer essentiellement le potassium et le calcium. En général, la propolis ne constitue pas une source importante de vitamines. La fraction vitaminique de la propolis d'abeille se caractérise par des teneurs appréciables en vitamine.

I.12. Toxicité :

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares. **Ghisalberti** signale qu'elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. (**Avrouest-Grand et al 1994**) ont reporté une DL₅₀ de 7340 mg/kg. Par contre, (**Hrytsenko et al 1977**) ont reporté une DL₅₀ de 2050 mg/kg et une DL₁₀₀ de 2750 mg/kg. Cette différence peut être expliquée par une différence au niveau de l'extraction de cette substance (choix du solvant et pourcentage utilisé). L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/J d'extrait éthanolique de propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'entraîne aucun effet nocif (**Higashi et De Castro 1995**). De plus, l'extrait alcoolique de propolis incorporé dans l'eau potable (rat et souris) et utilisé aux doses 1875 et 2470 et 4000 mg/kg/J pendant 30, 60 et 90 jours respectivement, ne montre aucun effet toxique.

I.13. Utilisation de la propolis

A. L'utilisation par les abeilles :

La propolis est utilisée par les abeilles comme :

- Un scellant pour réparer et entretenir les rayons de leurs ruches. (**Gunduz et al., 2005**).
- Un produit d'étanchéité et d'agent de stérilisation dans les nids d'abeilles. (**Garoui et al., 2011**). Grâce à ses propriétés antibiotiques elle intervient dans l'asepsie partielle dans les alvéoles (**Caillas, 1974**).
- Il sert également à boucher les trous permettant ainsi une meilleure isolation thermique (**Kalogeropoulos et al. 2009, Barbarié et al. 2011**).
- Lisser les parois internes de la barrière de la ruche (**Kalogeropoulos et al, 2009 . Barbarié et al. 2011**).
- Protéger l'entrée contre les intrus donc elle sert à édifier une véritable muraille à l'entrée de la cité d'abeilles comme son étymologie nous le rappelle (**Kalogeropoulos et al., 2009 , Barbarié et al., 2011**).
- Comme protection contre les petits rongeurs et empêche la décomposition des créatures qui ont été tués par les abeilles, après une invasion de la ruche (**Kalogeropoulos et al, 2009**).
- La propolis sert aussi à tapisser d'une fine pellicule à l'intérieur des cellules à couvain avant que la reine ne vienne y pondre (**Caillas, 1974**).
- Renforcer les minces parois des alvéoles en l'incorporant à la cire qu'elles sécrètent (**Caillas, 1974**).
- Mise à part l'usage purement mécanique de la propolis en tant que colle ou ciment, son utilisation peut avoir une base chimique qui limite l'apparition des infections (**Caillas, 1974**).

B. L'utilisation de la propolis par l'homme :

Dans la plupart des pays du monde, l'utilisation de la propolis n'est pas réglementée. Dans certains pays, par ex. l'Autriche, la France, l'Espagne, le Japon, Taiwan, la Corée, les Etats-Unis et la propolis brésilienne sont considérés comme des compléments alimentaires (**Freitas, et al, 2006**). La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

➤ **Cosmétique**

La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique. Ses effets sur la régénération et la rénovation des tissus ont été bien étudiés. Avec ses caractéristiques bactéricides et fongicides, elle offre de nombreux bénéfices dans diverses applications (**Freitas, et al, 2006**).

La propolis est utilisée comme crème ou lotions à des fins cosmétiques différentes. Son

utilisation est basée sur les effets antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires, antioxydants, épithéliaux, microcirculatoires et anesthésiques topiques. Une faible toxicité et une bonne compatibilité cutanée ont été démontrées, malgré le risque de réactions allergiques. Les effets allergisants possibles doivent être marqués sur le produit (**Freitas, et al, 2006**).

➤ **Médecine**

Les propriétés améliorant la santé de la propolis ont beaucoup en commun avec la fonction originale de la propolis en tant que «défendant de la ruche». Il est utilisé pour défendre la santé humaine contre les microbes et pour renforcer l'immunité humaine contre les intrusions et les maladies microbiennes (**Freitas, et al, 2006**).

La propolis est utilisée dans divers traitements tels que :

- Les problèmes cardio-vasculaires
- Appareil respiratoire (pour diverses infections)
- Soins dentaires
- Les ulcères
- Les infections des muqueuses et les lésions
- Le cancer

➤ **Technologie alimentaire**

Les activités anti-oxydantes, antifongiques et antibactériennes de la propolis lui offre une place de choix dans ce domaine. Les résidus des propolis semblent avoir un effet généralement bénéfique sur la santé humaine. Cependant, seulement très peu d'études ont été faites sur les effets secondaires possibles sur la plus grande consommation des propolis. D'après la littérature, certains composants identifiés dans les propolis peuvent être très préjudiciables à la santé humaine (**Freitas, et al, 2006**).

La propolis peut être utilisée comme préservatifs en matériel d'emballage de nourriture. Elle est aussi utilisée pour la prolongation de la vie d'entreposage en congélation des poissons (**Bufalo et al, 2009**) Signale qu'elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. (**Shiva et al,, 2007 ; Aagaard, K, 1947**) ont reporté une DL50 de 7340 mg/kg. Par contre, (**MUTSAERS et al ,2005 ; Aagaard, K, 1947**) ont reporté une DL50 de 2050 mg/kg et une DL100 de 2750 mg/kg. Cette différence peut être expliquée par une différence au niveau de l'extraction de cette substance.

I.14. Propriétés thérapeutiques :

La propolis possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer plusieurs propriétés biologiques de ce produit. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique. Nous ne parlerons dans notre travail que des propriétés les mieux connues et les plus souvent rencontrées.

➤ **Activité antimicrobienne :**

De nombreuses études ont démontré l'effet d'inhibition de la propolis sur les souches Gram+, Gram- (**Grange et Davey 1990, Rojas Hernandez et al 1993**) et les bactéries anaérobies (**Kedzia 1986, Boyanova et al 2006, Santos et al 2002**). Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (**Ugur et Arslan 2004**). De plus, la propolis possède des propriétés antifongiques (**Ota et al 2001, Pepeljnak et al 1982, Cizmaric et Trupl 1976, Ozcan et al 2004**), antivirales (**Amaros et al 1992, Maksimova-Todorova et al 1985, Escamu et al 1981**), anti protozoaire et antiparasitaire (**Higashi et al 1995**).

➤ **Propriétés cicatrisantes :**

La propolis possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation, et la formation du collagène (**Ghisalberti 1979**). De plus, elle répare en un temps record l'épiderme abîmé (régénération de tissu) (**Burdock 1998**).

➤ **Propriétés anesthésiques :**

La propolis est un puissant anesthésique (**Burdock 1998, Metzner et Schneidewind 1997**). Les études ont démontré que cette résine est 52 fois plus puissante que la cocaïne dans les tests sur les cornées de lapin (**Ghisalberti 1979**).

➤ **Propriétés anti oxydantes :**

L'activité antioxydant d'un composé ou d'un extrait correspond à sa capacité à diminuer ou à empêcher les réactions d'oxydation

La propolis possède une activité antioxydant démontrée lors de l'opposition à la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) ce qui préviennent les dommages des radicaux libres (**Kumazawa et al., 2004 ; Yang et al., 2011**) et la modulation de l'expression des enzymes antioxydants « catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase » (**Okutan, 2005**)

Les composés antioxydants responsables de cette activité sont principalement les vitamines E et C, les flavonoïdes et les polyphénols « le CAPE, le kaempférol mais aussi les acides cinnamiques : caféique, p-coumarique et férulique » (**Kumazawa et al., 2004**).

La propolis est aussi une substance aux propriétés :

- Anti-inflammatoire.
- Anti-tumorale.
- Anti HIV.
- Anti-muta génique.
- Anti hypertensive.
- Hypoglycémiante.

I.15. Les travaux antérieurs sur propolis :

Les études entreprises jusqu'à présent sur propolis sont basées sur des activités biologiques surtout sur des activités antimicrobiennes anti-inflammatoires et antioxydants de propolis et sur la détermination de la composition chimique des extraits de propolis à partir de la poudre ou matière sec.

Huang et al (2014) décrit que la propolis est recueillie à partir de résines végétales. À partir d'une recherche systématique dans une base de données, 241 des composés ont été identifiés dans la propolis pour la première fois entre 2000 et 2012 ; et ils appartiennent à des classes chimiques aussi diverses que les flavonoïdes, les phényl propanoïdes, les terpènes, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et leurs dérivés prénylés, montrant un modèle cohérent avec environ 300 composés précédemment rapportés. Les caractéristiques chimiques de la propolis sont liées à la diversité de la situation géographique, des sources végétales et des espèces d'abeilles.

Burdock(1998) ont étudié des propriétés biologiques et toxicité de la propolis d'abeille, l'utilisation de produits contenant de la propolis a entraîné un contact cutané étendu et elle est utilisée comme complément alimentaire. Contrairement à de nombreux remèdes « naturels », il existe une base de données substantielle sur l'activité biologique et la toxicité de la propolis indiquant qu'elle peut avoir de nombreuses propriétés antibiotiques, antifongiques, antivirales et anti tumorales, entre autres attributs. Bien que les rapports de réactions allergiques ne soient pas rares, la propolis est relativement non toxique.

S.M.Alencar et al (2007) ont étudié la Composition chimique et l'activité biologique (les activités antimicrobiennes, antioxydants et cytotoxiques) d'un nouveau type de propolis brésilienne communément appelée propolis rouge, ainsi que d'analyser sa composition chimique. L'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylocoque mutant* L'UA159 a été évalué et la fraction chloroformique (Chlo-fr) était la plus active avec une CMI inférieure allant de 25 à 50 µg/ml. La fraction hexane (H-fr), ayant la concentration la plus élevée de flavonoïdes totaux, a montré la meilleure activité séquestrant pour le radical libre DPPH. L'extrait éthanolique de propolis (EEP) a montré une activité cytotoxique pour les cellules tumorales HeLa avec un IC50 de 7,45 µg/ml. Lorsque l'EEP a été analysé par GC-MS, sept nouveaux composés ont été trouvés, dont quatre étaient des isoflavones. Les résultats ont montré que la propolis rouge contient des composés biologiquement actifs qui n'avaient jamais été signalés dans d'autres types de propolis brésilienne.

Stepanović, et al (2003) ont étudié les propriétés antimicrobiennes de l'extrait éthanolique de 13 échantillons de propolis provenant de différentes régions de Serbie contre 39 micro-organismes, et de déterminer les synergies activité entre les antimicrobiens et la propolis. L'activité antimicrobienne des échantillons de propolis a été évaluée par gélose méthode de diffusion et de dilution en gélose. L'action synergique de la propolis avec les médicaments antimicrobiens a été dosée par le disque méthode de diffusion sur gélose contenant des concentrations subinhibitrices de propolis. Le potentiel antimicrobien démontré de la propolis seule ou en association avec certains antibiotiques.

Bankova(2005) : ont publié que la variabilité chimique de la propolis est discutée par rapport au problème de la standardisation. Plusieurs types chimiques de propolis sont formulés, en fonction de leur source végétale. Des critères fiables pour la standardisation chimique des différents types de propolis sont nécessaires, mais de tels critères généralement acceptés n'existent pas encore. Le profil chimique de la propolis « de peuplier », typique de la zone tempérée, peut être caractérisé par les paramètres suivants : teneur totale en flavones et flavonols, teneurs totales en flavanones et dihydroflavonols et teneur en composés phénoliques totaux. Ces paramètres sont mieux corrélés avec l'activité biologique et sont plus informatifs que la quantification des composants individuels. Il reste encore beaucoup de travail à faire pour parvenir à une standardisation des autres types de propolis.

Des travaux menés par **Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019)**. Ont révélé que la propolis possède une activité antimicrobienne significative contre les bactéries Gram+ positives plus que Gram-négatives.

Yusop, S et al (2019) : ont étudié les activités antioxydants, antimicrobiennes et cytotoxiques de

Sarawak T. étama propolis dans des extraits d'hexane, d'acétate d'éthyle et de méthanol.

Les résultats montrés que les trois types d'extrait de propolis de T. étama de Beladin Sarawak présentaient une activité antioxydante et une activité antimicrobienne contre les bactéries gram-positives et gram-négatives. L'extrait de méthanol a produit un taux élevé d'activité antioxydante et antimicrobienne. Tous les extraits de propolis de T. étama ont montré un faible niveau de toxicité.

Hegazi et al. (2000) : ont étudié trois échantillons de propolis provenant d'Autriche, d'Allemagne et de France par GC/MS, où onze composés étaient nouveaux pour la propolis. Les échantillons ont montré quelques similitudes dans leur composition qualitative. Phényléthyl-Zram'-caféate, benzyle la férulate et la galangine étaient prédominants dans la propolis allemande. Le caféate de benzyle était prédominant dans l'échantillon français. Pinoembrine était prédominante dans la propolis française et autrichienne et l'acide rra"sp-coumarique était prédominant dans tous les échantillons. D'un autre côté l'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* et *Candida albicans* a été évaluée. La propolis allemande a montré la plus haute activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Alors que la propolis autrichienne a l'activité la plus élevée contre *Candida albicans*. La propolis française était efficace contre tous les pathogènes mais moins de propolis allemande et autrichienne.

De Araújo, et al(2015): ont incorporé l'extrait de propolis éthanolique (EPE) dans des films d'amidon de manioc, et des caractérisations concernant leur microstructure, leurs propriétés mécaniques, leur perméabilité à la vapeur d'eau (WVP), leur cinétique de sorption d'humidité ainsi que leurs capacités antimicrobiennes et antioxydantes ont été réalisées. Les résultats ont montré que la résistance à la traction n'était pas affectée ($P > 0,05$) par la présence d'EPE, mais que le module de Young a diminué d'environ 50 % par rapport aux films témoins, probablement à cause de l'effet plastifiant de l'EPE. Lorsque 1 % d'EPE a été utilisé, des changements dans les propriétés de sorption d'humidité ont été détectés par un caractère légèrement hydrophobe au niveau des films WVP. Une fois extrait des films, la propolis a conservé son activité antioxydante. Les films présentaient une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* même à de faibles concentrations d'EPE (0,5%) principalement en raison de ses composés phénoliques.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1 Lieu du stage

Dans le cadre de la valorisation et de la recherche d'éventuelles activités biologiques des de la Propolis récoltée dans trois régions d'Algérie : **Les Eucalyptus, L'Arabaa et Bouinan.**

Nous avons mené une étude expérimentale au sein du Laboratoire Baba Ali (Itelv), et Laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD (SAIDAL) durant une période s'étalant du mois d'avril jusqu'au mois de Juin 2021.

Pendant cette période nous avons réalisé :

- Analyses physicochimiques
- Analyses microbiologiques
- Dosage des poly phénols et des flavonoïdes
- Activité antioxydant
- Et analyse microbiologique
- Et analyse nutritionnelle de la propolis (analyse des micronutriments et des macronutriments) (Malheureusement cette partie on n'a pas pu la réaliser au niveau de l'ONAB nutrition unité laboratoire d'Alger)

II.2. Matériel non biologique (voir annexe)

II.3. Matériels biologique :

Le matériel biologique est représenté par la propolis et les souches microbiennes.

Tableau 4 : Origine et date de récolte des trois échantillons de la propolis étudiée.

Echantillon	A	B	C
Wilaya	Alger	Blida	Blida
Commue	Les Eucalyptus	Arabaa	Bouinan
Date de récolte	Mois de mai 2021	Mois de juin 2021	Mois de juin 2021
Poids	25g	25g	40g
Patrimoine végétal	Eucalyptus (Eucalyptus globulus) Citronnier (<i>Citrus limon</i>) Sapinde Nulidie (Abies	Oranger (citrus sinensis) Citronnier (Citrus limon) Pamplemoussier (Citrus maxima)	Pistachier de syrie Oranger (citrus sinensis) Chêne-liège (Quercussuber L)




	numidica) Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>) Oranger (<i>Citrus sinensis</i>)	Chêne-liège (<i>Quercus suber</i> L) Pin(<i>Pinus nigra</i>)	
Propolis récolté			
Climat	Climat méditerranéen avec été chaud		
Race d'abeille	<i>Apis mellifera</i>		
Méthode de récolte	Raclage des cadres		

Tableau 5 : Souches bactérienne utilisées dans la réalisation de l'activité antimicrobienne

Souches bactériennes	Type de bactéries
Staphylococcus aureus	Gram+
Escherichia coli	Gram-
Pseudomonas aeruginosa	Gram-
Bacillus subtilis	Gram+

Ces souches proviennent du laboratoire microbiologie de baba Ali.

II.4. Méthodes :

II.4.1. Traitement de l'échantillon

a) Traitement préliminaire de la propolis :

➤ **Epuration :**

▪ La première étape est le tri des impuretés de la propolis brute à l'aide d'une loupe binoculaire, elle consiste à retirer les impuretés visibles telles que les tiges de bois, ailes et corps d'abeille, petits vers blancs secs, etc.

La propolis obtenue est conservée au froid jusqu'à leur utilisation.



Figure 4: Tri des impuretés de la propolis (originale2021)

b) **Traitement technologique de la propolis :**

➤ **Macération :**

Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Les deux échantillons de la propolis subissent une macération dans l'éthanol à **70%**. Ce solvant permet l'extraction du maximum des substances bioactives de la propolis.

Dans un erlenmeyer, **10 g** de chaque échantillon de propolis obtenue est additionné à **30 mL** de solvant (à raison de **1 g propolis/ 3ml de solvant**).

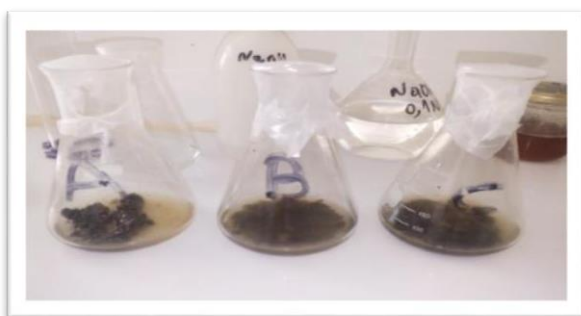


Figure 5 : Macération de la propolis dans l'éthanol (original 2021)

➤ **Filtration :**

Après une semaine sous agitation magnétique continue à température ambiante, dans un endroit sec et sombre (flacons couverts par un papier aluminium) ; la solution est filtrée à l'aide d'un papier filtre ; puis une série de dilutions décimale est réalisée.



Figure 6 : Filtration des trois échantillons (**originale2021**).

II.4.2. Analyse physico-chimique :

II.4.2.1. Les méthodes physiques

a). Détermination de taux des pertes pendant le séchage (NF T 60-305, Juin1976)

◆ **Principe :**

Le taux des pertes pendant le séchage, c'est-à-dire l'eau et les matières volatiles est déterminé sur une partie aliquote de **1g** d'échantillon coupé en petits morceaux dans une Capsule en porcelaine puis séché dans une étuve réglée à une température de **103 ± 2 °C**, jusqu'à obtention d'un poids constant.

◆ **Mode opératoire :**

- Sécher des capsules vides à l'étuve durant **15 mn** à **103 ± 2 °C** ;
- Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Peser dans chaque capsule **1 g** d'échantillon préalablement couper en petit morceaux et les placer dans l'étuve réglée à **103 ± 2 °C** pendant **3 heures** ;
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur et après refroidissement les peser.
- L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à **30 min**) pour éviter la caramélisation.

◆ **Expression des résultats :**

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{(M1 - M2)}{P} \times 100$$

Soit :

H % : Humidité + Matières volatiles.

1 M : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en g.

2 M : Masse de l'ensemble après séchage en g.

P : Masse de la prise d'essai en g.

$$\text{Matières sèches} = 100 - H\%$$

b). Détermination de la teneur en cendres (NF V 05-113, 1972)

◆ **Principe :**

La propolis brute coupée en petits morceaux puis calcinée à **550 °C** dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant.

◆ **Mode opératoire :**

- Dans des capsules en porcelaine, on pèse **2 g** de propolis coupée en petits morceaux.
- On place les capsules dans un four à moufle réglé à **550 ± 15 °C** pendant **5 heures** jusqu'à obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre.
- On retire les capsules du four, on les met dans le dessiccateur pour se refroidir et puis, on les pèse.

◆ **Expression des résultats :**

$$\text{MO \%} = \left(\frac{M1 - M2}{P} \right) \times 100$$

Soit :

MO % : Matière organique.

M1 : Masse des capsules + prise d'essai.

M2 : Masse des capsules + cendres.

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en cendres (*Cd*) est calculée comme suit :

$$Cd = 100 - MO \%$$

II.4.2.2. Les méthodes chimiques

a). Détermination du pH (NF V 05-108, 1970)

◆ Principe

Détermination en unité de pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse de la propolis découpée en petits morceaux.

◆ Mode opératoire :

- Couper en petits morceaux une partie de l'échantillon de la propolis.
- Placer le produit dans un bécher et y ajouter trois fois son volume d'eau distillée.
- Chauffer au bain-marie pendant **30 min** en remuant de temps en temps avec une baguette de verre.
- filtrer ensuite le mélange obtenu et procéder à la détermination du **pH** en prenant soins que l'électrode soit complètement immergée dans la solution.

b). Détermination de l'acidité titrable (NF V 05-101, 1974)

◆ Principe

Titration de l'acidité d'une solution aqueuse de la propolis avec une solution d'hydroxyde de sodium.

◆ Mode opératoire

- On pèse à **0,01g** près au moins **25 g** de propolis coupée en petits morceaux.

- On place l'échantillon dans une fiole conique avec **50 ml** d'eau distillée chauderécemment bouillie et refroidie, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène.
- On adapte un réfrigérant à reflux à la fiole conique puis, on chauffe le contenu au bain-marie pendant **30 mn.**
- Refroidir, transvaser quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de **250 ml** et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie, bien mélanger puis filtrer.
- On prélève à la pipette 25, 50 ou 100 ml de l'échantillon pour essai selon l'acidité présumée, et on les verse dans un bécher sous agitation.
- On titre avec une solution d'hydroxyde de sodium.
- On opère rapidement jusqu'à un pH de 7, puis lentement jusqu'à un pH de $8 \pm 0,2$.

◆ **Expression des résultats**

L'acidité titrable est exprimée selon la formule suivante :

$$A\% = \frac{250 \times V1 \times 100}{V0 \times M \times 10}$$

Soit :

M : Masse, en grammes de produit prélevé.

V0 : Volume en millilitres de la prise d'essai.

V1 : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 N utilisé.

II.5. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite en 1965 par Singleton et Rossi. D (**Li et al. 2007**)

◆ **Principe :**

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu est la plus fréquemment utilisée. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et phosphomolybdique (H3PMo 12O40), réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W8O23) et de molybdène (Mo8O23). L'intensité de cette coloration bleue est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu ayant un maximum

d'absorption à **765 nm** (Ribéreau-Gayon *et al.* 1972).

◆ **Mode opératoire :**

- **0.5 ml** de **EEP** est mélangé avec **0.5 ml** de réactif de **Folin-Ciocalteu** et **0.5 ml** de carbonate de sodium (**Na₂Co₃**) à **10 %**.
- Ensuite **5 ml d'eau** pour diluer le mélange sont ajoutés.
- L'absorbance est mesurée à **760 nm** après **1h** d'incubation à température ambiante contre un blanc préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait a été remplacé par le solvant.
- Une courbe standard est réalisée avec différentes concentration de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. Les mesures ont été faites en triple.

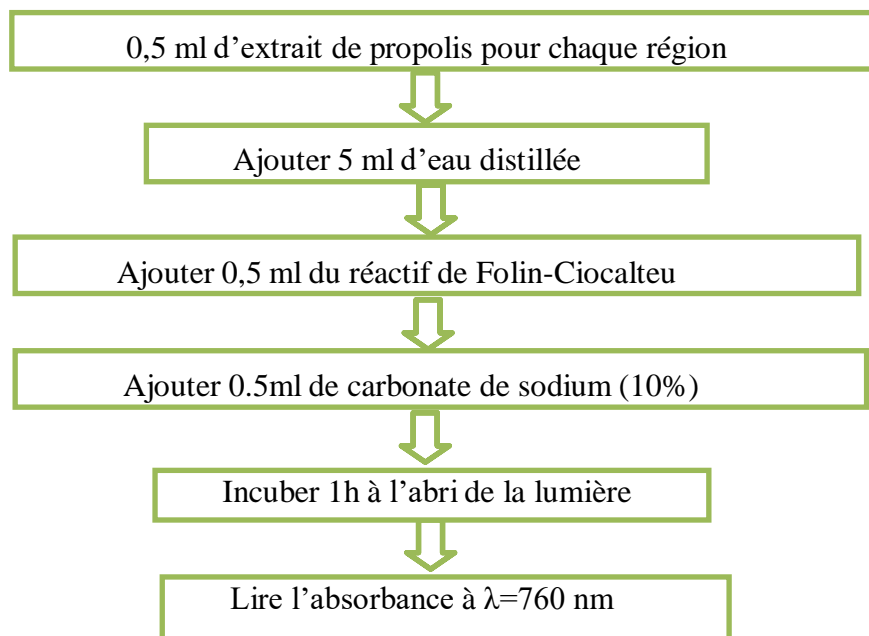


Figure 7 : Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux

◆ **Expression des résultats :**

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de propolis sont calculées en extrapolant les valeurs d'absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1 g d'extrait (mg GAE/ g) selon la formule suivante :

$$\text{Taux de PT} = (\text{CAG} / \text{Ce}) \times 1000$$

PT : Polyphénols totaux en (mg GAE/ g)

CAG : Concentration d'acide gallique (mg/ml)

Ce : Concentration d'EEP en (mg/ml)

II.6. Dosages des flavonoïdes :

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de propolis est réalisée par la méthode de (**Bahorun et al. 1996**) avec quelques modifications.

◆ Principe :

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (**Figure 8**). Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait.

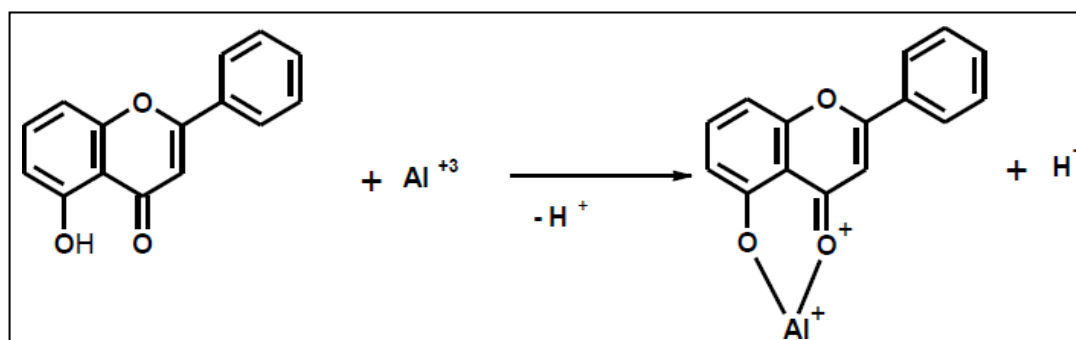


Figure 8: Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes (**Ribéreau et al. 1972**).

◆ Mode opératoire :

Au **1 ml d'EEP**, **1 ml** d'une solution méthanolique de **Al Cl₃ 2%** est ajouté, le blanc utilisé est le mélange réactionnel sans échantillon et le standard utilisé est un flavonol, la quercétine, à différentes concentrations afin d'établir la droite d'étalonnage.

Après **1h** d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à **430 nm**. Les mesures ont été faites en triple.

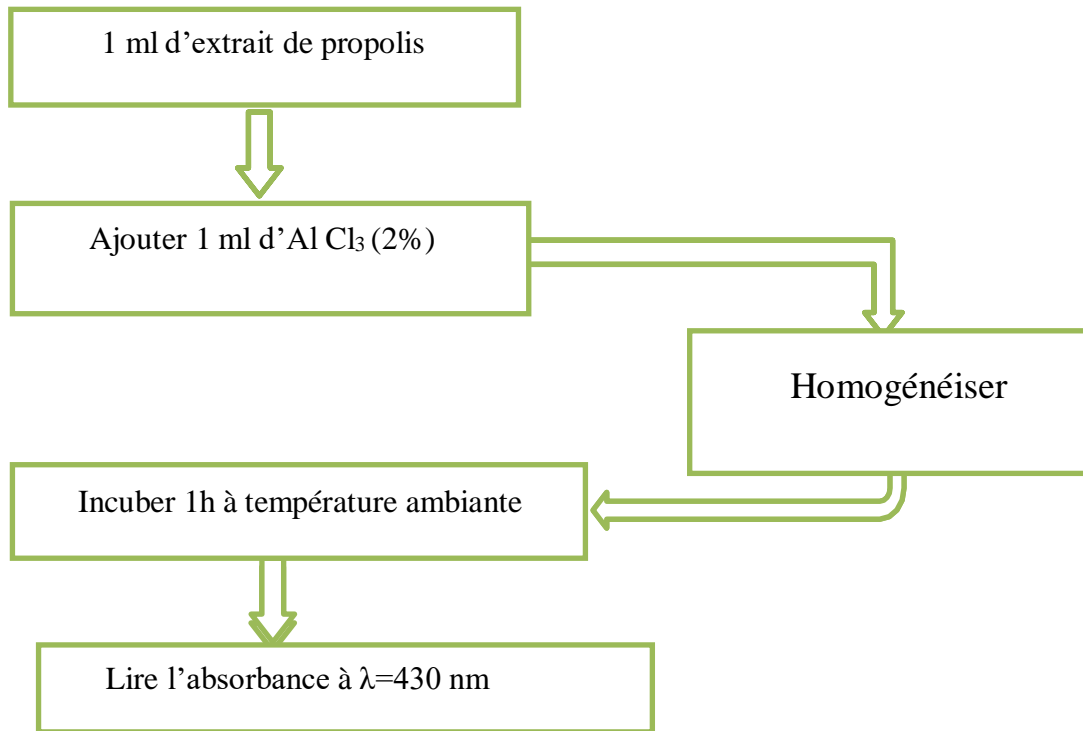


Figure 9 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes totaux.

◆ **Expression des résultats :**

La concentration des échantillons de propolis en composés flavonoïques est déterminée en extrapolant les absorbances de ceux-ci à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercitrine par gramme d'extrait (mg EQ/g) selon la formule suivante

$$\text{Taux de FT} = \text{CQ} / \text{Ce} \times 1000$$

FT : Flavonoïdes totaux en (mg EQ/g)

CQ : Concentration de quercétine (mg/ml)

Ce : Concentration d'EEP en (mg/ml)

II.7. Activité antioxydant :

L'activité antioxydant des extraits éthanoliques de la propolis est exprimée par la neutralisation des radicaux libres par la méthode colorimétrique DPPH. Le composé chimique DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (**Brand-Williams, 1995**).

◆ **Principe :**

Le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est défini comme radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption.

Il réagit avec des groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques, etc... Cette propriété est largement recommandée et utilisé dans la pratique analytique. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (1,1-diphényl-2-(2,4,6- trinitrophenyl) hydrazine (DPPH2)) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle due à la présence de groupement picarel selon la réaction suivante : (Molyneux, 2004).

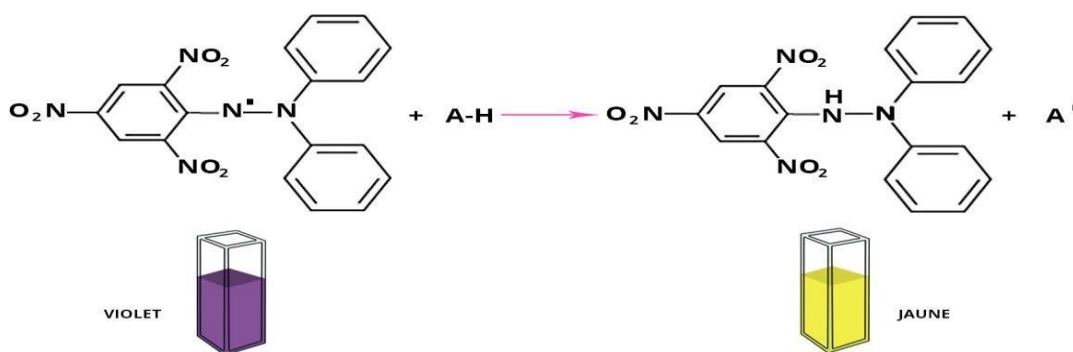


Figure 10 : Réduction du radical libre DPPH en DPPHH

◆ **Mode opératoire :**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de propolis via le test DPPH, est effectuée par la méthode de (Shi, 1991).

Une solution méthanolique de **0.02 mg/ml** de **DPPH** est mélangée avec différentes concentrations des extraits de propolis. A cet effet, **100 µl** de chaque dilution de ces extraits sont mis dans un tube à essai, et additionnés de **2 ml** de solution méthanolique de **DPPH**. Après une incubation de **30 min** à l'abri de la lumière à température ambiante, l'absorbance est lue à **517 nm** contre la solution témoin composée de **2 ml** de la solution de **DPPH** et **100 µl** de méthanol. Des antioxydants de synthèse (acide ascorbique) sont préparés dans les mêmes conditions et utilisées comme standards de contrôle qualité pour leurs effets sur le pouvoir anti-radicalaire. Les extraits ou les composés à tester ainsi que les standards sont dilués dans le méthanol absolu.

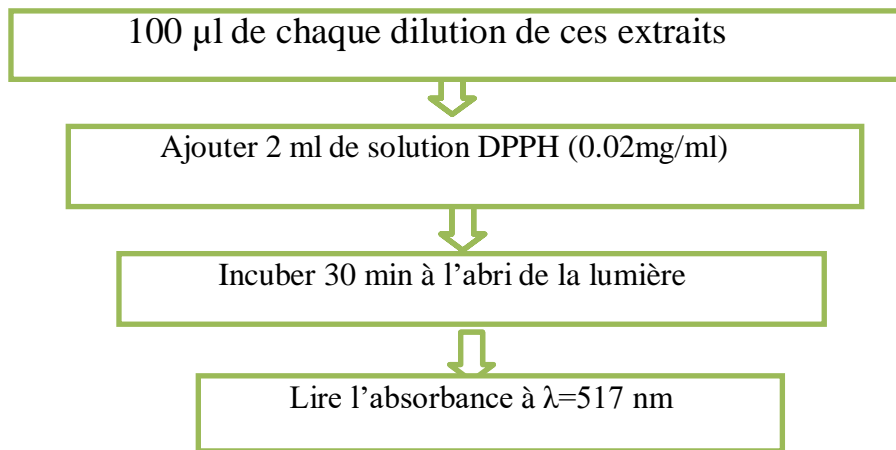


Figure 11: Les étapes de test DPPH

◆ **Expression des résultats :**

L'évaluation de l'activité antioxydant en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition de celui-ci selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = (\text{AC} - \text{AE}) / \text{AC} \times 100$$

AC : Absorbance du contrôle.

AE : Absorbance de l'échantillon.

II.8. Etude de l'activité antimicrobienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de propolis a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose (NCCLS, 2002). Nous avons choisi d'évaluer nos extraits de propolis sur un panel représentatif de bactéries Gram (-) et Gram (+). Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits de Propolis sont les suivants :

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Bacillus subtilis*

◆ **But :**

C'est une méthode quantitative, permettant de tester l'existence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour de la source à

caractère antimicrobien.

◆ **Principe :**

Elle consiste à utiliser des disques buvards ; imprégnés dans la substance à tester à une dose bien déterminée. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension des germes utilisés. Après 24 heures d'incubation, il s'établit un gradient de concentration de la substance à tester, l'interaction entre les germes et cette dernière s'exprime par une zone d'inhibition (**Amhis, 2001**). Puis on mesure les diamètres des éventuelles zones d'inhibition observées autour des disques (**M.Archambaud, 2009**). Plus le diamètre de la **ZI** est grand, plus que les souches sont sensibles à la substance. Plus qu'il est petit, plus qu'elles sont résistantes (**Faucher et all. 1997**).

◆ **Protocole expérimentale :**

Travail s'effectue dans des conditions aseptiques, à côté du bec benzène entouré du matériel stérilisé auparavant et déposé sur une paillasse bien nettoyées avec l'eau de javel.

▪ **Repiquage des souches bactériennes**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées sur milieu d'isolement par la méthode des stries étroit puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune, et des colonies isolés qui ont servi à préparer l'inoculum.

La mise en évidence de la présence ou non de la zone d'inhibition s'effectuée en 4 étapes :

La première étape : "préparation des milieux de culture"

- verser 20 ml de la gélose MH dans les boites de pétri ; de 3 à 4 mm d'épaisseur.
- Laisser solidifier avant l'emploi.

La deuxième étape : "préparation de l'inoculum"

Cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, grâce à une anse de platine stérile puis déchargées dans un tube à essai contient 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% Na Cl. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée.

La troisième étape : "ensemencement"

L'ensemencement par les suspensions bactériennes préparées est effectué par la méthode d'écouvillonnage à la surface de boîtes de pétri préalablement coulée avec la gélose de MH. À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose.

La quatrième étape : "application des disques"

- dépôt des disques imprégnés de propolis à différentes concentrations (solution mère(EEP) ; S1 et S2) ; au centre de la gélose à l'aide d'une pince permettant son adhésion sur la gélose.
- laisser diffuser pendant 30 minutes,
- les boîtes renversées sont mises dans l'incubateur à 37°C pendant 24h.

◆ Expression des résultats :

Les résultats sont interprétés par mesure à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque de la zone d'inhibition autour du disque et comparés aux limites acceptables des diamètres des zones d'inhibition.

▪ Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (Moreira et al, 2005). La sensibilité aux différents extraits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition (**Tableau 6**).

Tableau N°6: estimation de la sensibilité des souches

Diamètre (mm)	Activité antimicrobienne	Souche
D < 7	Nulle	Résistante
D [7-14]	Faible	Sensible
D [15-19]	Moyenne	Très sensible
D > 20	Forte	Extrêmement sensible

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extraction de la propolis :

Les Rendement d'extraction de propolis récoltée dans trois régions différentes Laraba, Les Eucalyptus et Bouinan sont illustrés dans le **tableau 7**.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que l'extrait de la région des Eucalyptus indique le rendement le plus élevé (30%), suivi par l'extrait de *Bouinan* (25%), puis l'extrait de Laraba qui possède le plus faible rendement soit 15%.

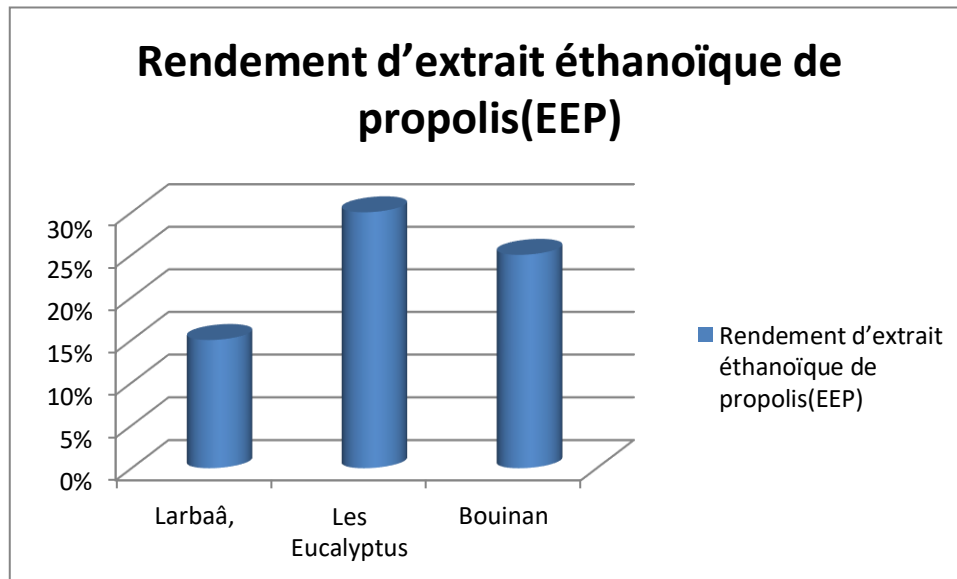


Figure 12 : Rendement d'extraction de propolis (EEP) récoltée dans trois régions différentes.

Nos résultats sont presque similaires à ceux trouvés par **(Belkhiri et Bouab ,2018)**. Ces derniers ont rapporté des taux d'extraction par l'éthanol à 96% respectivement 26% et 38% pour la wilaya d'Oum El Bouaghi et 33% pour Constantine. **(Trusheva et al.2007)** a trouvé également le même rendement d'extrait de propolis récoltée en Italie soit 55% avec l'éthanol à 70%.

Cependant les travaux de **(Rebiai et al.2013)** ont trouvé des rendements d'extraction très faibles à partir du méthanol soit 0,72% pour la propolis récoltée dans la région de Ghardaïa et 2,41% pour la propolis récoltée dans la région de Khenchla.

Selon **(Ribéreau-Gayon ,1968)**, la plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant (Ethanol, Hexane, etc.) se fait suivant le mécanisme osmotique et la sortie du soluté s'effectue par dialyse ou par diffusion. Parmi les solvants l'éthanol (70%) est le solvant le plus facilement éliminé par rapport aux autres solvants sous vide, il donne un meilleur rendement d'extraction (7 fois plus que celui d'eau) et il évite l'extraction de la cire.

De ce fait les différences des rendements d'extrait de propolis récoltée dans nos stations et dans d'autres régions pourraient être expliquées par l'utilisation des différents solvants ; des Méthodes d'extraction distincte, le PH du milieu d'extraction, la température et les origines géographiques distinctes.

III.2. Résultats d'analyses physiques

III.2.1. Pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de la propolis :

Les résultats de la teneur en pertes pendant le séchage (élimination d'humidité et de matières volatiles) sont reportés dans le **tableau 7**.

Tableau N° 7 : Les taux des pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes

Echantillon	Région	Taux des pertes pendant le séchage(%)	Matière sèche (%)
Larbaa	Montagneuse	2,98	97,02
Les Eucalyptus	Montagneuse	3,88	96,12
Bouinan	Plaine	3,5	96,5

Les résultats des analyses des échantillons de propolis de Larbaa, des Eucalyptus et de **Bouinan** donnés par le **tableau 7** ont révélé un taux faible de pertes pendant le séchage compris entre 2,98% et 3,99%, avec des taux de pourcentage de matière sèche respectifs 97,02 %, 96,12 % et 96,5%. . Donc on constate que les 03 échantillons de propolis algérienne récoltées dans 03 régions différentes sont très pauvres en eau et en matière volatiles, ce qui procure à la propolis sa structure solide et qui est en adéquation avec la nature hydrophobe de la plupart des constituants. Nos trois valeurs concordent avec ceux trouvés par (**Ferhoum ,2010**). Cette dernière a dévoilé un taux faible de perte pendant le séchage des échantillons de propolis récoltée dans les régions de Mitidja variant entre 1.26 à3.89%.Cependant les valeurs de propolis provenant des régions d'Europe de Brésil et d'Argentine (0.4 à 3%) (**Tosi et al, 2006**) sont inférieurs par rapport à nos résultats. Donc Les conditions de stockage de nos échantillons issus de trois régions différentes et les conditions climatiques peuvent influencer cette proportion.

III.2. 2. Teneur en cendre:

Le taux des cendres nous renseigne sur la quantité totale en sels minéraux présents dans un échantillon de propolis, et par déduction le taux de la matière organique présent dans le même échantillon. Les résultats obtenus sont illustrés dans **le tableau 8**.

Tableau N°8 : Taux des cendres et de la matière organique des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes

Echantillon	Région	Taux de cendre (Cd%)	Matière organique (MO%)
Larbaa	Montagneuse	3.78	96.22
Eucalyptus	Montagneuse	5.28	94.72
Bouinan	Plaine	4.89	95.11

Nous enregistrons un taux de cendres variant entre 3,78% et 5,28% dans les échantillons de propolis récoltée dans 03 régions. Ce qui conduit à déduire que la propolis est riche en matières organiques (plus de 94 %). Les taux de cendres obtenus sont en concordance avec la littérature (2 à 5%) (**Krell, 1996, Bankova et al, 1987**).

Toute fois nos Résultats sont supérieurs à ceux de la propolis récoltée dans la steppe des régions arides Soit 1.58% (**Ferhoum, 2010**). Par ailleurs, les valeurs du taux de cendre de nos trois Régions algériennes sont supérieurs à ceux des échantillons de propolis récoltée dans L'Europe, Brésil et Argentine (1,8% à 2,4%). trouvés par (**Tosi et al ,2006**).

La variation de la teneur en cendres peut s'expliquer par les matières collectées par les abeilles lors de la recherche de nourriture et qui sont principalement déterminées par le sol et le climat.

III.3. Résultats d'analyses chimiques :

III.3.1. PH :

Les résultats du pH des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes sont donnés par **le tableau 9**.

Tableau N°9 : valeur de PH des échantillons de la propolis récoltée dans trois régions différentes

Echantillon	Région	PH
Larbaa	Montagneuse	4.57
Eucalyptus	Montagneuse	5.65
Bouinan	Plaine	5.37

Les différents échantillons de propolis récoltée dans les trois régions ont montré un pH variant entre 4,57 et 5.65. Les échantillons des Eucalyptus (région Montagneuse) ont montré un pH le plus élevé soit 5.65 tandis que les échantillons de **Larbaa** présente un pH le plus faible soit de 4.57. Nos résultats sont moins acides de ceux trouvés (pH varie de 4.55 au 5.01) et (pH varie de 4.24 au 4.66) respectivement par (**Bandaoui et Belhachemi 1997**). Et (**Ferhoum, 2010**) En conséquence toutes les propolis sont de nature acide, cette acidité est due à sa composition riche en acides aromatiques (dérivés de l'acide benzoïque ; dérivés de l'acide benzaldéhyde ; dérivés de l'acide cinnamique) et acides aliphatiques.

III.3.2. Acidité titrable :

L'acidité titrable nous renseigne sur la quantité en acides organique présentent dans l'échantillon de propolis.

Les résultats du dosage de l'acidité titrable des 03 échantillons de la Propolis récoltée dans trois régions différentes sont présentés par **le tableau 10**.

Tableau N°10: acidité titrable des 03 échantillons de Propolis récoltée dans trois régions différentes.

Echantillon	PH	Acidité(%)	Région
Laraba	4.57	4.1	Montagneuse
Eucalyptus	5.65	8.9	Montagneuse
Bouinan	5.37	8.2	Plaine

Les résultats obtenus mettent en évidence les degrés d'acidité de la propolis, plus elles sont faibles plus les propolis sont acides. Nos résultats trouvés varient de 4.1 à 8.9. L'échantillon de Larbaa est plus acide puisque sa valeur trouvée (4.57) est inférieur à celles des échantillons des Eucalyptus et de Bouinan.

Nos résultats d'acidité sont inférieurs par rapport à ceux trouvés par (**Ferhoum ,2010**) (6.55à 7.59%), et par (**Bandaoui et Belhachem, 1997**) (8à8.4%).

En outre, on remarque que les résultats d'acidité des échantillons de propolis récoltée dans les 03 régions sont en corrélation étroite avec des valeurs de pH donnés par (**le tableau 9**) .En effet les

échantillons de propolis récoltée dans la région de Larbaâ sont plus acides par rapport aux échantillons de propolis récoltée dans les régions des Eucalyptus et de Bouinan puisque leur valeur de pH et d'acidité sont respectivement 4,57 et 4,1.

Donc l'acidité élevée des 03 stations surtout celle de la propolis récoltée dans la région de Larbaa est due probablement soit par l'oxydation des échantillons de propolis sous l'action de l'oxygène ou l'actions d'autres facteurs externes ou internes (température élevée, taux d'humidité, etc.) Soit par la différence de la flore botanique entre les 03 régions.

III.4. Résultats de dosage des polyphénols :

La teneur des différents extraits de propolis et pollen en polyphénols a été déterminée par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, en utilisant comme standard l'acide gallique (**Figure 1**) (**voir annexe 6**), elle est exprimée en $\mu\text{g EAG/mg d'extract}$.

Les résultats de dosage des polyphénols totaux dans les échantillons de propolis récoltée dans trois régions différentes Larbaa, Les Eucalyptus et Bouinan sont illustrés dans (**le tableau 11 et la Figure 13**).

Tableau N°11 : Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis

Echantillons de Propolis	Quantité de polyphénols en $\mu\text{g EAG/mg d'extract}$
Les Eucalyptus	250,00 \pm 5.091
Larbaa	158,30 \pm 0.566
Bouinan	200,00 \pm 5.657

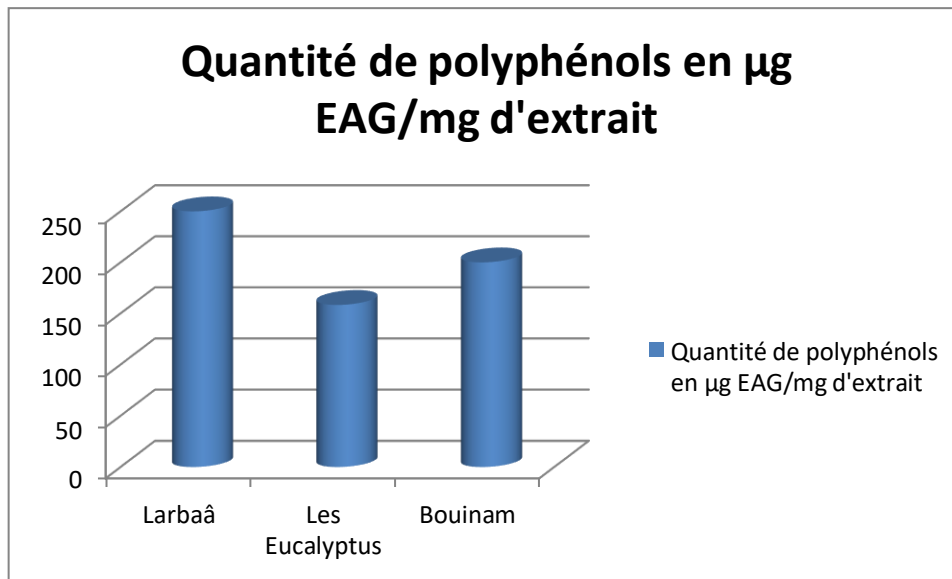


Figure 13 : Teneurs en polyphénols de la propolis récoltée dans trois régions différentes

Selon le **tableau 11** et la **figure 13**, on constate que les teneurs en polyphénols totaux de larbaa c'est la plus élevée soit $250,00 \pm 5,091 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait par rapport à celle de la propolis récoltée dans la région des Eucalyptus ($158,30 \pm 0,566 \mu\text{g EAG/mg}$) et de Bouinam ($200,00 \pm 5,657 \mu\text{g EAG/mg}$).

Les résultats obtenus durant cette étude sont différents de ceux trouvés par quelques auteurs. Les travaux de **Can et al (2015)** réalisés sur la propolis de quelques régions d'Azerbaïdjan ont trouvé une teneur très faibles en polyphénols entre $10,94$ et $79,23 \mu\text{g EAG /mg}$, alors que les travaux de **Ahn et al. (2007)** sur la propolis chinoise ont trouvé une teneur en polyphénols de $302 \pm 4,3 \mu\text{g EAG/mg}$. En plus, l'étude menée par **Choi et al, 2006** sur la propolis coréenne a montré une teneur de $212,7 \pm 7,4 \mu\text{g EAG /mg}$. Ainsi, l'étude de **Kumazawa et al, 2004** sur la propolis chinoise a révélé une teneur en polyphénols de $299 \pm 0,5 \mu\text{g EAG /mg}$.

En outre, **Laskar et al, en 2010** ont trouvé une moyenne de teneur en polyphénols de $159 \pm 0,69 \mu\text{g EAG /mg}$ d'extrait de propolis Indian.

Une étude faite par **Boufadi et al. (2014)** montrent que la propolis d'Ain El Arba (wilaya Aïn Témouchen) contient $194 \pm 14 \mu\text{g EAG /mg}$ de polyphénols et celle de Ksar el hirane (wilaya de Laghouat) contient $91 \pm 1 \mu\text{g EAG /mg}$.

Toutes ces différences dans la teneur en polyphénols peut revenir aux conditions environnementaux (le climat, la nature du sol) de chaque région de l'échantillon récoltée, ou/et aux conditions expérimentaux (les procédures d'extraction, le dosage et les différents Solvants utilisés).

III.5. Dosage des flavonoïdes

La teneur des différents extraits de propolis en flavonoïde récoltée dans les trois régions : Les Eucalyptus, Larbaa et Bouinan a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), en utilisant comme standard la quercétine.

Les résultats de dosage des flavonoïdes dans les échantillons de propolis analysés sont rapportés dans le **tableau 12** et la **figure 14**.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait riche en flavonoïdes c'est l'extrait EEP de la propolis récoltée dans la région de Larbaa avec une teneur de 40 ± 3.125 d'extrait, alors que les extraits EEP de la propolis récoltée dans les régions de Bouinan et des Eucalyptus sont respectivement $23 \pm 5.231 \mu g$ EQ/mg d'extrait et $20 \pm 0.122 \mu g$ EQ/mg.

Tableau N°12 : Teneurs en flavonoïdes des différents échantillons de propolis

Echantillons de Propolis	Quantité de flavonoïdes μg EQ/mg, d'extrait
Larbaa	40 ± 3.125
Les Eucalyptus	20 ± 0.122
Bouinam	23 ± 5.231

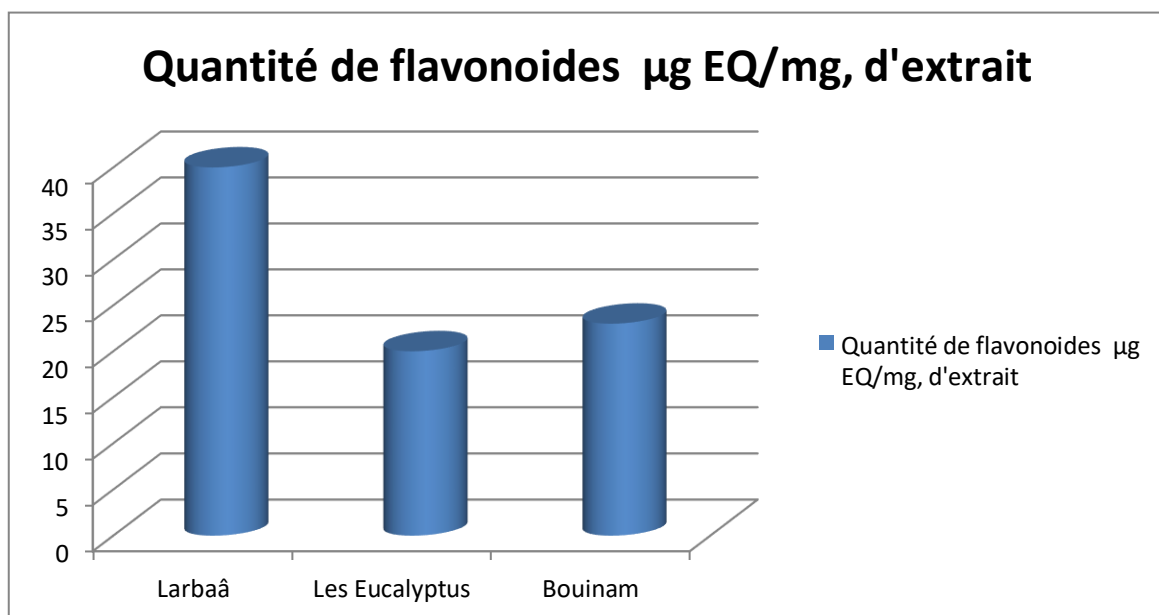


Figure 14 : Teneurs en flavonoïdes de la propolis récoltée dans trois régions différentes

Les résultats obtenus durant cette étude sont différents de ceux trouvés par quelques auteurs. En effet l'étude faite par **Boufadi *et al*, 2014** sur la propolis d'Ain ouassara (Wilaya de Djelfa) a révélé une teneur en flavonoïdes de $32 \pm 1 \mu\text{g EQ/mg}$ alors que l'extrait de propolis récoltée dans la région Ksar el hirane (wilaya de Laghouat) contient $14.4 \pm 0.9 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait.

En outre, les différences dans les concentrations totales de flavonoïdes entre les échantillons de propolis récoltée dans différentes régions d'Algérie peuvent être dues à de nombreux facteurs, tels que les conditions environnementales, le fond génétique, ou les techniques agricoles appliquées.

III.6. Activité antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis

III.6.1. Détermination du pourcentage d'inhibition du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH est évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne d'un passage de la couleur violette à la couleur jaune (**Figure 15**)

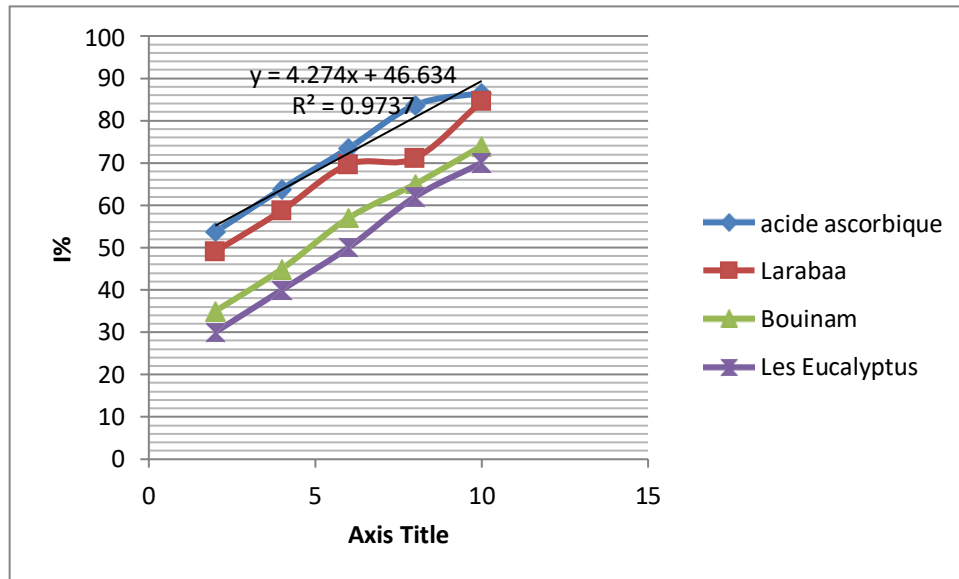
Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe du pourcentage (%) d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait (**Figure15**).

Ces résultats, montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits de propolis récoltée dans les trois régions

Nous constatons que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou les 03 extraits éthanoliques de propolis.

On note que l'efficacité antioxydant augmente avec la concentration de l'extrait éthanolique. Le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les 02 extraits éthanoliques de propolis récoltée dans les deux stations des Eucalyptus et de Bouinan sont inférieurs à celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations utilisées. Toutefois, le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait éthanolique de Larbaa est légèrement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

Pour une Concentration de 10 mg/ml, l'acide ascorbique révèle un pourcentage de 86,57 % ; tandis que les 03 extraits éthanoïques de propolis récoltée dans Larbaa, Bouinan et Les Eucalyptus présentent des concentrations respectives 84,53%, 74% et 70%.



I(%) : Pourcentage d’inhibition

Figure 15 : Pourcentage d’inhibition d’extrait éthanoliques de propolis récoltée dans les 03 régions et de l’acide ascorbique.

Les résultats obtenus sont exprimés selon les valeurs d’IC50 (**Tableau 13**) en comparaison à celle d’un standard (acide ascorbique).

La valeur d’IC50 est inversement liée à la capacité antioxydant d’un composé. Elle exprime la quantité d’antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus La valeur d’IC50 est basse, plus l’activité antioxydant d’un composé est élevée (**Ismaili et al. 2017**).

Les valeurs d’IC50 de l’extrait éthanolique et de l’acide ascorbique qui permettent d’inhiber l’effet de 50% du DPPH sont rapportées dans le **Tableau 13** et dans la **Figure 16**.

Tableau N°13 : Valeurs des concentrations d’inhibitions IC50 de l’acide ascorbique et de l’extrait éthanolique de propolis récoltée dans les 03 régions différentes.

	Les Eucalyptus	Larabaa	Bouinam	l’acide ascorbique
IC50 (mg/ml)	6.8	1,2	5	0,8

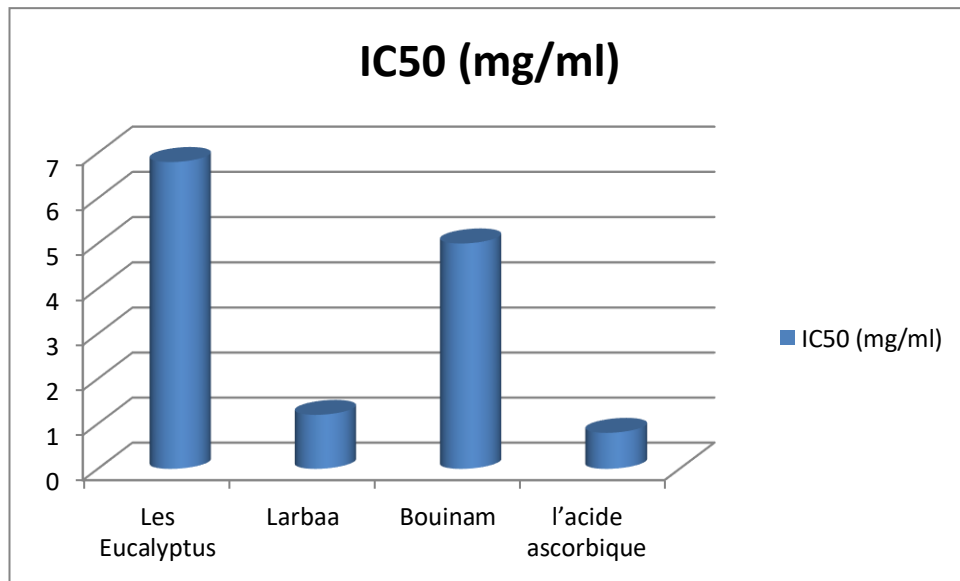


Figure 16 : IC50 de l'acide ascorbique et des extraits éthanoliques de la propolis récoltés dans les 03 régions.

L'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région de Larbaa pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 1.2 mg/ml. Elle est légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique (0.85 mg/ml). Cependant les extraits éthanoliques de propolis récoltée dans les deux régions Bouinam et les Eucalyptus sont respectivement élevés par rapport à l'acide ascorbique avec des valeurs respectives 5 mg/ml et 6.5 mg/ml.

Donc L'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région des Eucalyptus. Exhibe une activité antioxydant importante par rapport à deux autres régions.

Selon l'étude de **Rebiai et al, 2013** sur la propolis de Ghardaïa et Khanchla ont révélé un pourcentage d'activité anti radicalaire inférieur à nos résultats de l'ordre de 39.17 %, et 12.11 %. En plus l'étude menée par **Boufadi et al, 2014** sur la propolis d'Ouled ali (wilaya de Guelma), Ain Ouassara (Wilaya de Djelfa) et Ksar el hirane (wilaya de Laghouat) ont trouvé un pourcentage d'activité anti radicalaire > 50%.

Les résultats sont différents d'une étude à l'autre, cela peut être expliqué par plusieurs facteurs influençant l'efficacité de l'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé.

En outre, l'activité antioxydant élevée de l'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région des Eucalyptus peut être le résultat des composants phénoliques mais aussi d'antioxydants non phénoliques comme sesquiterpènes, flavonoïdes ou acides chlorogéniques (**Li et al. 2007 et Zhang et al. 2014**). Selon **Shahidi et Wanasundara (1992)** les composés phénoliques sont

connus comme des puissants antioxydants. Suivant **Hanato et al (1989)** les composés phénoliques sont des constituants très importants dans les extraits et leur capacité de balayage des radicaux libres est due à leurs groupes d'hydroxyles.

III.6. Activité antimicrobienne:

L'évaluation des activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques de la propolis, provenant des trois régions étudiées, à l'égard des bactéries pathogènes testées a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose. Les résultats de mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant:

Dans le principe de l'antibiogramme solide, un antimicrobien est d'autant plus efficace que son cercle d'inhibition de la croissance microbienne est grand. Les mesures montrent des variations des diamètres de la zone d'inhibition sont estimés selon trois niveaux d'activité des souches utilisées :

- Fortement inhibitrice : $21 \text{ mm} \leq D \leq 29 \text{ mm}$
- Modérément inhibitrice : $16 \text{ mm} \leq D \leq 20 \text{ mm}$
- Légèrement inhibitrice : $10 \text{ mm} \leq D \leq 15 \text{ mm}$

L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à l'autre

Comme cela a été rapporté dans la littérature, ont considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12mm (**Sagdaç, 2003**).

Les résultats trouvés de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches des solutions mères (EEP) et des extraits dilués (des dilutions 10^{-1} et 10^{-2}) de la propolis récoltée dans les 03 régions : Les Eucalyptus, L'arbaa et Bouinan sont présentés dans **les figures 17, 18 et 19**.

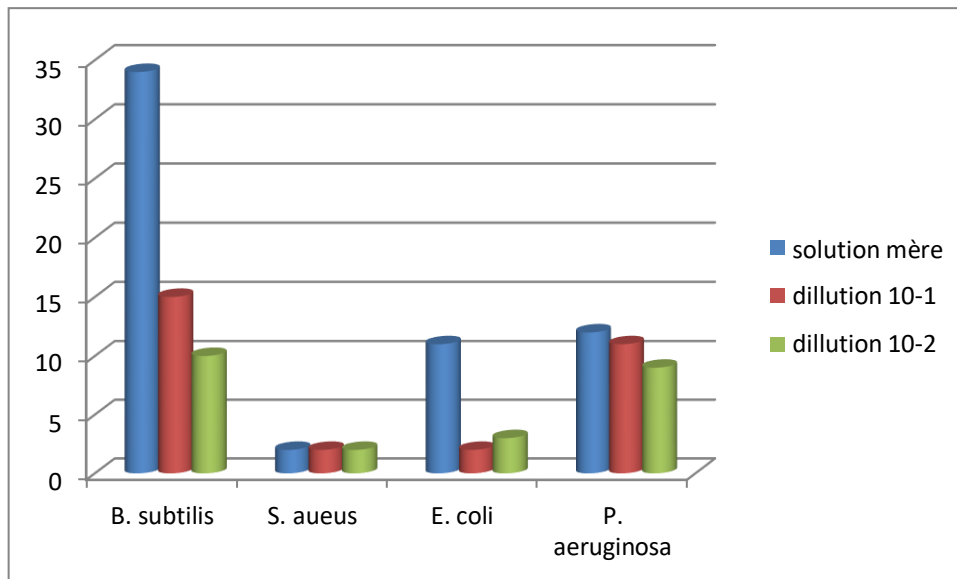


Figure17 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis diluées de la région de Larbaa

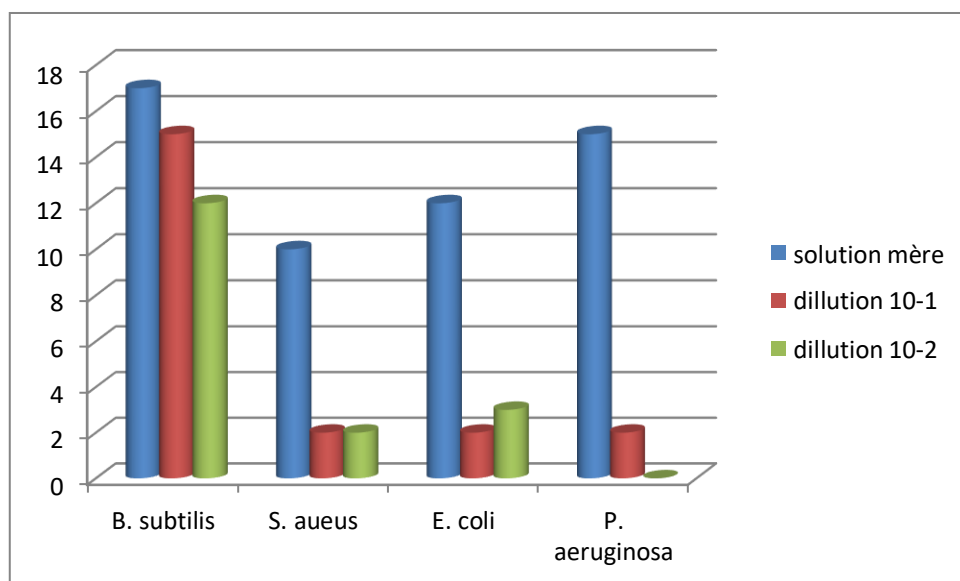


Figure18 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis diluées de la région des Eucalyptus

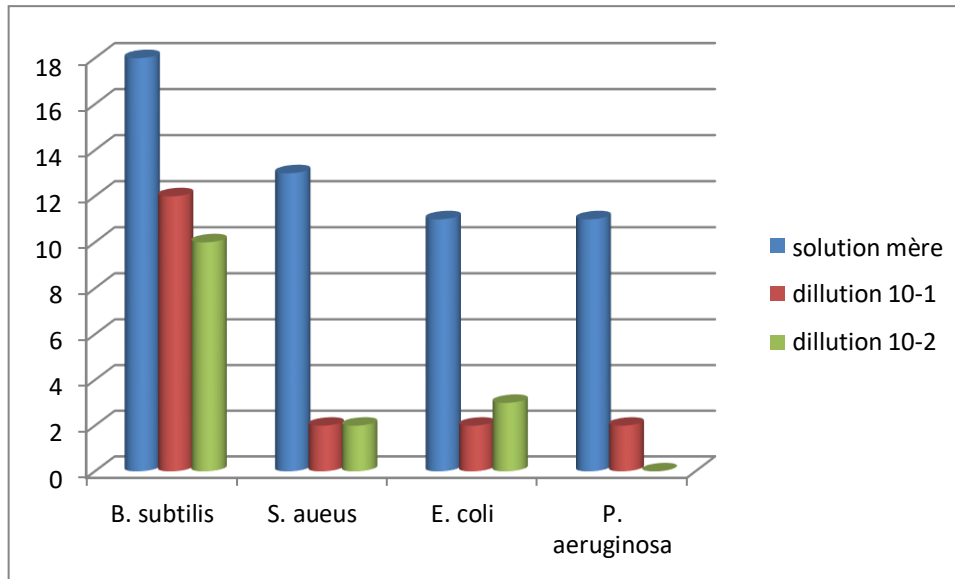


Figure 19 : Diamètres d'inhibitions (mm) des extraits de propolis dilués de la région de Bouinan

Selon les figures 17, 18 et 19 les extraits (EEP) : solution mère des 03 régions : Les Eucalyptus et Larbaa inhibent légèrement les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibitions allant de 11 à 15 mm. Cependant les 03 extraits : Les Eucalyptus, Bouinan et surtout Larbaa se montrent respectivement actifs vis-à-vis des *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibitions élevés 17 mm, 18 mm et 34 mm. Concernant les *Staphylocoques aureus* sont inhibées légèrement par les extraits des deux stations : les Eucalyptus et Bouinan, tandis qu'elles se montrent totalement résistantes à l'encontre des extraits de Larbaa

Suivant les mêmes figures 17, 18 et 19, les dilutions des extraits des 03 régions 10^{-1} et 10^{-2} inhibent légèrement les *Bacillus subtilis* avec des diamètres d'inhibition allant de 10 à 15 mm. En revanche elles se montrent totalement inactives vis-à-vis des *Staphylocoques aureus* et des *E.coli*.

Cependant, les Bactéries *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent moyennement sensibles vis à vis des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de Larbaa, tandis qu'elles se révèlent totalement résistantes à l'encontre des dilutions des extraits de propolis récoltée dans les deux autres régions : les Eucalyptus et Bouinan.

En outre ; la comparaison des résultats antibactériennes des solution mères (EEP) et des extraits dilués (des dilutions 10^{-1} et 10^{-2}) de la propolis vis-à-vis de nos 04 souches bactériennes, dévoile d'un côté une activité bactériostatique importante des extraits de propolis récoltée dans la région de Larbaa par rapport à celles des deux autres régions, et d'un autre côté la souche *Bacillus subtilis* se montre plus sensible aux extraits par rapport aux trois autres souches

bactériennes .

En conséquence, l'effet bactériostatique important des extraits de la propolis (EEP) récoltée dans la région de Larbaa est dû à sa composition riche en poly phénols soit $250,00 \pm 5.091 \mu\text{g}$ EAG/mg d'extrait et en flavonoïdes soit $40 \pm 3.125 \mu\text{g}$ EQ/mg d'extrait et en plus EEP de la région de Larbaa possède une activité antioxydant élevée par rapport à ceux des deux autres régions avec une IC50 de 1.2 mg/ml légèrement inférieure à celle de l'acide ascorbique (0.85 mg/ml). Aussi ces mêmes extraits se montrent avec un pH bas et une acidité élevée par rapport aux extraits de propolis récoltée dans les deux autres stations.

Suivant **Bogdanov et Blumer (2001)** la variabilité du potentiel antimicrobien de plusieurs régions est due à la différence dans les compositions chimiques extraites de propolis : teneurs en composées phénoliques, flavonoïdes et pH (le pH acide renforce l'activité antibactérienne car les bactéries ne peuvent se multiplier dans un milieu acide).

En outre les résultats du pouvoir antimicrobien important des extraits de propolis de la région de Larbaa sur les *Bacillus subtilus* sont similaires aux travaux cités dans la littérature. En effet **Meresta et Meresta (1985)** ont démontré l'effet inhibiteur de leur extraits de propolis sur les *Bacillus subtilus* , **Mlagan et Sulimanovic (1982)** ont dévoilé l'effet destructif des extraits sur des *Bacillus larvea* et **Srdjan S et al, (2003)** ont énoncé l'activité antibactérienne importante des extraits de propolis récoltée dans la région de la Serbie sur les bactéries *E.coli*, *S.aureus* et surtout sur les *B.subitilis*.

De nombreuses études ont démontré l'effet d'inhibition de la propolis sur les souches Gram +, Gram- (**Grange et Davey 1990, Rojas Hernandez et al, 1993**) et les bactéries anaérobies (**Kedzia 1986, Boyanova et al 2006, Santos et al 2002**). Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (**Ugur et arslan 2004**) et de sa composition riche en pinocembrine, galangine, acide caféique, et l'acide férulique (**Schmidt et Buchmann, 1992**).

Conclusion

Conclusion

Dans le but de rechercher de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique, nous nous sommes intéressés à valoriser les vertus de *la propolis locale*. par une caractérisation phytochimique et l'évaluation des activités biologiques.

Le choix de la propolis locale algérienne est justifié par son abondance dans les montagnes, les plaines et les steppes et son usage par les consommateurs comme des aliments sains, naturels, diététiques et stimulants pour l'organisme et ses défenses immunitaires.

Dans cette optique nous nous sommes intéressés à la propolis locale provenant de trois régions pédoclimatiques différentes, à savoir la région des Eucalyptus, la région Larbaa et la région Bouinam.

Les résultats obtenus permettent de prouver l'effet antibactérien des extraits éthanoliques de la propolis récoltée dans les trois régions. L'extrait éthanolique de la propolis récoltée dans la région de Larbaa s'est révélé le plus actif vis-à-vis des 04 bactéries : *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et plus particulièrement à l'encontre de la souche *Bacillus subtilis*. L'action bactériostatique importante surtout celle des extraits éthanoliques de Larbaa est due à sa richesse en polyphénols totaux ainsi qu'en flavonoïdes totaux et à son pouvoir antioxydant élevé.

Nous conférons ainsi la légitimité de juger et classer nos échantillons de propolis selon l'efficacité, désignant l'échantillon de Larbaa comme le plus riche en principes actifs et le plus efficace antimicrobien et antioxydant des trois échantillons.

Au vu des résultats obtenus et tenant compte de la problématique du sujet, il nous semble judicieux d'approfondir le présent travail par :

- Elargissement du nombre des échantillons pour couvrir toutes les wilayas du pays
- Evaluation des propriétés thérapeutiques des extraits de propolis,
- Identifier les principales plantes productrices de propolis ;
- Enfin, l'idéal serait de poursuivre les investigations sur la propolis algérienne, à savoir l'étude du fractionnement des extraits voir même d'isolement des molécules pour l'attribution à l'un ou l'autre des constituants des effets thérapeutiques, diététiques et nutritionnelles.

Références

1. **Aagaard, K. L., (1947).** The Natural Product: Propolis, the Way to Health;
2. **Abu-Mellal A, Koolaji N, Duke R K, Tran V H, Duke C C(2012)** : Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry* ; 77:251-9.
3. **Ahn. M.; Kumazawa. S.; Usui Y.; Nkamura. J.; Matsuka M.; Zhu. F.; Nakayama. T. (2007).** Antioxydant activity and constituent of propolis collected in varaus areas of china. *Food chemistry 101. 1383 – 1392.*
4. **Alix, Lefief-Delcourt., (2010).** Le miel malin : tous les bienfaits au quotidien de cet ingrédient délicieux et 100% naturel, ed. Le duc.s, p21-22-36.
5. **Amoros, M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M., (1992).** Synergistic effect of flavones and flavonolsagaist herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparaison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products 55, 1732-1740.*
6. **Anchling F, (2005):** juin, sommet de développement des colonies, mais quid de la première récolte. *Revue j'abeille de France N° 915. 07p.*
7. **Archambaud M.(2009).** Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques in vitro 17 Mars-2009. Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse. P
8. **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung., 46, 1086-1089.*
9. **Bandaoui.W et Belhachem.H , 1997 ; Etude photochimique de la propolis algérienne et sa valorisation dans les domaines phyto-thérapeutique et cosmétique**
10. **Bankova V., Boudourova-Krasteva G., Popov S., Sforcin J.M., Funari S.R.C(1998).** Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. . *Apidologie. , pp. n. 29, p. 361-7.*
11. **Bankova, D.A., Popv, S., Evstatieva, L., et al. (1992).** Propolis produced in Bulgariaand Mongolia : phenolic compound and plant origin. *Apidologie 23 : 79-85.*
12. **Bankova, R. Christov, G. Stoev, S.J. Popov, S. J. Chromatogr. (1992), 607, 150.** Determination of phenolics from propolis by capillary-gas chromatography. *Chromatograph.*

1992, pp. n.607, p.150-153.

- 13. Bankova, V. (2005).** Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- 14. Bankova, V. Dyalgerov, A., Popov, S. and Marekov, N.L. (1987).** A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. f. Naturforschung*, 42:147-151.
- 15. Bankova, V. Dyalgerov, A., Popov, S. and Marekov, N.L. 1987.** A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. f. Naturforschung*, 42:147-151.
- 16. Bankova, V., Castro, S.L., & Marcucci, M.C., (2000).** Propolis : Récent progrès de l'apiculture et de l'origine des plantes, *Apidologie* ; 31 : 3-15.
- 17. Barbarić, M. ; Mišković, K. ; Bojić, M. ; Lončar, M. B. ; Smolčić-Bubalo, A. ; Debeljak, Ž. ; Medić-Šarić, M., (2011).** Chemical Composition of the Ethanolic Propolis Extracts and Its Effect on HeLa Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 772–778.
- 18. Belkhiri, B. Bouab, C. (2018).** Extraction, dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH de la propolis et pollen de l'est Algérien. P 38-39.
- 19. Biri M, (1976):** l'élevage moderne des abeilles. Ed vecchi S.A Paris . 321p.
- 20. Biri. M, (1999):** Le grand livre des abeilles. L'apiculture moderne. Edition vecchi S.A paris. 260p.
- 21. Bogdanov S., Blumer P. (2001).** Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'apiculture*, 98 (3): 107-114.
- 22. Bogdanov S., Gallman P., Stangacius S., Cherbuliez T.(2006).** produits apicoles et sante, edition apitherapy consulting, Bucarest, Roumanie, 51p
- 23. Bogdanov, S., Imdrof, A., Charriere J-D., Flurip , Kilchenmann ,V., (2003).** Qualité des produits apicoles et sources de contamination. Centre suisse de recherche apicoles. Station fédérale de recherche laitières, liebefeld, CH-3003 Berne p : 1-2-3. Traduction Evelyne Fasnacht (partie 1) et Michel dubois (partie 2).
- 24. Boufadi, Y.M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., Boudjeltia, K.Z., Antwerpen, P.V., (2014).** Characterization and Antioxidant Properties of Six Algerian Propolis Extracts: Ethyl Acetate Extracts Inhibit Myeloperoxidase Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 15, 2327-2345.

25. **Boyanova, L., Kolarov, M., Kilgova, G., Mitov, M (2006).** In vitro activity of Bulgarian à completer
26. **Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset; (1995)** ‘‘Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity ‘‘; *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*;28; 2530.
27. **Bruneau, E., (2004).** Les produits de la ruche In : Bruneau, E., Barbançon, J.M., Bonnaffé, P., Clément, H., Domerego, R., Fert, G., Leconte, Y., Ratia, G., Reeb, C., Vaissière, B. *Le traité Rustica de l’apiculture.* Rustica éditions, Paris, 352-387.
28. **Bufalo, M.C., Candeias, J.M.G., Sforcin, J.M.,b (2009).** In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoide carcinoma (HEp-2) cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 6, 483-487.
29. **Burdock ga(1998).** Review of the biological properties ans toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol* ; 36(4):347-363.
30. **Burdock, G. (1998),** Review of the biological properties and toxicity of bee
31. **Caillas.A, (1974).** Les produits de la ruche: miel, cire, venin et la propolis. 2^{ème} Edition, Bois d’Archis (78). Saint-Gilles. PP: 1-35.
32. **Can, Z., Yildiz2, O., Şahin, H., Asadov, A., Kolayli, S., (2015).** Phenolic Profile and Antioxidant Potential of Propolis from Azerbaijan., *15(1):16-28.*
33. **Chauvin R.(1968).** pollen c’est moi, revue d’apiculture française n 416 p 20.
34. **Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M., (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lwt-Food Science and Technology* 39, 756-761.
35. **Cirasino L, Pisati A, Fasani F (1987):** Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* ; 16:110- 111.
36. **Cizmarik, J., Trupl, J (1976).** Effect of propolis on bacteria. *Pharmazie* **31**, 656-7.
37. **Codex Stan., (1981).** Revised Codex Standard for Honey Codex Stan 12-1981, Rev.1 (1987), Rev. 2 (2001).
38. **Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., and Fett, R. (2016).** Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 196, 309–323.

39. **De Araújo, G. K. P., de Souza, S. J., da Silva, M. V., Yamashita, F., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V., & Shirai, M. A. (2015).** Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2080-2087.
40. **Debuyser E.(1983).** la propolis thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, galangin. *Journal of Applied Microbiology*.103(5) :1562-7.
41. **Debuyser, E. (1984).** La propolis. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante, Faculté de pharmacie.
42. **Donadieu Y.(1992).**l'apithera-pie,médecine des abeilles :Edition Amyris,225 pages.
43. **Donadieu, Y., (1982).** Pollen : thérapeutique naturelles. 5PèmeP ED Maloin S. A Paris.31p.
44. **Dos Santos Pereira A, de Miranda Pereira A F, Trugo LC, de Aquino Neto F R(2003) :** Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*; 58(7-8):590-3.
45. **EMILLIE FREDOT. (2009).** Connaissance des alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Deuxième édition. Edition TEC&DOC, 11, rue Lavoisier, Paris.
46. **Escanu, V., Prahoveanu, E., Cricsan, I., Cioca, A (1981).** The effect of aqueous propolis extract on experimental influenza virus infection in mice. *Virologie* **32**, 213-5.
47. **Evangelist-Rodrigues, A., Carneiro of Cunha. M (2001).** Analise comparative da qualidade da propolis coletado atraves de calços de madeira etela plastica na regiaô do byo paraeibano. *Mensagem Doce* 63 (bis).
48. **Fenge Li.(2008) ; Suresh Awwale. ; Yasuhiro Tezuka et Shigetoshi Kadota.. :** cytotoxic constituents from brazilian red prrpolis and their structure- acivity relationship. *Biorganique et Medicinal chemistry* 16: 5434 – 5440.
49. **Ferhoum F . (2010) :** Analyse phisicochimique de la propolis locale selon les étage bioclimatique et les deux race d'abeille locale .thèse de magistère univ Boumerdèse.
50. **Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., Guimaraes, S., (2006).** In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13, 170–175.
51. **Garoui E.M., Troudi A., fetoui H., Soudani N., Boudawara T., Zeghal N. (2011).**

Propolis attenuates colbat induced-nephrotoxicity in adult rats and their progeny.Elsevier.PubMed.

- 52. Gavanji S, Larki B(2017).** Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chin J Integr Med* ; 23(3):201-7.
- 53. Ghedia K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) Numéro 4 : 162-169.
- 54. Ghisalberti, E.L. (1979):** Propolis: A Review. *Bee World*, 60 (2), 59-84.
- 55. Grange, J.M, Davey, P. W (1990).** Antibacterial properties of propolis. *Journal of The Royal Society of Medicine* **83**, 159-160..
- 56. Gunduz C., Biray C., Kosova B., Yilmaz B., Eroglu Z., Sahin F., Cogulu O.(2005).**Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity, *Leukemia Research*, Volume 29, 1343-1346.
- 57. Hegazi, A. G (1997).** Propolis an overview. *International Symposium on Apitherapy Cairo 8 and 9th Egypt*.
- 58. Hegazi, A. G., Abd El Hady, F. K., & Abd Allah, F. A. (2000).** Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 70-75.
- 59. Higashi, K. O, De Castro, S. L (1995).** Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacology* 46, 55-8.
- 60. Hoyet, C. (2005).** Le miel: De la source à la thérapeutique, Thèse en vue d'obtention de docteur en pharmacie, Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy-I, 87 p.
- 61. Huang S, Zhang C P, Wang K, Li G Q, Hu F L(2014) :** Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* ; 19(12):19610-19632.
- 62. Huang W Y, Cai Y Z, Zhang Y(2010) :** Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer* ; 62(1):1-20.
- 63. Journée de NAMUR.** Journée d'information organisée aux facultés Notre-Dame de la paix à Namur place de la justice, auditoire M.03 (faculté de Médecine). Présentation du bilan des activités développées dans le secteur apicole avec l'aide du programme miel de la communauté européenne. 2016
- 64. Kalogeropoulos N., Spyros J., Troullidou K., Mourtzinis E., Vaios I., Karathanos T.(2009).** Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial

properties of propolis extracts from Greece and Cyprus, *Food Chemistry* 116 (2009) 452-461.

65. **Kamazawa. S, Hamaska. T, Nakayama. T. (2004).** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry* 84. 329 – 339.
66. **Kedzia, A (1986).**Effect of ethanol extract of propolis (EEP) on anaerobic bacteria. *HerbaPolonia* 32, 53-58.
67. **Krell R.(1996).**Value added products from beekeeping food and agriculture organisation of the United Nations Rome Chapitre 5
68. **Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S(1999).** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* , pp. n. 64(3), p. 235-240.
69. **Kumazawa S., Hamasha T., Nkamura T.(2003).** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food chemistry* 84.329-339
70. **Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., (2004).** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84, 329-33.
71. **Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A., (2010).** Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem, 122*, 233-237.
72. **Lavie, P (1975).** La propolis. Edition : Apimondia. Bucharest.
73. **Le François P., Françoise R.(2010).** Functional properties of honey, propolis, and royal jelly, *J Food Sci*; 73(9): r 117-24.
74. **Les produits de la ruche**, autres que le miel : pollen et propolis. Ecole d'apiculture des ruchers du sud. Luxembourg. 2012.
75. **Li, H., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102, 771-776.
76. **MAKACHVILI, Z.A.(1978)** ; Quelques données historiques sur l'emploi de la propolis
77. **Maksimova-Todorova, v., Manolova, N., Gegova, G., Serkedzhieva, Y., Uzunova, S., Pancheva, S., Marekov, N., Bankova, V (1985).** Antiviral effects of some fractions isolated from propolis. *Acta Microbiologica Bulgaria* 17, 79-85.
78. **Marchenay P. (1977)** : la propolis, copyright of Philippe Marchenay, 35p.
79. **Marcucci, M.; (1995).** Propolis: chemical composition, biological properties and

therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83 – 99.

Mentor: Danemark

- 80.** Meresta L, Meresta T (1985). An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis of cows. *Med Weter* 41, 489-492 (in Polish), *ApicAbstr* (1988) 39(3)
- 81.** Metzner, J., Schneidewind, E. M (1997). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazi* 33 (7). German.
- 82.** Mlagan V., Sulimanovic D. 1982. Action of propolis solution on *Bacillus* larvae, *Apiacta* 17, 16-20.
- 83.** Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity of songklanakarin. *Journal of science technology*, 26 (2): 211-219.
- 84.** Montenegro, G., Mujica, A.M., Peña, R.C., Gomez, M., Serey, I., Timmermann, B.N., (2004). Similarity pattern and botanical origin of the Chilean propolis. *Phyton* 73, 145-154.
- 85.** Montenegro, G., Pizapro, R., Avila, G., Castro, C., Rios, C., Muñoz, O., Bas, F., Gomez, M., (2003). Botanical origin and chemical properties of honeys from an Arid Mediterranean Region of Chile. *Cien. Inv. Agr* 30, 161-174.
- 86.** Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M (1983) : Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* ; 9:163.
- 87.** Moudir Naima, 2004. Les polyphénols de la propolis algérienne. . Thèse de magister en chimie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila.
- 88.** MUTSAERS M., VAN BLITTERSWIJK H., VAN'T LEVEN L., KERKVLIEET J. AND WAERDT J. (2005) *Produits de l'apiculture, propriétés, transformation et commercialisation*, Première édition. 10: P55-59.
- 89.** NCCLS (2002). M27-A2. In National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard.
- 90.** Negri, G., Marcucci, M.C., Salatino, A.M., Salatino, L.F., (2000). Comb and propolis waxes from Brazil (states of Sao Paulo and Panama). *J Braz* 1, 5453-457.

91. **Nolkemper S., Reichling J., Sensch K.H., Schnitzler P.(2009).** Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts.
92. **Nowotnick.K (1997):** Propolis, Gewinnung-Anwendung-Rezepte edition Leopold Stocker Verlag Graz.
93. **Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimiz., M. T (2001).** Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 44, 375-8.
94. **Ozcan, M (2004).** Inhibition of *Aspergillus parasitius* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. *J Med Food* 7, 114-6.
95. **Pepeljnak, S., Maysinger, D., Jalsenjaj, I (1982).** Effect of propolis extract on some fungi. *Scientia Pharmaceutica* 50, 165-7.
96. **Pereira, A.D.S., Seixas, F.R.M.S., Aquino-Neto, F.R., (2002).** Propolis: 100 years of research and future perspectives. *Quimica Nova* 25, 321-326.
97. **PHILIPPE J.M. (1999)** Guide pratique de l'apiculture, 3^{ème} édition. P851-855.
98. **Popova M., Trusheva B., Antonova D., Cutajar ., Mifsud S., Farrugia D., Tsvetkova C.I., Najdenski H., Bankova V.(2010),** The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta, *Food Chemistry* 126 (2011) 1431- 1435.
99. **Popova, M., Bonkova, V., Chimov, A., Sileva, M., (2002).** A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum* trees. *Apidologie* 33, 87-88.
100. **Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019).** Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, 24(11), 2047.
101. **R. KRELL., (1996).** Value - added products from beekeeping. *Food and agriculture organization of the United Nations Rome. Chapitre 5.*
102. **Ransome, H.M., (1937).** The sacred bee in ancient times and folklore. George Allen and Unwin, London, pp. 308.
103. **Ravazzi, G., (2003).** Les autres produits de la ruche In « Abeilles et apiculture ». Ed: Vecchi, 118-121.
104. **Rebiai, A., Lanez, T., Belfar, M.L., (2013).** Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of Algerian propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6 (1), 975-1491.

- 105.** Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., (1972). Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, pp.671.
- 106.** Ribéreau-Gayon, P., (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, pp.254.
- 107.** Rojas Hernandez, N. H., Candelario, M., Oliveras, E (1993). Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. Revista Biologica (Habana) 7, 69-75.
- 108.** S.M. Alencar, T.L.C. Oldoni, M.L. Castro, I.S.R. Cabral, C.M. Costa-Neto, J.A. Cury, P.L. Rosalen, M. Ikegaki, (2007) Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis, Journal of Ethnopharmacology, Volume 113, Issue 2, Pages 278-283, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.
- 109.** Sagdaç A, (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. Lebensm- wiss. U-technol. 36 : 467- 473
- 110.** Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzed, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., Braga, F. C (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J of Ethnopharmacology 80, 1-7. Propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. Anaerobe 12, 173-177.
- 111.** Schmidt, J.O., S.L. Buchmann, (1992): Other products of the hive. In: The Hive and the Honeybee. J.M. Graham, ed. Dadant & Sons, Hamilton, USA. PP. 927-988.
- 112.** Schweitzer P, (2004): le monde des miellats. Revue l'abeille de France N°908 laboratoire d'analyse et d'écologie apicole. 04p.
- 113.** Schweitzer P, (2005): encore des miels hors normes. Revue l'abeille de France N°917 laboratoire d'analyse et d'écologie apicole. 03p
- 114.** Serdjan stepanovic, Natasa Antic, Ivana Dakic, Milena Savabic-valhovic (2003). In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs, Journals Microbial Research 158, 353-357
- 115.** Sforcin, J.M., Fernandes Jr, A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. Journal of Ethnopharmacology 73, 243-249.
- 116.** Shi X., Dala N.S; (1991). Antioxydant behaviour of caffeine: efficient scavenging of

hydroxyl radical. Food and Chemical toxicology 29, 1 – 6.

- 117. Shiva, M., Mohammad, S., Manoochehr, H., Reza, A.H., Nasrin, S., Seyed, N.O., (2007).** Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. Science direct. Food Chemistry 103, 1097-1103.
- 118. Sibel Silici.; Mehmet Unlu.; Gülhan Vardar-Ünlü. (2007).** Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1797–1803.*
- 119. Silić S., Koc A.N., Mistik S(2007).** Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Annals of Microbiology.* , pp. n. 57 (2) , p. 269-272.
- 120. Silici. Sibel; Mehmet Unlu.; Gülhan Vardar-Ünlü. 2007.** Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1797–1803.*
- 121. Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I., & Švabić-Vlahović, M. (2003).** In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research, 158(4), 353-357.*
- 122. TOSI ., ENZO A., CIAPPINI., MARIA C., CAZZOLLI., AMPELIO F., TAPIZ ANDLUIS M. (2006)** Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *APIACTA .41:P110-120.*
- 123. Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., (2007).** Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. 10.1186/1752- 153X-1-13.
- 124. Ugur, A., Arslan, T (2004).** An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med Food 7, 90-94.*
- 125. Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblan, S., Singh, M., Maiese, W. M., Timmerman, B. N, (1999).** Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z. Naturforsch 54c, 406-416.*
- 126. Yusop, S. A. T. W., Sukairi, A. H., Sabri, W. M. A. W., & Asaruddin, M. R. (2019).** Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of propolis from Beladin, Sarawak stingless bees *Trigona itama* extract. *Materials Today: Proceedings, 19, 1752-1760.*
- 127. Zhang, T., Omar, R., Siherietal, W., (2014).** Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis.

Annexe

Annexe

Annexe 1 : Matériel technique et réactifs.

Appareillage	Verreries et accessoires	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Agitateur vortex - Autoclave - Balance analytique de précision - Balance électrique - Bain marie thermostaté - Bec bunsen - Dessiccateur - Etuve - Four à moufle - PH mètre - Plaque chauffante - Plaque agitatrice - Spectrophotomètre UV-visible - 	<ul style="list-style-type: none"> - Antonoires - Barreau magnétique - Becher - Boites pétri - Capsules en porcelaine - Capsules en verre - Ecouvillons - Embouts - Entonnoirs - Éprouvettes graduées - Erlenmeyer - Fioles - Flacons - Hance de platine - Micropipette - Papier aluminium - Papier filtres - Papier wattman - Pince - Pipettes graduées - Pipettes Pasteur - Porte tubes - Réfrigérants à reflux - Spatule - Tubes à essais stériles - Les disques 9mm - 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide gallique - Alcool éthylique 70% - Carbonate de sodium (10%) - DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) - Eau distillée stérile - Eau physiologique - Hydroxyde de sodium - Méthanol - Milieu de cultures : <ul style="list-style-type: none"> • Gélose Muller Hinton - Quercétine - Réactif Folin-Ciocalteu - Trichlorure d'aluminium (2%)

Annexe 2 : Préparation des solutions et réactifs.

Solution Acide gallique : 200 mg de l'acide gallique + 100 ml d'eau distillée.

Solution Folin-Ciocalteu (0,1N) : 1 ml de réactif de folin + 10 ml d'eau distillé.

Solution carbonate de sodium (10%) : 10 g de carbonate de sodium + 100 ml d'eau distillée

Solution DPPH : 2 mg de DPPH + 50 ml de méthanol.

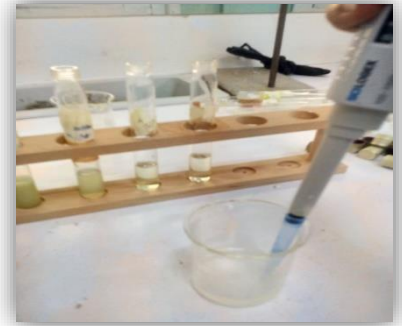
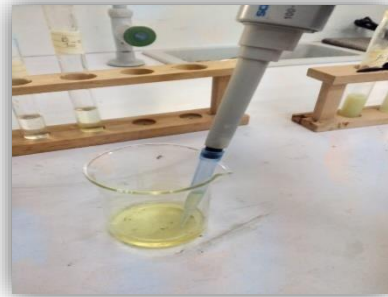
Solution hydroxyde de sodium (0.1N) : 1 g d'hydroxyde de sodium + 250 ml d'eau distillée.

Solution de quercétine 4 mg de la quercétine + 10 ml de méthanol.

Solution de chlorure d'aluminium (2%) : 2 g de chlorure d'aluminium + 100 ml de méthanol.

Solution NaCl (0,9%) : 0,9 g de du chlorure de sodium + 100 ml d'eau distillée.

Annexe 3 : photographies des expériences réalisées au cours du travail.



Dosage des polyphénols totaux



Dosage des flavonoïdes totaux



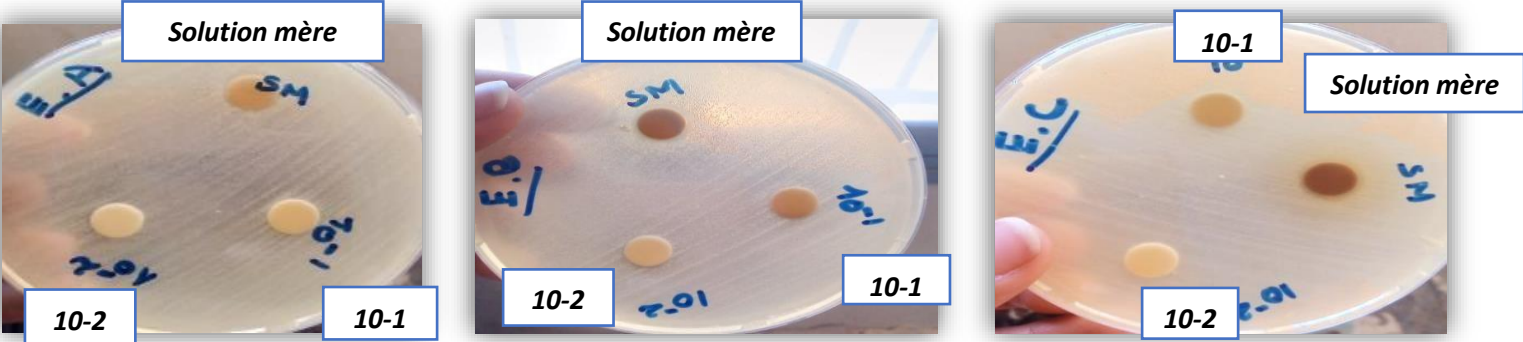
Activité antimicrobienne



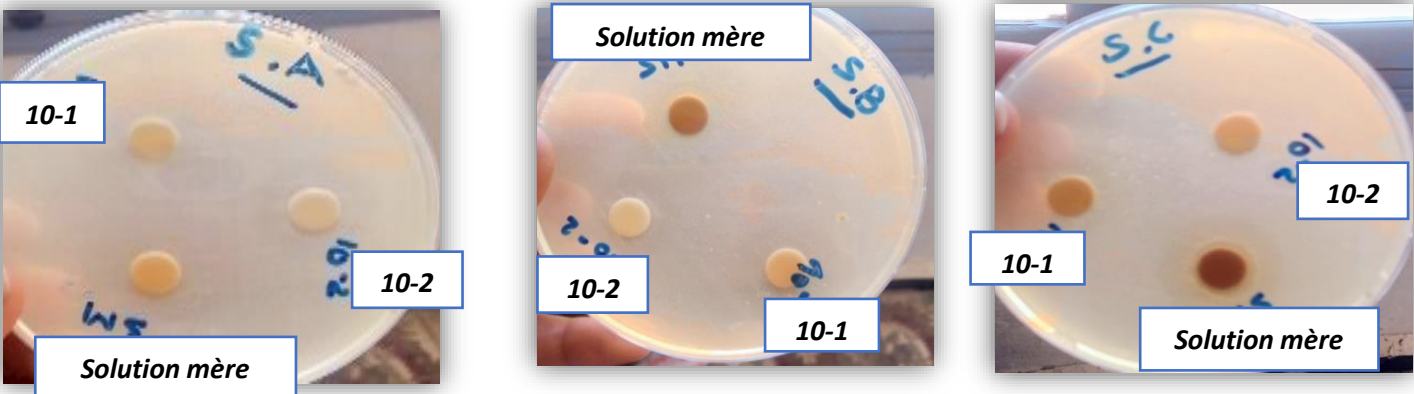
Activité antioxydante

Annexe 4 : photographies des diamètres des zones d'inhibition de EEP des trois échantillons vis-à-vis à différentes concentration des germes testés.

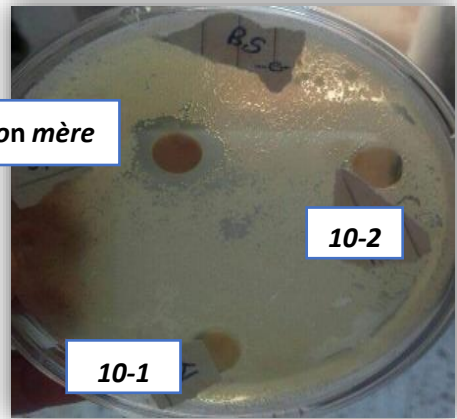
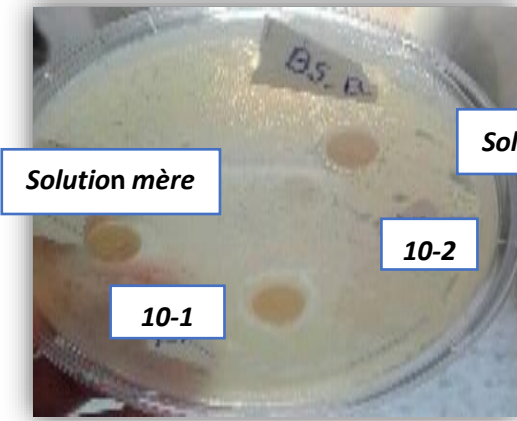
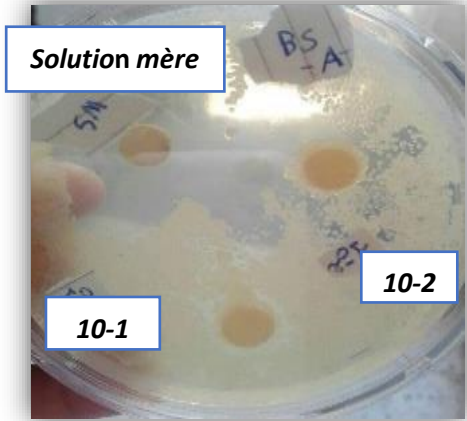
Escherichia coli



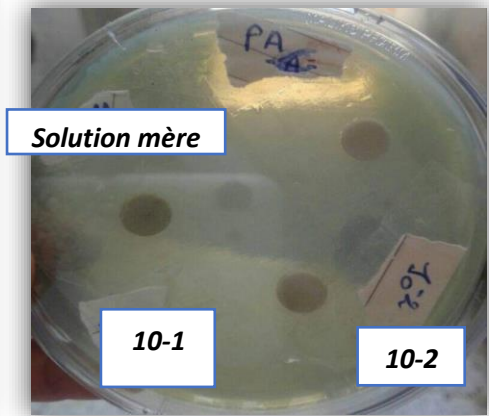
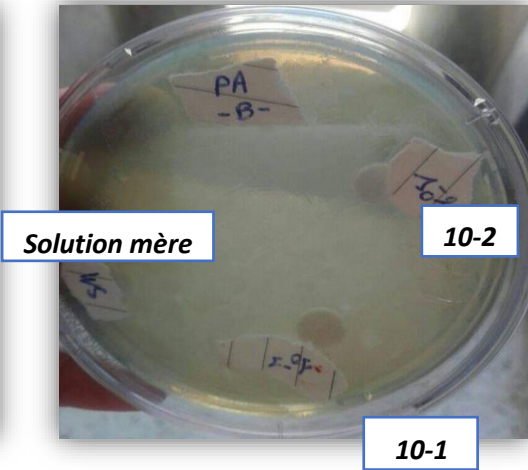
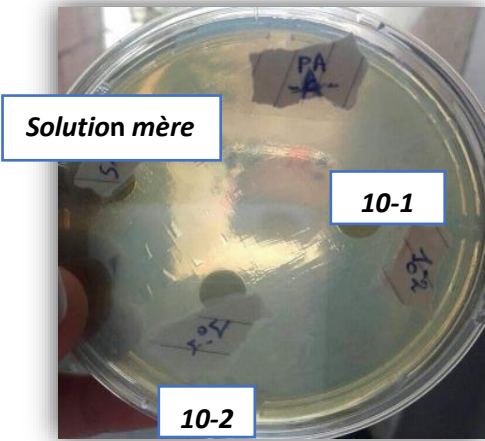
Staphylococcus aureus



Bacillus aureus



Pseudomonas aureginosa





Etape de la détermination de taux de perte pendant le séchage



Etape de la détermination de la teneur en cendre

Annexe 5 : Le matériel utilisé pour le travail.



Four à moufle



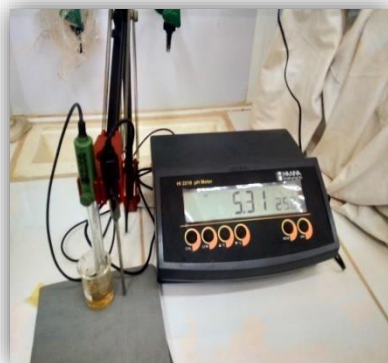
Etuve



Balance de précision



Dessiccateur



PH mètre



Autoclave



**Spectrophotomètre
UV-visible**

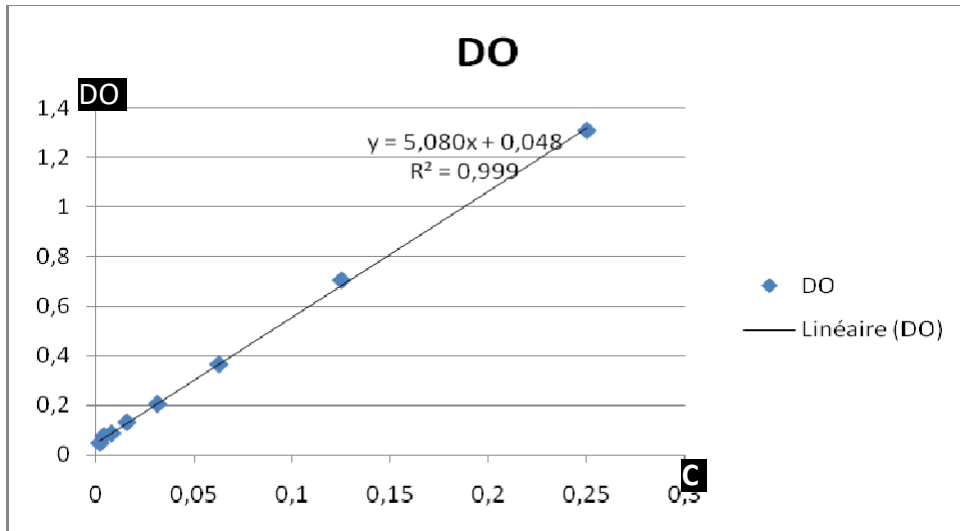


Place chauffante

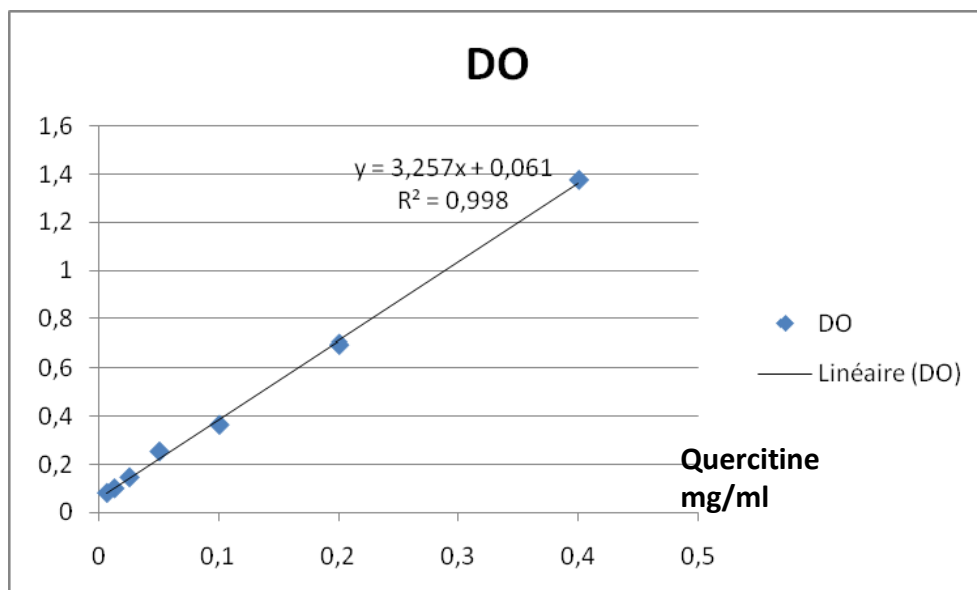


Agitateur vortex

Annexe 6 : Les courbes d'étalonnage utilisées pour les dosages des polyphénols totaux et les flavonoïdes.



Courbe d'étalonnage des polyphénols [DO = f (concentration en acidegallique)](mg/ml)



Courbe d'étalonnage des flavonoïdes [DO = f(concentration en quercitine)](
mg/ml)