

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université M'HAMED BOUGARA Boumerdès.



Faculté Des Sciences de L'Ingénieur
Département Technologie Alimentaire
Laboratoire de Recherche de Technologie Alimentaire

MEMOIRE DE MAGISTER
Option : Technologie Alimentaire

Thème:

**Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages
bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica
intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*)**

Présenté par : M^{elle} FERHOUM Fatiha

Soutenu devant le jury composé de :

Mr BENAMARA Salem	Pr	UMBB	Président
Mr HOCINE Smaïn	Pr	UMMTO	Examineur
Mr BERKANI Mohamed-Laid	MC/ A	ENSA	Examineur
Mr HACHEMI Messaoud	Pr	UMBB	Promoteur
Mr MOHAMMEDI Arezki	MC/ A	UMBB	Co- Promoteur

Année universitaire 2009-2010

Résumé

La présente étude porte sur la caractérisation physico-chimique de la propolis locale, cette fameuse matière est très précieuse à cause de ses propriétés thérapeutiques qui sont liées directement à sa composition.

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 14 échantillons de propolis récoltés dans différentes régions bioclimatiques du pays (Montagne, Plaine et Steppe) et deux races d'abeilles (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*). La caractérisation physico-chimique et biochimique des différents échantillons de propolis, ainsi que l'évaluation de leurs activités anti-oxydantes constituent un point de départ pour cette action.

Par cette caractérisation, que nous estimons un outil indispensable à la constitution d'une base de données sur la propolis locale, les utilisateurs pourront bénéficier d'un support réel qui facilite leurs tâches.

L'étude expérimentale révèle une variation significative entre les échantillons analysés : Humidité + Matières volatiles (1,26 – 3,89 % de MB) ; le taux de cendre (1,58 – 5,32 % MB) essentiellement composé de (K, Na, Zn et Fe) ; la valeur de pH et de l'acidité affirme que la propolis est de nature acide ; l'étude de la composition montre que la propolis est riche en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) par contre pauvre en acide ascorbique (vitamine C), sucres et protéines. Enfin le rendement d'extraction des composés de la propolis est conditionné par la matrice de solvant et le temps de contact.

En comparant les résultats de nos analyses selon les régions, on constate que le groupe saharien montre une meilleure activité antioxydante. Cela ne permet pas de dire que c'est l'abeille saharienne qui est en cause mais beaucoup plus la région.

Mots clés

Propolis Algérienne, *Apis mellifica intermissa*, *Apis mellifica sahariensis*, Etages bioclimatiques, Caractérisation, Valorisation, optimisation de l'extraction, Polyphénols, Flavonoïdes.

Abstract

The aim of this study is the physicochemical characterization of the Algerian propolis, this famous product which is very valuable because of its therapeutic properties directly related to its composition.

This work is a modest contribution to ensure recovery of this product and to assign it an identity card. Fourteen samples of local propolis, were analyzed, giving a special attention to bioclimatic collecting regions (mountains, plains and steppe) and two races of bees (*Apis mellifica intermissa* and *Apis mellifica sahariensis*). The physico-chemical, biochemical properties and evaluation of antioxidant activities were assessed.

With this characterization, we hope make an essential tool for the creation of a database on local propolis for all users.

The experimental study revealed significant differences between analyzed samples: Moisture +Volatile matter were about (1.26 to 3.89% of MB), the rate of ash was between (1.58 and 5.32% MB). Mainly mineral composition (K , Na, Zn and Fe), pH and titrable acidity confirm that propolis is an acidic nature, the analysis shows that samples were rich in phenolic compounds (polyphenols and flavonoids) , but very poor in ascorbic acid (vitamin C), sugars and proteins. Finally, we show that the extraction yield was conditioned by solvent matrix and contact time.

By comparing the results of our analysis by regions, we noted that the group Saharian shows a better antioxidant activity. This does not allow to say that the bee *Apis mellifera sahariensis* is involved but much more is the region.

Keywords

Algerian Propolis, *Apis mellifica intermissa* *Apis mellifica sahariensis*, Bioclimatic regions, characterization, valorization, optimization of the extraction yield, polyphenols, flavonoids.

ملخص.

يتميز العكبر (Propolis) بخصائصه العلاجية الفعالة و التي لها علاقة مباشرة مع مكوناته الكيميائية المتعددة. لفحص الخصائص الفيزيوكيميائية للعكبر المحلي لنوعين من النحل (*Apis mellifica intermissa* و *Apis mellifica Sahariensis*) و تقييمه قمنا بتحليل 14 عينة جمعت من 3 مناطق مختلفة مناخيا (الجبال، السهول، الهضاب) و ذلك بدراسة الخصائص الفيزيوكيميائية و البيوكيميائية اضافة الى تقييم النشاط المضاد للاكسدة اعتمادا على هذه الخصائص يمكننا بناء قاعدة بيانات للعكبر المحلي من شأنها تسهيل المهام للمستخدمين. اثبتت نتائج الدراسة التطبيقية هذه العينات تفاوتا كبيرا من حيث الكم و النوع . اد بلغت نسبة الرطوبة و المواد المتطايرة (1,26 – 3,89 % de MB) نسبة الرماد المتكونة اساسا من (K, Na, Zn, Fe) بلغت (1,58 – 5,32 % MB) . العينات المدروسة للعكبر ذات طابع حامضي بالنظر الى الـ pH المنخفض و درجة الحموضة العالية . بينت دراسة مكونات العكبر انه غني بالفينولات و الفلافونويدات و فقير من حيث البروتينات السكريات و فيتامين .

مردود استخلاص مكونات العكبر يخضع لنوعية المذيب المستعمل وكذا زمن التفكيك. بمقارنة نتائج تحاليلنا حسب المناطق، نلاحظ أن المنطقة الصحراوية بينت أفضل نشاط مضاد للأكسدة ، ذلك لا يعني أن السبب يعود إلى نوع النحل بل بسبب المنطقة .

الكلمات الدالة

العكبر, *Apis mellifica intermissa*, *Apis mellifica Sahariensis*, استغلال, الخصائص الفيزيوكيميائية, الاستخلاص الامثل، المناطق المختلفة مناخيا، الفينولات و الفلافونويدات

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dieu tout puissant de nous avoir donné le savoir et la faculté de pouvoir poursuivre nos études et de choisir un métier aussi noble.

Je remercie particulièrement Mr. HACHEMI. M. mon promoteur, professeur à l'UMBB, pour l'intérêt qu'il a accordé au sujet proposé, ses conseils et ses encouragements, m'avoir facilité les procédures administratives durant la réalisation de mon projet.

Je tiens à remercier aussi, Mr. MOHAMMEDI A. mon Co-promoteur, Maître de conférence, à l'UMBB, pour sa fourniture des échantillons de propolis étudiés, ses conseils, ses discussions enrichissantes, ses orientations et ses encouragements.

Je remercie Mr BENAMARA S., Professeur à l'UMBB, pour l'honneur qu'il ma fait en présidant mon jury, pour son aide précieuse et ses orientations.

J'exprime ma reconnaissance à Mr HOCINE S., professeur à l'université de Tizi-Ouzou d'avoir honorer ce travail en acceptant de l'examiner.

Je remercie Mr BERKANI Mohamed-Laid, Maître de conférences à l'Institut National Agronomique, d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner.

A Melle HADERBACHE L. Chargée de cours à l'université de Boumerdes (UMBB) j'exprime ma profond gratitude pour sa spontanéité, ses encouragements, sa disponibilité lors de quelques analyses, et, tout ce qu'elle a fait pour me facilité l'avancement de mon travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à Mr MEDDAHI, pour son aide Lors de la réalisation de plan de mélange.

Je remercie Mme GOUGAM H., Chargée de cours à l'UMBB, pour ses conseils, orientations et ses encouragements.

Je tien à remercier l'ensemble des apiculteurs qui m'ont fourni quelques échantillons de propolis.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier, Hidous K. (LRTA) et les laborantins(es) du DTA.

Je tiens à remercier également tous (tes) mes camarades, et surtout les post-Graduants technologie alimentaires, promotion 2007.

Dédicace

À ma mère et mon père ;

À mes frères ;

À ma sœur ;

À mes belles sœurs ;

À toute ma famille et

À mes amis (es)...

... bien faible témoignage d'affection.

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la propolis

Tableau I-1 : La source botanique de la propolis selon les différentes régions	7
Tableau I-2 : Comparaison entre la composition de Peuplier (<i>Populus nigra</i>) et celle de la propolis.....	9
Tableau I-3 : La concentration minimale d'inhibition de la propolis de Grèce sur certains germes (MIC : mg /ml).....	16

Chapitre II : Caractéristiques physico chimiques de la propolis

Tableau II-1 : composition moyenne de la propolis.....	21
Tableau II-2 : La composition des différentes propolis en polyphénols.....	22
Tableau II-3 : Les flavonoïdes identifiés dans la propolis.....	26
Tableau II-4 : Quantité des flavonoïdes des propolis de diverses régions.....	27
Tableau II-5 : les acides aliphatiques détectés dans la propolis.....	29
Tableau II-6 : Influence de la race d'abeille sur la composition en acide aliphatique de la propolis.....	30
Tableau II-7 : l'acide benzoïque et ses dérivés.....	31
Tableau II-8 : les composés benzaldéhydiques.....	31
Tableau II-9 : la composition en acide aromatique selon la race d'abeille.....	33
Tableau II-10 : la composition de la propolis en Esters aromatiques.....	33
Tableau II-11 : les sucres et les sucres alcooliques de la propolis.....	34
Tableau II-12 : l'influence de la région géographique sur la composition en sucre de la propolis.....	34
Tableau II-13 : Composition minérale de quelques échantillons de propolis de l'Argentine.....	35
Tableau II-14 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne.....	36

Partie expérimentale

Chapitre III : matériel et méthodes

Tableau III-1 : les échantillons de la propolis.....	38
Tableau III-2: Préparation des dilutions de l'acide gallique pour la réalisation de la courbe standard des polyphénols totaux.....	47
Tableau III-3 : Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	49
Tableau III-4 : proportion des différents solvants dans les mixtes.....	55

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau IV-1 : les pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de propolis.....	58
Tableau IV-2 : Taux des cendres et de la matière organique de la propolis.....	60
Tableau IV-3 : comparaison de taux des cendres entre les trois groupes.....	61
Tableau IV-4: Masse volumique des différents échantillons de propolis.....	62
Tableau IV-5 : comparaison de la masse volumique entre les trois groupes.....	62
Tableau IV-6: le point de fusion des différents échantillons de propolis.....	63
Tableau IV-7 : comparaison de point de fusion entre les trois groupes.....	63
Tableau IV-8: comparaison du pH entre les trois groupes.....	64
Tableau IV-9: Acidité des différents échantillons de propolis.....	65
Tableau IV-10 : comparaison du pourcentage d'acidité titrable entre les trois groupes...	65
Tableau IV-11 : les différentes valeurs de EC ₅₀ pour le pouvoir réducteur.....	70
Tableau IV-12 : Valeurs d'EC ₅₀ des différents échantillons de propolis analysés.....	73
Tableau IV-13 : Teneur en polyphénols des différents échantillons de propolis.....	76
Tableau IV-14: la teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis.....	81
Tableau IV-15: Influence de la région sur la teneur en flavonoïdes de la propolis d'abeille.....	83
Tableau IV-16: Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante.....	85
Tableau IV-17 : Teneur de l'acide ascorbique des différents échantillons de propolis.....	86
Tableau IV-18: Corrélation entre la teneur en acide ascorbique et l'activité antioxydante	87
Tableau IV-19 : Teneur en sucres totaux et réducteurs des différents échantillons de	

propolis.....	88
Tableau IV-20 : Comparaison de la teneur moyenne (g Glucose /100g propolis) en sucres réducteurs entre les trois groupes.....	88
Tableau IV-21 : Comparaison de la teneur (g Glucose /100g propolis) en sucres totaux entre les trois groupes.....	89
Tableau IV-22 : Teneur en protéines solubles des différents échantillons de propolis.....	90
Tableau IV-23 : comparaison de la teneur en protéines (g/100gde propolis) entre les trois groupes.....	91
Tableau IV-24: Concentrations en polyphénols dans les extraits de propolis en fonction de la composition des mixes de solvants utilisés.....	96
Tableau IV-25 : la matrice de Cheffé.....	98
Tableau IV-26 : les coefficients du modèle mathématique.....	99
Tableau IV-27: les réponses calculées à partir du modèle.....	100
Tableau IV-28 : Les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis du groupe montagne par les différents solvants.....	104
Tableau IV-29: les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis de la plaine par les différents solvants : Adsorbant gel de silice.....	105
Tableau IV-30: les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis de la plaine par les différents solvants.....	106
Tableau IV-31 : Teneur moyenne des métaux analysés.....	111
Tableau N° IV-32 : Variables et individus utilisés.....	113
Tableau N° IV-33 : Représentation des données.....	114
Tableau N° IV-34 : Résultats des paramètres descriptifs.....	114
Tableau N° IV-35 : Matrice de corrélation globale.....	115
Tableau N° IV-36 : Valeurs propres.....	116
Tableau N° IV-37 : Corrélation entre les variables et les axes principaux.....	118

Liste des figures
Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la propolis

Figure.I-1 : propolis brut provenant de la montagne Algérienne.....	4
Figure.I-2 : Plante de Mahang(Macaranga Tanarius).....	8
Fig. I.3 : Plantes origines de la propolis algérienne (région montagne : Yakouren).....	10
Figure.I-3 : Raclage de la propolis sur les cadres de la ruche.....	13
Figure.I-4 : Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis.....	14

Chapitre II : Caractéristiques physico chimique de la propolis

Figure. II-1 : structure chimique commune des flavonoïdes.....	23
Figure. II-2 : La formation de la structure quinone.....	24
Figure. II-3 : la structure des flavonoïdes identifiés par HPLC/SM dans la propolis.....	28
Figure. II-4 : la structure de l'acide benzoïque et ces dérivés.....	31
Figure. II-5 : la structure des composées benzaldéhydiques.....	31
Figure. II-6 : Structures chimiques des principaux acides cinnamiques.....	32

Partie expérimentale

Chapitre III : matériel et méthodes

Figure.III-1 : Propolis de Yakouren 2008.....	37
Figure.III-2 : Propolis Saharienne dégradée.....	37
Figure.III-3 : propolis de Mitidja 2007.....	37
Figure.III-4 : propolis Saharienne (Ain Seffra) 2007.....	37
Figure.III-5 : Cartes géographique montrant les stations de récolte.....	39
Figure.III-6 : diagramme de détermination de pouvoir réducteur de la propolis.....	44
Figure.III-7 : réduction du radical libre DPPH en DPPH ₂	45
Figure.III-8 : Etapes de test DPPH.....	45
Figure.III-9 : Principales étapes d'extraction des polyphénols.....	46
Figure.III-10 : organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux.....	48
Figure.III-11 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes dans l'extrait de propolis.....	49
Figure. III-12 : Complexation des sucres réducteurs en présence de réactif de DNS.....	50

Chapitre IV : Résultats et discussion

Figure. IV-1 : Valeur de pH des différents échantillons de propolis.....	64
Figure. IV-2. Corrélation entre le pH et l'acidité titrable.....	66
Figure. IV-3 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis de la région bioclimatique de la montagne.....	67
Figure. IV-4 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis des échantillons du groupe plaine.....	68
Figure. IV-5 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis des échantillons du groupe steppe.....	68
Figure. IV-6: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région plaine.....	71
Figure. IV-7: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région Montagne.....	71
Figure.IV-8: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région steppe.....	72
Figure.IV.9.a : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur (région plaine).....	74
Figure.IV-9.b : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur (région montagne).....	74
Figure.IV-9.c : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur (Steppe).....	75
Figure. IV-10 : Comparaison de la teneur en polyphénols totaux entre les trois groupes..	77
Fig. IV-11.a : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur (Région Montagne).....	78
Figure.IV-11.b : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur(Région Plaine).....	78
Figure. IV-11.c : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur(Steppe).....	79
Figure. IV-12.a : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir anti-radicalaire (Région Plaine).....	89
Figure. IV-12.b : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir anti-radicalaire (Région Montagne).....	89
Figure. IV-12.c : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir anti-radicalaire (Steppe).....	80
Figure. IV-13 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes.....	81
Figure. IV-14 : Comparaison de la teneur en Flavonoïdes entre les trois groupes.....	82

Figure. IV-15.a : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux. (Région Montagneuse).....	84
Figure. IV-15.b : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux. (Région plaine).....	84
Figure. IV-15.c : Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux. (Steppe).....	84
Figure. N° IV-16 : Comparaison de la teneur en acide ascorbique entre les trois groupes (Montagne, plaine et la Steppe).....	87
Figure. IV-17 : Taux de l'azote total.....	91
Figure. IV-18 : le taux d'extraction à froid avec des différents solvants.....	92
Figure. IV-19 : le taux d'extraction a chaud.....	92
Figure. IV-20 : Influence de temps sur le taux d'extraction.....	94
Figure. IV-21 . Evolution du rendement d'extraction à travers le temps.....	95
Figure. IV-22 : Concentration en polyphénols en fonction des différentes mixtes de solvant.....	96
Figure. IV-23 Graphique de surface de mélange de concentration en polyphénols.....	97
Figure. IV-24 : Graphique de contour de mélange de concentration en polyphénols.....	97
Figure. IV-33 : Représentation graphique des valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées	101
Figure. IV-25 : Chromatogrammes des extraits éthanolique de propolis (phase mobile : Ether de pétrole et acétate éthylique).....	106
Figure. IV-26 : RMN, L'extraction à chaud dans l'Ethanol (70 %), la propolis Saharienne.....	107
Figure. IV-27 : RMN, L'extraction par macération dans l'Ethanol (70%), la propolis Saharienne	107
Figure. IV-28 : RMN, Extraction par le Méthanol, propolis montagneuse (Yakouren 2006).....	108
Figure. IV-29 : RMN, Extraction par l'Ethanol (70%), propolis montagneuse. (Yakouren 2006).....	108
Figure. IV-30 : RMN, l'extraction Ethanolique de la propolis de Yakouren 2007.....	109
Figure. IV-31 : Graphique du cercle des corrélations des variables.....	119
Figure. IV-32 : Représentation des individus sur le plan D1 et D2.....	120



SOMMAIRE

Sommaire

Introduction générale.....	01
-----------------------------------	-----------

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralités sur la propolis

Introduction.....	03
I.1- Définition et Etymologie.....	03
I.2- Histoire de la propolis	04
I.3- provenance de la propolis.....	06
Théorie de l'origine interne.....	06
Théorie de l'origine mixte.....	06
I.4- la récolte de la propolis.....	11
I.4-1. La récolte de la propolis par les abeilles.....	11
I.4-1.1. Les procédés de récolte.....	11
I.4-1. 2. Les conditions de récolte.....	12
• L'âge de l'abeille.....	12
• La race.....	12
• La saison.....	12
• Le climat (dont la température).....	12
• La géographie.....	12
I.4-2. La récolte de la propolis par l'apiculteur.....	13
I.5- Utilisation de la propolis.....	13
I.5- 1. Utilisation de la propolis par les abeilles.....	13
I.5-2. Utilisation de la propolis par l'homme.....	13
I.5- 2. 1.Cosmétique.....	14
I.5- 2. 2. Médecine.....	14
I.5- 2. 3. Technologiealimentaire.....	14
I.6- Propriétés Pharmacologiques	15
I.6-1. Propriétés anti-infectieuse	15

I.6-1. 1. Activité antibactérienne.....	15
I.6-1. 2. Activité antifongique.....	16
I.6-1. 3. Activité antivirale.....	17
I.6-2. Propriétés anti-oxydante et anti-radicalaire.....	17
I.6-3. Propriétés anticancéreuses.....	17
I.6- 4. Propriétés anti-inflammatoires.....	17
I.6- 5. Propriétés digestives.....	17
I.6- 6. Autres propriétés.....	18

Chapitre II

Caractères physico chimiques de la propolis

Introduction.....	19
II-1. Propriétés physiques de la propolis.....	19
II-1.1. Caractéristiques organoleptiques.....	19
II-1.1.1. Couleur.....	19
II-1.1. 2. Saveur.....	19
II-1.1. 3. Odeur.....	19
II-1. 2. Consistance.....	20
II-1. 3. solubilité.....	20
II-1. 4. Densité.....	20
II-2. Composition de la propolis brute	20
II-3. Composition de la propolis purifiée	21
II-3.1 : Flavonoïdes.....	23
a- Flavanols et Flavones.....	25
b- Chalcones et dihydrochalcones.....	25
c- Flavonone.....	25
II- 3. 2 :Acides aliphatiques.....	29
II- 3.3. Les acides aromatiques.....	30
a- Dérivés de l'acide benzoïque.....	30
b- Dérivés de benzaldéhydiques.....	31
c- Dérivés de l'acide cinnamique.....	32
II- 3.4 : Esters aromatiques.....	33

II- 3.5: Sucres de la propolis.....	34
II- 3.6 : Eléments minéraux de la propolis.....	35
II- 3.7 : Vitamines.....	35
II- 3.8 : Autres composés chimiques.....	35
a- Les hydrocarbures aliphatiques.....	36
b- Les Sesquiterpènes.....	36
II-4 : Composition de la propolis Algérienne.....	36

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

III -1.Présentation de la matière première.....	37
III-2. Les méthodes d'analyse	39
III-2.1. Les méthodes physiques	39
III-2.1.1. Détermination de taux des pertes pendant le séchage.....	39
III-2. 1.2. Détermination de la teneur en cendres.....	40
III-2. 1.3. La masse volumique.....	41
III-2. 1.4. Le point de fusion.....	41
III-3. Méthodes d'analyses chimiques.....	42
III-3.1. Détermination du pH.....	42
III-3.2. Détermination de l'acidité titrable.....	43
III-4. Evaluation de l'activité antioxydante	43
III-4.1. Détermination de pouvoir réducteur de propolis.....	43
III-4.2. Activité anti-radicalaire.....	45
III-5. Quantification de quelques composés principaux de la propolis.....	46
III -5.1. dosage des polyphénols de la propolis.....	46
• Extraction des polyphénols.....	46
• Détermination de la teneur en polyphenols totaux.....	47
III -5. 2. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	49
III -5. 3. Détermination de la teneur en acide ascorbique des extrais éthanoliques de la propolis	50
III -5. 4. Détermination de la teneur en sucres.....	50
III -5. 4. 1. Détermination de la teneur en sucres réducteurs.....	50

III -5. 4.2. Dosage des sucres totaux.....	51
III -5. 6. Dosage des protéines.....	52
III -5. 6.1. Détermination de la teneur azote totale (Méthode de Kjeldahl).....	52
III -5. 6. 2. Dosage des protéines solubles.....	52
• Extraction des protéines soluble de la propolis brute	52
• Quantification des protéines solubles.....	53
III -6. Extraction des composées de la propolis.....	53
III -6. 1. Détermination de taux d'extraction par différents solvants.....	53
➤ Extraction à froid (macération).....	54
➤ Extraction à chaud.....	54
III -6. 2. Etude de l'influence de temps sur le rendement d'extraction.....	54
III -6. 3. Optimisation de l'extraction des principes actifs de la propolis par combinaison de mélange de solvants.....	54
III -7. Analyse de la composition de l'extrait de propolis.....	55
III -7. 1. Analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM).....	55
III -7.2. Caractérisation des extraits de propolis par RMN.....	56
III -7.3. Détermination de la teneur en éléments minéraux	56
III.8. Etude statistique	57

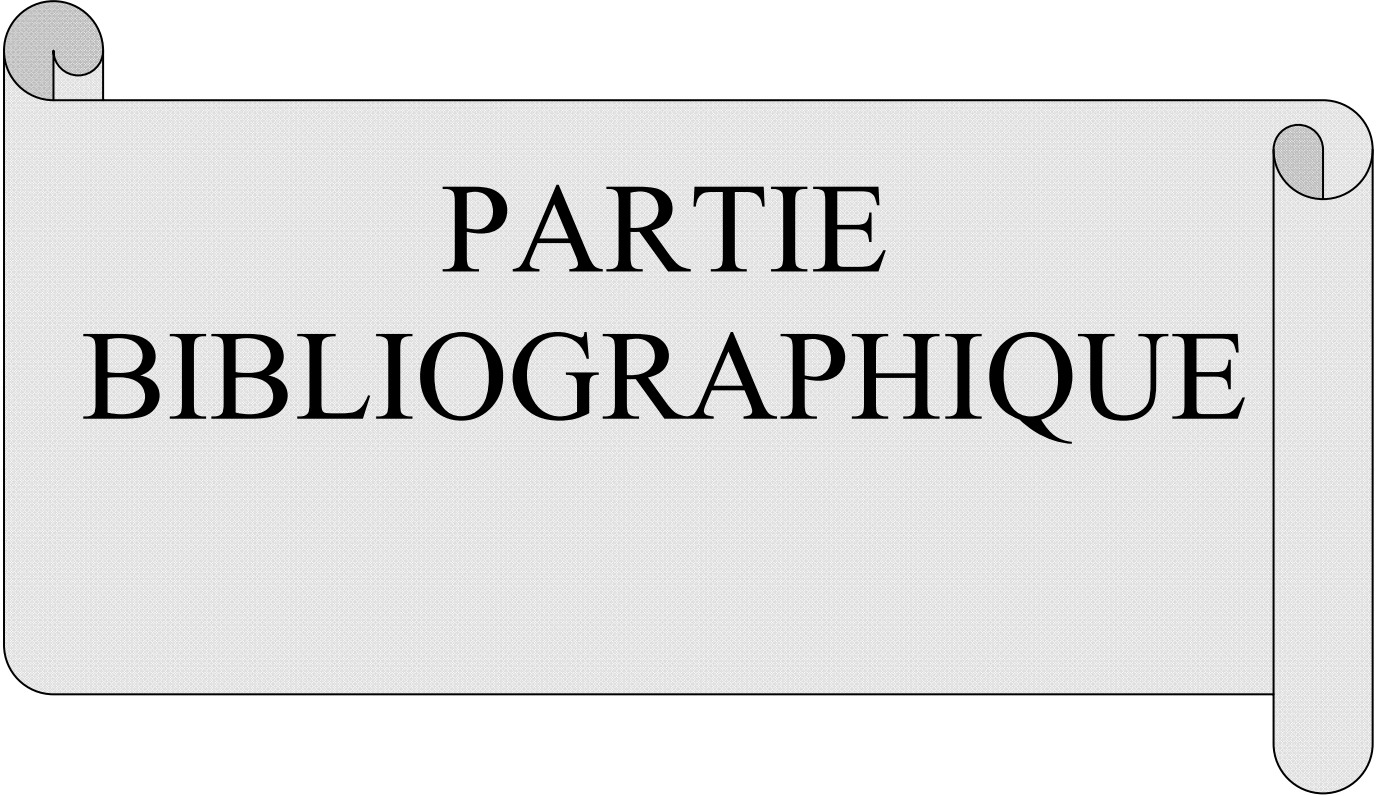
Chapitre IV

Résultats et discussion


IV-1. Les résultats des analyses physiques	58
IV-1. 1. Pertes pendant le séchage.....	58
IV-1. 2. Taux de cendres.....	60
IV-1. 3. Masse volumique de la propolis brute	61
IV-1. 4. Point de fusion.....	63
IV-2. Résultats d'analyses chimiques.....	64
IV-2. 1. Détermination de pH de la propolis.....	64
IV-2. 2. Détermination de l'acidité titrable de la propolis brute.....	65

• Corrélation entre le pH et le pourcentage de l'acidité.....	66
IV-3. Résultats de l'évaluation de l'activité anti-oxydante	67
IV-3. 1. Pouvoir réducteur.....	67
IV-3. 2. Activité anti-radicalaire au radical DPPH.....	71
➤ Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur.....	74
IV-4. Quantification de quelques composés principaux de la propolis.....	75
IV-4. 1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes.....	75
IV-4. 1.1. La teneur en polyphénols	76
• Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur.....	78
• Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir anti-radicalaire.....	97
IV-4. 1. 2. La teneur en flavonoïdes.....	81
• Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux.....	84
• Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et les activités antioxydantes de la propolis	85
IV-4. 2. Dosage de la vitamine C.....	85
• Corrélation entre la teneur en acide ascorbique et les activités antioxydantes de la propolis.....	87
IV-4. 3. Détermination de la teneur en sucres.....	88
IV-4. 4. Teneur en protéine soluble.....	90
IV-4. 5. Taux de l'azote total.....	91
IV-5. Extraction des composés de la propolis.....	92
IV-5. 1. Etude de taux d'extraction par des différents solvants.....	92
IV-5. 1.1. L'extraction à froid.....	92
IV-5. 1. 2. L'extraction à chaud.....	92
IV-5. 2. L'influence du temps de contact sur le taux d'extraction.....	94
IV-5. 3. Optimisation de l'extraction des principes actifs de la propolis par combinaison de mélange de solvants	95
IV-6. Résultats d'analyse de la composition de l'extrait de propolis.....	102
IV-6. 1. Analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM).....	102
IV-6. 2. Résultats de la caractérisation des extraits de propolis par la résonance magnétique et nucléaire (R M N).....	107

IV-6. 3. Composition de la propolis en Métaux	111
IV-7. Etude de la composante principale.....	113
IV-7. 1. Présentation des données.....	113
IV-7. 2. Analyse de la composante principale (ACP) globale.....	115
IV-7. 3. Analyse ACP proprement dite.....	116
IV-7. 3.1. Détermination des valeurs propres.....	116
IV-7. 3.2. Qualité de la représentation des variables.....	117
IV-7. 3.3. Etude des liaisons entre les variables.....	119
IV-7. 3.4. Représentation des individus dans les nouveaux axes.....	120
Conclusion.....	121



PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE



**INTRODUCTION
GENERALE**

Introduction générale

A l'époque d'Aristote, la propolis était appelée les larmes des arbres [1]. En effet, c'est une substance naturelle résineuse collectée par les abeilles soit sur des bourgeons d'arbres tels que le peuplier, le chêne, l'aulne, etc, soit sur des conifères, amalgamée à une sécrétion salivaire des abeilles [2;3;4;5]. Elle a une odeur balsamique et une couleur variable selon ses origines végétales, elle varie du jaune clair au brun très foncé presque noir. [2].

Généralement, elle est constituée de 40 % à 50 % de résine de baume (composée de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters), 20 à 30 % de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille), 5 à 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières diverses (organiques et minérales) [1 ; 2 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9]. Le fractionnement de la propolis pour l'identification de ses composées est très difficile à cause de sa nature complexe [10]. On peut la séparer en deux fractions, suivant sa solubilité (partie balsamique) ou pas dans l'éthanol.

Ce produit de la ruche est très précieux en raison de ses propriétés antioxydantes [11 ; 12 ; 13 ; 14], antibactériennes [3 ; 11 ; 14 ; 15], antivirales [3 ; 11], anticancers [11] et thérapeutiques liées à sa composition en polyphénols et flavonoïdes. À cet effet, la propolis est extensivement utilisée dans l'industrie alimentaire, la médecine, la cosmétologie et en médecine vétérinaire. [2].

Cette étude est réalisée afin de pouvoir identifier les caractéristiques physico-chimiques de la propolis Algérienne, et d'exploiter ses vertus. Elle a été motivée par :

- La volonté de valoriser un sous produit de la ruche ;
- La nécessité d'analyser un produit local, et d'établir sa carte d'identité en déterminant ses caractéristiques physico-chimiques;
- Avoir une connaissance des éléments chimiques présents dans la propolis Algérienne, afin d'améliorer son utilisation ;
- La mise à la disposition des populations d'un produit naturel, présentant une activité thérapeutique inestimable ;
- déterminer l'influence de la région pédoclimatique, ainsi que la race d'abeille sur la composition de la propolis.

Notre document sera donc composé de quatre chapitres, initié par une recherche bibliographique sur un abrégé de l'histoire et l'étymologie de la propolis d'abeille, ainsi que son utilisation au cours des siècles et ses activités biologiques. Le deuxième chapitre élucide la composition complexe de la propolis, la classification de ses composés, ainsi que les résultats de la composition chimique des différents travaux qui ont été réalisés dans ce sens. La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (3^{ème} chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :

- Les analyses physico-chimiques des différents échantillons de propolis;
- Evaluation de son activité antioxydante par la détermination du pouvoir réducteur ainsi que l'estimation au moyenne de DPPH de la capacité des extraits éthanolique de la propolis à piéger les radicaux libre ;
- Quantification de quelques familles de ses principaux composés tels que les polyphénols, les flavonoïdes, des sucres et des protéines ;
- Etude des taux d'extraction par différents solvants organiques : essai de l'optimisation et modélisation de l'extraction en utilisant un mélange de solvants ;
- Analyse de la composition chimique des extraits de propolis par la résonance magnétique et nucléaire (RMN de proton), et par chromatographie sur couche mince (CCM) ;
- Détermination du profil en minéraux par la spectrométrie d'absorption atomique des différents échantillons de propolis.

Enfin, le quatrième chapitre discute les résultats obtenus dans cette étude.



CHAPITRE I :

Généralités sur la propolis

Chapitre I

Généralités sur la propolis

Introduction

La propolis est certainement un produit à ne pas négliger vu son importance comme matière première qui croît de jour en jour surtout dans le domaine de la médecine. Des fois, la question reste à poser : peut-on trouver dans la nature un produit plus extraordinaire que la propolis? Elle assure la protection du bourgeon de l'arbre, puis protection de la ruche, et enfin protection de l'homme.

Les abeilles spécialisées récoltent des substances résineuses, sur les bourgeons de certains arbres [16]. Elles les mélangent avec les sécrétions de leurs propres glandes, de la cire et de pollen, et utilisent ce produit qu'on appelle "la propolis" au colmatage de fissures et au lissage de surfaces rugueuses à l'intérieur de la ruche. C'est donc une sorte de mastic particulièrement collant et robuste [17 ; 18].

La récupération de ce produit est relativement facile, il suffit de gratter les cadres ou des grilles spéciales placées dans la ruche [19].

La propolis joue un rôle important dans la médecine par ses innombrables vertus dont on peut citer ses effets bactéricides (contre un grand nombre de bactéries différentes, en particulier contre les agents pathogènes tels que les *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *staphylococcus aureus* et *Echerichia faecalis* [19 ; 20 ; 21 ; 22 ; 23 ; 24], Antiinflammatoires [25], fongicides [3], antiviraux [26] (surtout contre le virus de l'herpès) et cytotoxiques [27 ; 28].

I.1. Définition et Etymologie

La propolis, qu'on appelle aussi la colle d'abeille est le nom générique de la substance résineuse recueillie par les abeilles à partir de plantes variées telles que les peupliers, bouleaux, saules, conifères, etc [1; 7; 29].

Les abeilles l'utilisent à l'entrée de leurs ruche pour en protéger l'accès, c'est ce qui indique son étymologie Grecque « Pro » signifiant devant ou défense, et « Polis » signifiant la cité [30]. Une autre étymologie Latine a également été avancée venant de l'adverbe « Pro » qui veut dire dans le but et le verbe « Polis » qui signifie enduire [31].

Donc, en résumé, nous pouvons affirmer que la propolis est une substance visqueuse et fortement adhésive qui couvre les bourgeons et la résine des conifères (Fig. I-1), récolté par l'abeille et amalgamée peut être à une sécrétion salivaire de ces dernières [18]. Elle est employée par les abeilles pour sceller les trous et protéger l'entrée contre les intrus. Elles se servent aussi de cette substance pour momifier les petits rongeurs morts à l'intérieur de la ruche. Comme elles n'ont pas la force de les transporter à l'extérieur, elles les embaument pour éviter leur putréfaction [32].

Tous les apiculteurs connaissent cette matière résineuse. Dès que l'on ouvre une ruche, on en a aussitôt plein les doigts, et il est bien difficile de se débarrasser de cette substance gommeuse [32].



Fig. I-1 : propolis brute provenant de la montagne Algérienne.

I.2. Histoire de la propolis

La propolis est anciennement beaucoup moins connue que le miel, ses propriétés médicinales étaient déjà mises à profil vraisemblablement plusieurs millénaires avant notre ère. Plus tard, les Perses, les Grecs, les Romains et même les Incas l'ont utilisé [17].

Au cours du 1^{er} siècle avant J. C., le célèbre savant Latin Varron en fait état dans ses travaux ainsi que le poète Virgile dans ses écrits. A Rome, la propolis était très recherchée où elle se vendait plus cher que le miel. Chaque légionnaire Romain en possédait une petite quantité sur lui au moment des campagnes militaires [1 ; 17].

Puis au 2^{ème} siècle, c'est au tour du médecin Galien d'en faire mention dans ses traités. Au XI^e 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 » [1].

Connues des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles, elle est retrouvée également dans les livres de médecine de Géorgie à partir du 12^{ème} siècle.

En France, ce n'est qu'au début de 18^{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 19^{ème} siècle, on trouve quelques traces de son usage dans les traitements des plaies, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre de Boers en Afrique du Sud qu'elle connaît son apogée d'utilisation grâce à ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes [1; 17].

A la fin de 21^{ème} siècle, un important marché de la 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 [1].

Lors de la dernière guerre mondiale, la propolis a été expérimentée dans des cliniques Soviétiques.

Les applications de ce fameux produit sont de même très intéressantes dans la médecine vétérinaire empirique pour le traitement des hémorragies et des plaies de toute nature.

Son utilisation donc, sans avoir été permanente, s'est maintenue au fil des siècles et est à nouveau redécouverte de façon relativement récente par de nombreux chercheurs qui s'attachent et s'efforcent progressivement, depuis quelques années, d'expérimenter scientifiquement l'ensemble des données empirique de ce produit.

I.3. Provenance de la propolis

Depuis les temps les plus anciens, les apiculteurs se sont aperçus que les abeilles récoltaient la résine des bourgeons de divers arbres et en particulier celle du peuplier.

Cette ancienne hypothèse de l'origine externe de la propolis a été remise en question au début de siècle, et certains spécialistes estiment pour leur part que certaines variétés de propolis sont d'origine interne ou mixte [1].

- **Théorie de l'origine interne :** Selon KUSTENMACHER, la propolis est un résidu issu de la première phase de digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen appelé le gésier à pollen. La propolis serait ensuite régurgitée par l'abeille. La présence d'enveloppe de grains de pollen et de soie d'abeilles appuyait cette théorie.

Cependant des grandes divergences de composition chimique entre le pollen et la propolis rendent cette hypothèse peu vraisemblable.

- **Théorie de l'origine mixte :** Dans les années trente, PHILIP [1], affirme qu'il existait deux types de propolis. La véritable propolis est élaborée à partir du pollen dans le proventricule. Il lui attribua le rôle principal qui consiste à vernir l'intérieur des alvéoles avant la ponte de la reine. La propolis provenant des arbres est utilisée à des fins moins importantes telles que le rétrécissement du trou de vol ou l'embaumement de prédateurs.

On pense actuellement que la propolis trouvée dans la ruche est en grande partie, constituée par les résines recueillies sur les bourgeons de certains arbres, il s'agit de Peuplier surtout et aussi de Châtaigniers, Marronniers d'Inde, Sapins, etc [33].

- **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 [28; 33].

Il est bien connu qu'en Europe et dans les régions au climat tempéré. Les abeilles récoltent ses précieuses substances sur les bourgeons de Peupliers, les Bouleaux, les Aulnes, les Marronniers d'Inde, les Frênes, les Saules, les Epicéas et les Chênes, etc.[7]. Dans les autres régions, il existe d'autres plantes à part celles citées avant telles que la *Macaranga Tanarius* (Fig. I-2) en Okinawa [33]. La provenance de la propolis dépend de la région, de la flore botanique qui se situe à proximité immédiate des ruches et aussi aux préférences de l'abeille (Tableau I-1) [28].

Tableau I-1 : La source botanique de la propolis selon les différentes régions.

Genre et / ou espèces	Région géographique	Référence
Peuplier (<i>Populus nigra</i> , <i>Populus italica</i> , <i>Populus tremula</i>)	Bulgarie	[3 ; 33]
Peuplier (<i>Populus nigra</i>)	Albanie	[33]
Peuplier (<i>Populus suaveolens</i>)	Mongolie	[3 ; 33]
Peuplier (<i>Populus fremontii</i>)	USA (Mainland)	[3]
Plumeria (<i>Plumeria acuminata</i> , <i>Plumeria acutifolia</i>)	USA (Hawaiian Islands)	[3]
Peuplier (<i>Populus euramericana</i>)	United Kingdom	[3]
Bouleau (<i>Betula sp.</i>), Peuplier (<i>Populus sp</i>), Pin (<i>Pinus sp</i>), <i>Prunus sp</i> , <i>Acacia</i> .	Hungary	[3]
Bouleaux (<i>Betula sp</i>), Aulnes (<i>Alnus sp</i>).	Poland	[3]
Clusia(<i>Clusia sp</i>), <i>Delchampia sp</i>	Région Equatorial	[3, 33]
Clusia (<i>Clusia minor</i> et <i>Clusia major</i>)	Venezuela	[3]
Xanthorrhoea (<i>Xanthorrhoea sp</i>)	Australie	[29]
Peuplier (<i>Populus sp</i>), Bouleaux (<i>Betula sp</i>), Orme (<i>Ulmus sp</i>) et les Conifères.	La Zone tempérée Du Nord	[29]
Romarin des champs (<i>Baccharis dracunculifolia</i>), Peuplier (<i>Populus sp</i>),	Brésil	[24; 34;35;36]
Peuplier (<i>Populus sp</i>), Eucalyptus (<i>Eucalyptus sp</i>) et le Châtaignier (<i>Castanea sativa</i>).	Turkie	[24]
Bouleaux (<i>Betula Verrucosa</i>)	Russie	[34 ; 36]
Mahang (<i>Macaranga tanarius</i>)	Okinawa	[33]
Eucalyptus (<i>Eucalyptus sp</i>), Bouleaux (<i>Betula sp</i>), peupliers (<i>Populus sp</i>), Saule (<i>Salix sp</i>).	Uruguay	[24]

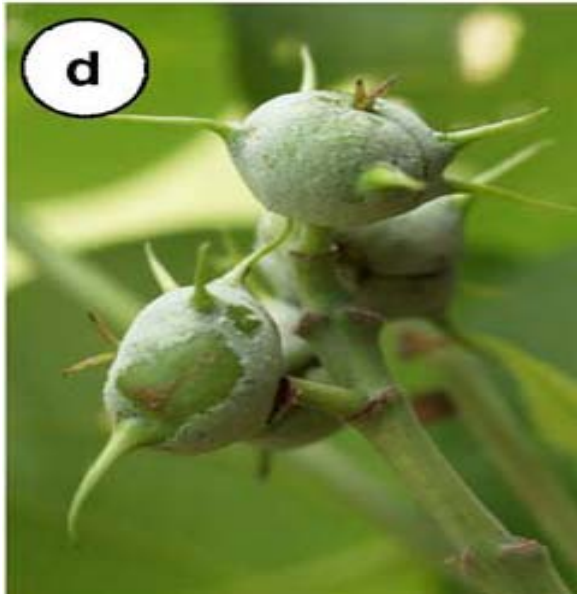


Fig.I-2 : Plante de Mahang (*Macaranga tanarius*) [33].

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*) (**Fig. I.3.a**) qui occupe les zones semi arides, le chêne (chêne liège et chêne zeen) (**Fig. I.3.b**) qu'on trouve au nord-est du pays, châtaignier (**Fig. I.3.c**), Cyprès (*Cupressus sp*)(**Fig. I.3.d**), 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) (Tableau N° I-2), nous pouvons conclure que : les échantillons analysés ont comme source principale le Peuplier (*Populus nigra*) avec la participation d'autres espèces. Sauf pour l'échantillon de Tizi-Ouzou, car on remarque l'absence de Pinocembrin, Pinobanksin, Chrysin et Galangin [37].

Tableau N° I-2 : Comparaison entre la composition de Peuplier (*Populus nigra*) et celle de la propolis [37].

Composés	Propolis standard de peuplier nigra	Tlemcen	Guelma	M'sila	Tizi-Ouzou
Pinocembrin	4,2 – 12,4	5,9	6,9	9,5	0,2
Pinobanksin	1,7 – 6,2	3,9	3,0	3,5	0,6
Chrysin	5,9 – 12,2	7,5	6,9	1,9	0,4
Galangin	6,6 – 10,3	8,5	6,9	1,9	0,4
Pentenyl cafféate	0,7 – 7,5	4,7	2,1	1,8	0,3
Benzyl cafféate	1,7 – 5,3	4,9	1,4	1,2	1,2
Acide diterpenique	/	2,0	8,6	20,1	9,1



Fig. I.3.a: pin (*Pinus sp.*).



Chêne liège

Chêne zeen

Fig. I.3.b : Chêne.



Résine du
sapin

Fig. I.3.e : Cyprés (*Cupressus sp.*)



Fig. I.3.c : Châtaignier

Fig. I.3 : Quelques plantes source de la propolis en Algérie.

I.4. la récolte de la propolis

La récolte de la propolis s'effectue d'abord par les abeilles et ensuite par l'homme [17].

I.4.1. La récolte de la propolis par les abeilles.

La récolte de propolis est faite par un nombre relativement restreint d'abeilles ouvrières butineuses, qui se trouvent dans la dernière partie de leurs existences [17]. Ces ouvrières sont certainement très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie, si ce n'est un travail en relation directe avec cette récolte, à savoir le colmatage à l'intérieur de la ruche [17].

a. les procédés de récolte

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

- A l'aide de ses antennes, l'abeille repère un morceau de propolis, puis avec ses mandibules elle en détache un fragment en s'aidant parfois de ses pattes antérieures ;
- Le morceau de propolis modelé par les mandibules est pris avec les pattes antérieures ;
- Celui-ci est alors transféré aux pattes du milieu ;
- Par un mouvement rapide la propolis est finalement déposée dans la corbeille des pattes postérieures, où elle est transportée jusqu' à la ruche [1, 17].

Toutes ces opérations demandent du temps mais se passent avec beaucoup de dextérité de la part de l'abeille qui n'est pas gênée du tout par la manipulation de ce matériau gluant, ce qui laisse donc supposer qu'elle est à même de se protéger sur ce plan par une sécrétion adaptée à la situation.

Au retour à la ruche, la butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières, soit au trou de vol, soit le plus souvent à l'endroit même où la substance est utilisée. Cette opération assez longue qui peut durer d'une à plusieurs heures [17].

b. Les conditions de récolte

Cette récolte ne répond pas à des règles bien définies et constantes, elle dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons dégager et analyser les plus notables [1 ; 17] :

- **L'âge 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 de dix-huit jours ;
- **La race** : la tendance à propoliser dépend de la race d'abeille. Il est reconnu que l'abeille grise des montagnes appelée encore Caucasienne (*Apis mellifica caucasia*) et certaines autres races d'Asie Mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent en général davantage que les autres, c'est le cas de l'abeille carniolienne (*Apis mellifica carnica*) et l'abeille Tellienne (*Apis mellifera*) [38]. Mais dans de nombreux autres cas, les données d'information en ce qui concerne ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises;
- **La saison** : la récolte a lieu, soit, en début de printemps, mais le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche d'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage ;
- **Le climat (dont la température)**: les abeilles récolteuses de propolis déploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température le plus souvent supérieure à 20°C) et en outre, pendant les heures les mieux exposées, à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne), ceci du fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires;
- **La géographie** : c'est ainsi, entre autres, que les ruches situées dans les régions boisées propolisent davantage que les ruches de plaine.

I.4.2. La récolte de la propolis par l'apiculteur

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses :

- Par raclage et grattage des cadres (**fig. I-3**) ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis, alors dure et friable, se détachant mieux ;
- Par des grilles spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité [1].

On élimine les déchets les plus grossiers et elle est ensuite dissoute à froid dans l'alcool éthylique à 70 % ce qui permet l'élimination de la cire [17].



Fig. I-4 : Raclage de la propolis sur les cadres de la ruche.

I.5. Utilisation de la propolis

I.5.1. Utilisation de la propolis par les abeilles

A l'intérieur de la ruche, la propolis sert de mastic de ciment ou de baume. Les abeilles l'emploient pour : [32]

- Assurer une meilleure isolation thermique ;
- Obturer les fissures ;
- Réduire l'ouverture de trou de vol dans les régions à climat froid ; (**Fig. I-4**)
- Recouvrir les corps étrangers (souris, cétoines, frelons.....etc.) qu'elles ne peuvent pas évacuer ;
- Réparer les rayons et renforcer les minces parois des alvéoles en l'incorporant à la cire que l'abeille sécrète ;
- Stériliser les alvéoles avant la ponte.



Fig. I-5 : Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis [6].

I.5.2. Utilisation de la propolis par l'homme

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

a- Cosmétique

La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique [39]. 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 [6].

b- Médecine

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.

Elle est utilisée aussi dans le soutien et l'amélioration du système immunitaire [6; 40].

c- 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 [6].

La propolis peut être utilisée comme préservatifs en matériel d'emballage de nourriture [41]. Elle est aussi utilisée pour la prolongation de la vie d'entreposage en congélation des poissons [17].

I.6. Propriétés Pharmacologiques: la propolis possède un large spectre d'activité biologique.

I.6.1. Propriétés anti-infectieuse

Elle présente des propriétés antimicrobiennes (antibactériennes, anti-fongiques, anti-parasitaires et antivirales) et probablement immunostimulantes : elle active les fibrocytes et inhibe l'histaminosécrétion des mastocytes [19].

Le mécanisme d'action n'a pas pu être mis en évidence, il semble être multifactoriel.

a- Activité antibactérienne

Ces propriétés sont étendues et importantes sur de nombreuses souches bactériennes.

La première étude dans ce sens a été réalisé par *White en 1906*, cité par [1] qui montra que l'intérieur de la colonie d'abeilles était à peu près dépourvue de micro-organismes. Il n'étudia pas la propolis mais il remarqua que les rayons de cire contenaient très peu de bactéries contrairement à toutes attente, or, il se trouve que les rayons sont recouverts d'une mince pellicule de propolis, c'est donc elle seule qui est en contact avec le milieu de culture.

La propolis est bactéricide efficace pour les germes comme *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus ogyenes*, *Escherchia faecalis*, *Escherchia coli*, *Salmonilla typhimurium*, *Listeria innocua*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, et enfin *Pseudomonas aeruginos* [24; 42; 43; 44; 45].

On attribue cette activité au groupe de flavonoïdes en particulier la galangine qui semble avoir un effet anti-staphylococcique très important [19], mais aussi aux acides caféïque, férulique, gallique et salicylique.

La propolis est souvent nommée « antibiotique naturel ». Un grand nombre d'études ont montré les résultats suivants :

- La propolis de l'Argentine a montré un effet positif contre *Staphylococcus aureus*, ainsi que sur *Escherichia coli* (ATCC 25922) [46; 47];
- La *Salmonella Typhimurium* a été inhibée par la propolis du Brésil et de la Bulgarie [48; 49];
- la propolis de la région de la Grèce a montré un effet positif sur un nombre important des germes (**Tableau I-2**) [50].

Tableau I-3 : La concentration minimale d'inhibition de la propolis de la Grèce sur certains germes (MIC : mg /ml).

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Nord east	6,80	5,60	5,70	5,80	4,90	5,70	4,30
Centre west	5,30	7,20	6,90	7,90	3,80	5,40	5,10
Nord west	6,50	6,40	7,10	7,90	3,90	5,90	5,50

b- Activité antifongique

La propolis a une activité antifongique importante, c'est ce qui permet aux cadavres présents dans la ruche dont les abeilles ne peuvent se débarrasser de ne pas moisir [1].

Elle a des effets antimycosiques, contre les germes appartenant au genre *Candida* et contre les levures. Elle s'est montrée efficace dans l'infection à la *Giardia lamblia* (oxyurose) comme la métronidazole [19].

Il existe cinq constituants de la propolis possédant une activité antifongique significative, il s'agit du Pinobanksol-3-acétate, du Pinocembrine, de l'acide coumarique et de l'acide caféique [1].

c- Activité antivirale

Il y a peu d'études qui ont été réalisées sur l'activité antivirale de la propolis [3]. Mais la propolis provenant du Brésil s'est montrée active contre le virus de la grippe (A et B en particulier). L'ester Phényléthylique de l'acide Caféique (CAPE) est un des plus puissants agents anti-intégrase de VIH. La propolis est également anti-herpétique [19; 51].

I.6.2. Propriétés anti-oxydante et anti-radicalaire

Des extraits enrichis en flavonoïdes et en polyphénols issus de la propolis présentent des propriétés anti-oxydantes très importantes par inhibition de la lipoperoxydation de l'acide Linoléique [19; 52]. L'activité anti-radicalaire est mise en évidence vis-à-vis du radical DPPH. C'est la fraction la plus concentrée en flavonoïdes qui réduit le mieux les radicaux libres en protégeant les lipides et autres substances comme la vitamine C. C'est pour cette raison qu'on recommande la prise de la propolis au même temps que l'acide ascorbique [53].

I.6.3. Propriétés anticancéreuses

Elle a un effet cytotoxique qui permet d'inhiber les cellules tumorales Hela avec une CI_{50} de 7,45 $\mu\text{g/ml}$. La propolis verte du Brésil fait l'objet de plusieurs recherches, au Japon entre autres, pour ses propriétés anticancéreuses [19; 54].

I.6.4. Propriétés anti-inflammatoires

L'extrait de propolis et le CAPE qu'elle contient inhibent l'œdème induit par la carragénine et par l'arthrite [19; 55].

La propolis, par ses flavonoïdes, retarde l'inflammation de la pulpe dentaire qu'elle protège en la chapotant et simule la réparation de la dentine. Cet effet est utilisé dans l'inflammation de la gencive [3].

I.6.5. Propriétés digestives

Elle est inhibitrice des spasmes des voies digestives. Elle protège l'estomac contre des lésions induites par l'éthanol. L'extrait de propolis agirait en inhibant la lipoxygénase et protège la muqueuse gastrique du stress oxydatif.

L'ester phényléthylique du CAPE de la propolis atténue les symptômes de la colite induite par le peptidoglycane-polysaccharide bactérien en inhibant les NF-KappaB produites dans les macrophages, réduisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires [19].

I.6.6. Autres propriétés

Beaucoup d'autres propriétés biologiques et pharmacologiques des propolis ont été décrites par divers auteurs, y compris la régénération des tissus, l'activité hepatoprotective, action immunomodulatrice, etc [3].



CHAPITRE II :

Caractéristiques physico- chimiques de la propolis

Chapitre II

Caractéristiques physico-chimiques de la propolis

Introduction

La caractérisation physico-chimique de la propolis est très importante pour l'obtention d'un produit de qualité standardisé, tel que le réclame le marché.

La variété des sources de propolis a, bien évidemment, une influence sur sa composition. Plus de 150 constituants ont déjà été mis en évidence et identifiés, sans compter les substances insolubles dans les solvants organiques. Cette liste de noms et de formules est cependant encore très incomplète [1].

La propolis est récoltée sur une grande variété d'arbres et d'arbustes. Chaque région et chaque colonie, semble avoir ses propres sources de résine préférées. Ce qui explique la grande variation de la couleur et de l'odeur de la propolis ainsi que sa composition [6].

Une étude Cubaine suggère que la résine récoltée est partiellement métabolisée par l'abeille, en ajoutant sa salive pendant qu'elle la transporte à la ruche [6]. Une autre étude confirme que l'abeille modifiait la propolis par le Glucodiase, Enzyme sécrété par les glandes hypopharyngiennes aux cours de la collecte. Cette modification enzymatique provoque l'hydrolyse des composés phénoliques tels que les flavonoïdes hétérosides qui seront transformés en flavonoïdes aglycones et en sucres [5].

II.1. Propriétés physiques de la propolis

II.1. 1. Caractéristiques organoleptiques

La propolis est une substance résineuse, d'aspect hétérogène qui présente les caractères suivants :

- **Couleur** : Elle varie selon sa provenance, allant de jaune clair au brun très foncé, presque noire en passant par toutes les gammes des bruns (brun jaune, brun vert et brun rouge).
- **Saveur** : Elle est souvent amère et âcre.
- **Odeur** : Elle a une odeur variable suivant son origine, en général, arôme agréable douceâtre, mélangé à celui de miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc...) [2].

II.1.2. Consistance

La propolis est une substance de consistance variable suivant la température :

- A 15 °C elle est dure et friable ;
- A 30 °C elle est molle et malléable. Entre 30 °C et 60 °C elle est coulante et gluante.

Le point de fusion est variable, il se situe vers 60 à 70 °C en moyenne mais peut atteindre 100 °C et plus [6].

II.1.3. Solubilité

La propolis d'abeille est soluble de façon partielle dans l'Alcool, l'Acétone, l'Ether, le chloroforme, le benzène, le trichloréthylène...etc. seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants.

La partie insoluble est constituée de tissus végétaux, de grains de pollen, de débris de cuticule et de soie d'abeille ...etc [1].

II.1.4. Densité

Elle est de l'ordre de 1,2 en moyenne.

II.2. Composition de la propolis brute

Elle est variable selon l'origine botanique [56; 57; 58] (La variété des sources de propolis a bien évidemment une influence sur sa composition), elle dépend du type des plantes accessible aux abeilles [6]. La race d'abeille influence également cette composition, d'après les résultats qui ont été trouvés par une analyse chromatographique associée à une spectrométrie de masse (CG/MS) [43], il a été trouvé une certaine différence de composition de la propolis récoltée par trois races d'abeilles (*Apis mellifera anatolica*, *Apis mellifera carnica* et *Apis mellifera caucasica*).

Généralement, elle est constituée de 40 à 50 % de résine, de baume composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters, 20 à 30 % de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille), 5 à 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières diverses (organiques et minérales) [2; 6;7].

La liste des principales classes des composés chimiques de la propolis est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau N° II-1: composition moyenne de la propolis.

Composition en ordre	Composants par groupes	Références
Résines	45 – 55% Flavonoïdes , acides phénoliques et leurs esters	- [59] - [60] - [61]
Cire et acides gras	20 -30 % La cire d'abeille et des plantes	- [62]
Huiles essentielles	10 % Produits volatiles	- [2]
Pollen	5 % Protéines (6 acides aminés libres > 1%) arginine et proline jusqu'à 46% du totale	- [63]
Autres composés et minéraux	5 % 14 traces de minéraux, silice, fer et zinc sont les plus communs.il y a aussi : Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb ; Acide Benzoïque et ses esters, vitamines, sucres, Cétones, Lactones,etc	- [59] - [64]

II.3. Composition de la propolis purifiée

Selon la littérature, on a pu identifier jusqu'à 150 constituants différents qui font de la propolis une véritable usine de produits chimiques [3; 13].

L'inventaire complet de ses substances serait fastidieux. Citons toutefois, plus de quarante flavonoïdes (flavones, flavonoles, et flavanones), des acides aromatiques, des esters aromatiques, terpanoïdes, acides aliphatique, autres matières organiques et minérales et de nombreuses vitamines (dont la vitamine A et les vitamines du group B. [2].

Les composés phénoliques (appelés aussi polyphénols) semblent les plus dominants dans la composition de la propolis, en plus ce sont les principaux composés responsables des activités biologiques de la propolis tels que l'activité antibactérienne [65], antivirale [66; 67], et antioxydante [13].

Les polyphénols naturels sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. Ce sont des composés organiques possédant un ou plusieurs noyaux aromatiques, auxquels sont directement liés un ou

plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une fonction ester, éther ou hétéroside [68].

La composition en polyphénols de la propolis diffère d'une région à une autre et d'une race à l'autre comme il est illustré dans le **tableau N°II-2**.

Tableau N° II-2 : La composition des différentes propolis en polyphénols.

Provenance	Polyphénols (mg équivalent de l'acide gallique /g de propolis)	Références
Santiago : - San martin - Banda -Capital - Figurau	80 – 131 115 -253 86 – 209 71 - 130	[69]
Chine : - Yuman - Hubei - Hainan - Shandoug - Neimongole	64,7 ± 1,5 224 ± 5,5 246 ± 4,8 265 ± 3,3 284 ± 4,9	[70]
- Argentine - Brésil - Bulgarie - Sud Afrique - Uzbekistan	212 ± 9,2 120 ± 2,5 220 ± 2,5 99,5 ± 4,4 147 ± 6,7	[71]

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 ;
- Les Autres composés.

II.3.1. Flavonoïdes

Du latin *flavus*, jaune, ceux sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux, ce qui confirme la théorie qui dit que la propolis est d'origine végétale [72].

Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires [73 ; 74]. Ils constituent des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [75].

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent un noyau flavone C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) comme le montre la *figure N°II-1*. Il sont composés de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par le biais d'un cycle pyrone (oxygène contenu au niveau d'une pyrane). [76 ; 77].

Selon le degré d'oxydation du cycle «C», l'hydroxylation du motif flavone et la nature du substituant au niveau du carbone C_3 , les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs sous classes : flavonols (catéchines), flavones, isoflavones, flavanes, anthocyanines et proanthocyanidines

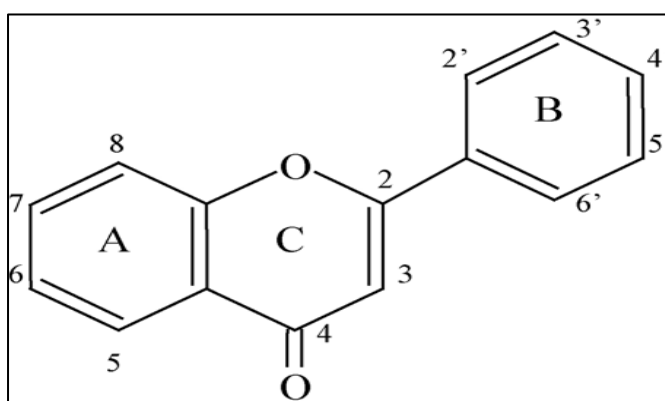


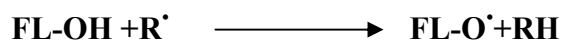
Fig. II-1 : structure chimique commune des flavonoïdes [72].

Les flavonoïdes de la propolis sont devenues un sujet de recherche très intéressant dans la médecine, ils possèdent de nombreuses propriétés tels que l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne, inhibitrice de quelques enzymes, antioxydante et antiallergique.

Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes sont reliés à leur activité antioxydante [73]. Les flavonoïdes possèdent une structure chimique idéale qui leur confère une capacité à piéger les radicaux libres, et ils sont considérés comme les

antioxydants les plus efficaces *in vitro* même plus que les tocophérols et l'acide ascorbique. [78]. L'activité antioxydante des flavonoïdes peut être exercée par 3 mécanismes différents :

1- Capture directe de radicaux libres : Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leur potentiel anti-radicalaire [79]. De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes (FL-OH) est essentiellement liée à leur capacité de réduire les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxydes, hydroxyles, peroxydes, et alkoxydes par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante [80] :



Le radical flavonoxy (FL-O') peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable [79]. (Fig. II-2).

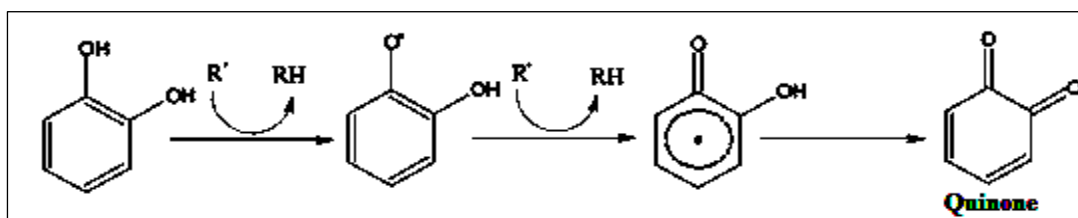


Fig. II-2. Formation de la structure quinone [80].

2- Interaction avec les ions métalliques : Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques en particulier le fer et le cuivre et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi la production de ROS (reactive oxygen species) [81].

3- Inhibition de divers enzymes : Les enzymes qui peuvent être inhibées par les flavonoïdes sont la xanthine oxydase, la lipo-oxygénase, les cyclo-oxygénase, et les nitriques oxydes

synthase (NOS) [81]. En outre, les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés [82]. Ils sont donc de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL [83].

La plupart des flavonoïdes identifiés dans la propolis sont englobés en trois groupes :

a- Flavanols et Flavones

Les flavanols se différencient des flavones par l'existence d'un OH en position 3, le flavanole le plus répandu dans la propolis est le Pinocembrine, par contre on a pu identifier plus de 30 flavones dont les plus importants sont : la Chrysin, la Galangine, le Kaempferol, l'Apigénine, l'Apigénine-7-ether méthylique, l'Izalpinine, le Kaempferol, le Kaempferol, la Quercétine, etc [3].

b- Chalcones et dihydrochalcones

Les plus répandues sont les Pinocembrines chalcone, le 2,4,6 trihydroxy-dihydrochalcone, la 2,4-dihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone, le pinobanksine-3-acétate chalcone, l'Alpinine chalcone, pinostrobine chalcone, Sakuranétine chalcone, etc [3].

c- Flavonone

Les flavanones ou dihydro-2,3-flavones dérivent des flavones par disparition de la double liaison de l'hétérocycle central [83]. Les plus répandus dans la propolis d'abeille sont : la Nargénine, la Pinobanksine, le Pinobankcine-3-acétate, le Pinobankcine-3-butirate, le Pinobankcine-3-hexanoate, le 3,7-dihydroxy-5-méthoxyflavanone, le 2,5-dihydroxy-7-méthoxyflavanone, etc [3].

D'après les travaux réalisés sur une propolis Iranienne [13; 85] on a pu identifier plus de dix-sept flavonoïdes qui sont résumés dans le tableau N°II-3, [13].

Tableau N°II-3: Les flavonoïdes identifiés dans la propolis.

Nom des flavonoïdes	%TIC
- 5-Hydroxy-7-Metoxy flavanone (pinostrobin)	0.51
- 5,7- Dihydroxy flavanone (pinocembrine)	2.62
- 2,6- dihydroxy-4-méthoxydihydro chalcone	0.07
- 5,6-dihydroxy-3-acetyloxyflavanone(pinobankcine-3-acetate) isomer 1	0.17
- 5,7-Dihydroxy-3-acetyloxyflavanone(pinobanksin-3-acetate)(isomer2)	2.29
- 5,7-dihydroxy flavone (chrysin)	0.3
- 3,5,7-trihydroxy flavanone (piobankine)	0.9
- 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine)	0.06
- 2',4',6'- trihydroxy chalcone (pinocembrine chalcone)	0.13
- 3,5,7,4'-tetrahydroxy flavone (Kaempferol)	0.11
- 5,7- dihydroxy flavone (chrysin)	0.69
- 5,7'dihydroxy-3-propanoyloxyflavanone (pinobankcine-3-propanoate)	
- 3,5,7- trihydroxy flavone (galangine)	0.17
- 5,7-dihydroxy-3-(iso)butanoyloxyflavanone (pinobankcine-3-isobutanoate)	0.73
- 5,7-dihydroxy-3-(iso)pentanoyloxyflavanone (pinobankcine-3-isopentanoate)	0.05
- 5,7,4'-trihydroxy flavanone(naringenin)	0.04
- 3,5,7,3',4'- pentahydroxy flavone (quercetin)	0.07
- Quercetin methyl ether	0.13
- 3,5,7,3',4'- pentahydroxy flavone	0.12
	0.15

Remarque : TIC : caractérise la substance mais il ne permet pas de quantifier.

D'autres travaux ont permis de quantifier les différents flavonoïdes présents dans des propolis des diverses régions. [70] (*tableau N° II-4*)

Tableau N°II-4 : Quantité des flavonoïdes des propolis de diverses régions [70].

Quantité (mg/g) d'EEP							
Composé	A	b	c	d	e	f	g
Quercetine	2,2	4,8	4,7	1,5	4,4	—	2,5
Pinobanksin 5-methyl ether	15,0	23,8	19,7	18,8	19,5	5,9	51,0
Apiginine	12,0	18,4	13,4	14,2	17,1	—	14,8
Kaempferole	2,3	3,4	5,0	1,4	2,1	1,0	2,5
Pinobanksine	22,5	32,1	84,8	21,4	36,1	31,4	36,5
Chrysin	68,5	138,6	120,4	66,3	127,3	11,2	77,3
Pinocembrine	68,7	58,6	94,4	86,2	54,8	69,8	75,0
Galangine	32,5	42,5	45,6	37,7	39,6	18,9	48,8
Pinobanksin 3-acetate	56,3	79,7	41,2	63,7	52,5	7,7	80,0

-: pas détecté

a: Argentine, **b:** Australie, **c:** Bulgarie, **d:** Chili, **e:** Chine, **f:** Afrique de sud, **g:** Uruguay.

La figure qui suit montre la structure des flavonoïdes qui ont été détecté par la CPG /SM.

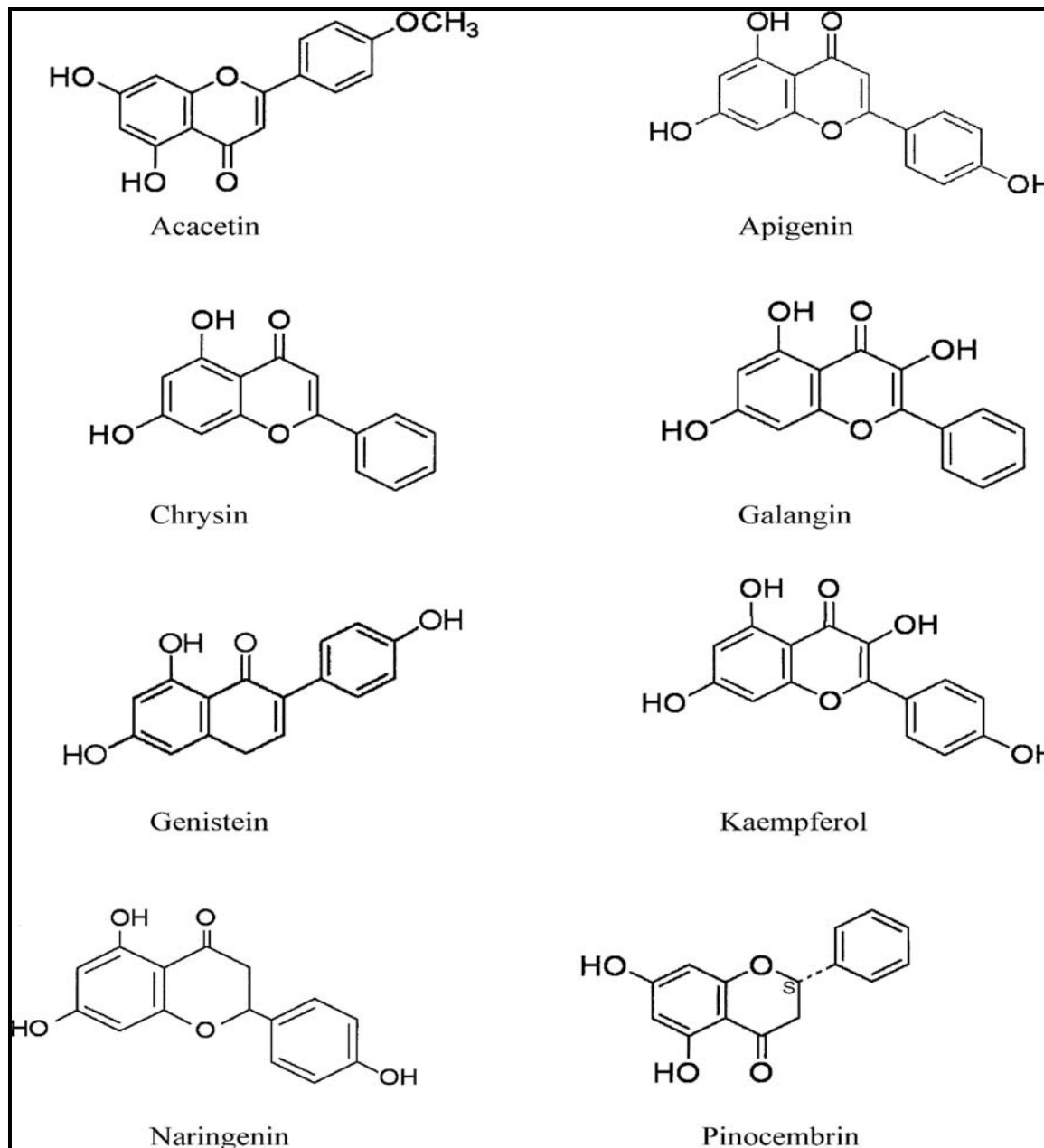


Fig. N°II-3: Structure de quelques flavonoïdes identifiés par HPLC/SM dans la propolis [85].

II.3.2 : Acides aliphatiques

Parmi les acides aliphatiques qui ont été identifiés et reportés dans la littérature, on peut citer plus de vingt acides relevés dans le tableau qui suit [3, 13] :

Tableau N° II-5 : les acides aliphatiques détectés dans la propolis.

Nom des composés	% TIC
Acide 2-hydropropanoïque (acide lactique)	0,08
Acide 2- hydroxybutanedioïque (acide maleique)	0,31
Acide trans butan-1,4-dioïque (acide fumarique)	0,01
Acide butanedioïque (acide succinique)	0,29
Acide nonaoïque (acide pelargonique)	0,01
Acide decanoïque (acide caprique)	0,02
Acide dodécanoïque (acide laurique)	0,02
Acide hexadécanoïque (acide palmitique)	0,54
Acide oléique	0,86
Acide octadécanoïque (acide stéarique)	0,28
Acide 2-hydroxy acétique	0,01
Acide 2, 3-dihydroxypropanoïque (acide glycérique)	0,01
Acide tétradécanoïque (acide myristique)	0,04
Acide heptadécanoïque	0,06
Acide 11-eicasonoïque	0,11
Acide 2, 3 ,4-trihydroxy butyrique (acide tetronique)	<0,01
Acide octanoïque	0,01
Acide α -linoléique	0,1
Acide hydroxy malonique	0,02
Acide linoléique	-
Acide oléique	-
Acide stéarique	-

TIC : c'est une valeur qui caractérise chaque composé, mais elle ne permet pas de les quantifier (CG/MS).

La race d'abeille peut influencer la composition en acides aliphatique de la propolis de la même région, comme le montre le *tableau N° II-6*. [86] ; ces résultats ont été obtenus par une analyse CG/SM.

Tableau N°II-6 : Influence de la race d'abeille sur la composition en acide aliphatique de la propolis.

Nom du composé	<i>Apis mellifera anatolica</i>	<i>Apis mellifera carnica</i>	<i>Apis mellifera caucasica</i>
Acide 9-octadecanoïque	+ (%TIC =38,98)	+ (%TIC = 38,93)	+ (%TIC = 38,93)
Acide hexadecanoïque	+ (% TIC = 33,60)	+ (%TIC = 33,57)	+ (%TIC = 38,93)
Acide decanoïque	-	+ (%TIC =14,29)	-

II.3.3. Les acides aromatiques [75]

Cette catégorie se subdivise en trois groupes :

- Les dérivés de l'acide benzoïque ;
- Les dérivés de l'acide benzaldéhydrique ;
- Les dérivés de l'acide cinnamique.

a- Dérivés de l'acide benzoïque :

Les acides benzoïques ont une structure générale de C₆-C₁ dérivant directement de l'acide benzoïque [75; 86] (*Fig. N°II-4*). Les variations des structures de différents acides benzoïques se situent dans les hydroxylations et les méthylations du noyau aromatique [76].

Ce groupe comporte les composés résumés dans le *tableau N°II-7*, et leur structure illustrée dans la *fig. N°II-4*. [2]:

Tableau N° II-7 : l'acide benzoïques et ces dérivés.

	R ₁	R ₂	R ₃
Acide benzoïque	H	H	H
Acide 4-hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide 4-méthoxy benzoïque	H	OCH ₃	H
3,4dihydroxy benzoïque (protocatéchiue)	OH	OH	H
3,4,5 trihydroxy benzoïque (acide gallique)	OH	OH	OH
3,4 diméthoxide benzoïque	OCH ₃	OCH ₃	H

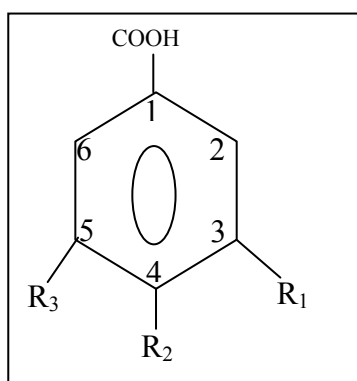


Fig. N° II -4 : la structure de l'acide benzoïque et ces dérivés. [2]

b- Dérivés de benzaldéhydiques :

Dès 1911, K. Dietriche [2] détecta des traces de vanilline et d'iso vanilline dans la composition de la propolis récolté dans les régions apicoles d'U.R.S.S., ces composés sont illustrés dans le Tableau N° II-8, et la figure N° II-5 :

Tableau N°II-8 : les composés benzaldéhydiques

	R ₁	R ₂
Vanilline	OCH ₃	OH
Iso vanilline	OH	OCH ₃

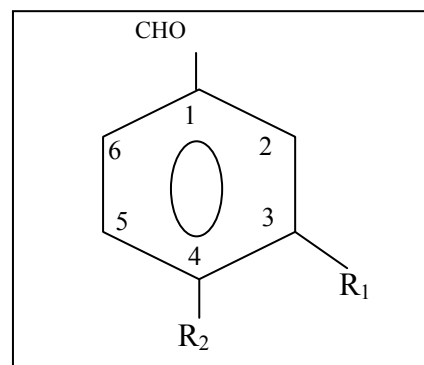


Fig. N° II-5 : la structure de composées benzaldéhydiques

c- Dérivés de l'acide cinnamique :

Les acides cinnamiques ont une structure générale de C6- C3, les plus réponsus chez les végétaux sont l'acide *p*-coumarique (1), caféique (2), férulique (3) et sinapique (4) [76, 87]. On rencontre au moins un d'entre ces quatre acides, dans pratiquement tous les végétaux supérieurs.

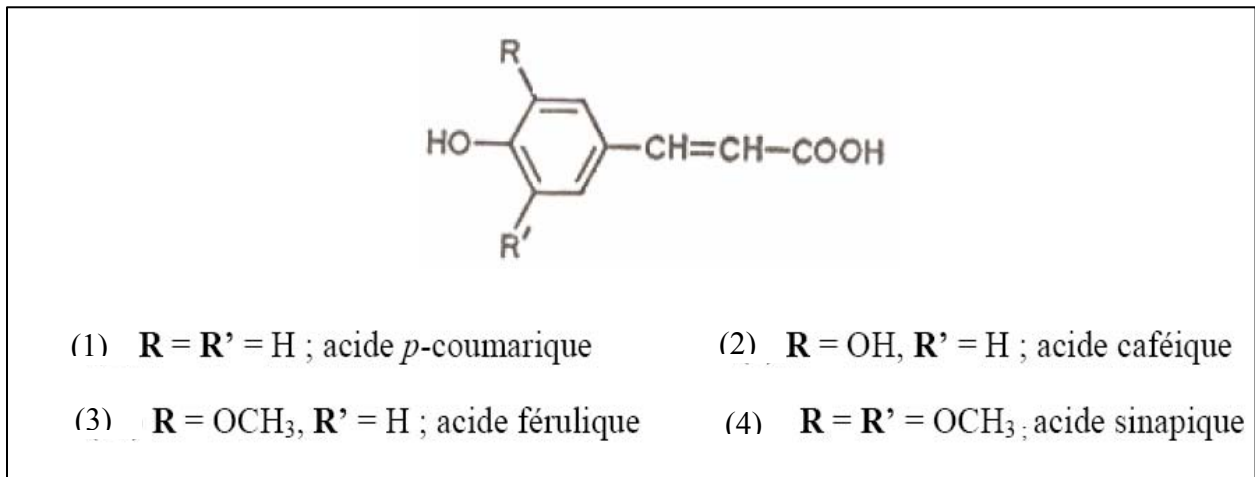


Fig. N° II-6 : Structures chimiques des principaux acides cinnamiques [84, 87].

Aux acides cinnamiques il faut rattacher les coumarines, constituées également par un élément en C6-C3, dans lequel la chaîne en C3 est sous forme d'hétérocycle oxygène ; l'umbelliférone est un exemple de coumarine [84].

Dans ce cas aussi, la race d'abeille a une certaine influence sur la composition en acide aromatique, le *tableau N° II-9* représente la composition en acides aromatiques des propolis récoltés par trois races d'abeille différentes dans la même région [86]:

Tableau N°II-9 : la composition en acide aromatique selon la race d'abeille

<i>Apis mellifera anatolica</i>	<i>Apis mellifera carnica</i>	<i>Apis mellifera caucasica</i>
Acide benzoïque	Acide benzoïque	Acide benzoïque
Acide ferulique	Acide benzeneacetique	Acide propanoïque
Acide 3,4- dimethoxy-cinnamique	Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique	Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique
Acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique	Acide 3,4diméthoxycinna-mique	Acide 1,3-benzenedicarboxyli-que
Acide 4- pentenoïque	Acide propanoïque	
Acide 1,3- benzene-dicarboxlique		
Acide propanoïque		

II.3.4. Esters aromatiques

Ce groupe englobe les catégories suivantes :

- Esters cinnamiques ;
- Esters coumariques ;
- Esters ferulates ;
- Esters caffeates ;
- Esters isoferulates ;

D'après la littérature, plusieurs travaux ont été réalisés sur la composition de la propolis en Esters aromatiques (*Tableau N° II-10.*) [13; 86].

Tableau N° II-10 : la composition de la propolis en esters aromatiques.

1. Ethyl palmitate	10. 3-methyl-3-butenyl-trans caffeate
2. diethyl phthalate	11. 2-methyl-2-butenyl-trans caffeate
3. benzyl-trans-4-coumarate	12. 3-methyl-2-butenyl-trans caffeate
4. 1-phenylethyl trans caffeate	13. 2-methyl-2-butenyl-trans-4-coumarate
5. cinnamyl caffeate	14. 3-methyl-2-butenyl-trans-4-coumarate
6. 3-methyl-3-butenyl-trans ferulate	15. phenylethyl trans-4-coumarate
7. 3-methyl-2-butenyl-trans ferulate	16. ethyle linoleate
8. 3-methyl-3-butenyl-trans-iso- ferulate	17. ethyl oleate
9. 3-methyl-3-butenyl-trans ferulate	18. ethyl stearate

II.3.5. Sucres de la propolis

Les sucres qui ont été identifiés dans la propolis sont illustrés dans le *tableau N°II-11*.

[13] :

Tableau N°II-11 : les sucres et les sucres alcooliques de la propolis.

1. inositol	6. D-glucetole
2. saccharose	7. D-glucose
3. D-fructose (isomère1)	8. α -D-xylopyranose
4. D-fructose (isomère2)	9. acide gluconique
5. sorbose	10. galactose

D'après la littérature, la région géographique influence la composition en sucres de la propolis, *tableau N°II -12 [88]*.

Tableau N° II-12 : l'influence de la région géographique sur la composition en sucre de la propolis.

Le pays	Les composants	% (g/100g)
Kenya	Saccharose	0,34
	glucose	0,23
	fructose	0,65
Bulgarie	Saccharose	0,23
	glucose	0,16
	fructose	0,08
Kenya	Saccharose	1,15
	glucose	0,75
	fructose	0,95
Tanzanie	Saccharose	0,04
	galactose	Traces
	fructose	0,12
	glucose	0,03

II.3.6. Eléments minéraux 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 [2], cette dernière est l'un des produits naturels les plus riches en éléments minéraux essentiellement le potassium et le calcium.

Le tableau N° II-13 [88] donne la teneur en éléments minéraux de quelques échantillons de propolis provenant de l'Argentine. On remarque que la teneur en minéraux varie d'un échantillon à un autre de la même région.

Tableau N°II-13 : Composition minérale de quelques échantillons de propolis de l'Argentine.

	San Martín	Sarmiento	Chimbas
Calcium (Ca) (mg/kg)	1651	42	3397
Potassium (K) (mg/kg)	473	174	1148
Fer (Fe) (mg/kg)	473	174	1192
Sodium (Na) (mg/kg)	855	368	370
Magnésium (Mg) (mg/kg)	237	395	875
Zinc (Zn) (mg/kg)	61	68	80
Manganèse (Mn) (mg/kg)	14	17	22

II.3.7. Vitamines

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 de groupe B, tout particulièrement la vitamine B₃ (pp) et la provitamine A qui se transforme en vitamine A dans l'organisme.[6]

II.3.8. Autres composés chimiques :

Il y a plusieurs autres composés qui ont été détectés dans la composition de la propolis dont on peut citer [13]:

1. Les hydrocarbures aliphatiques

- Heptadecane
- 2-Nonadecane
- Eicosane

2. les Sesquiterpènes :

- γ -cadenine
- α -cedrol
- trans-farnesol

II-4. Composition de la propolis algérienne

D'après une étude réalisée dans quatre régions différentes du pays (Tlemcen, Guelma, M'sila 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 N°II 14).

Tableau N° II 14 : Pourcentages des composés de la propolis algérienne [37]

Famille	Tlemcen	Guelma	M'sila	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



CHAPITRE III :

Matériel et méthodes

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1. Présentation de la matière première

Les échantillons de propolis récoltés par deux races d'abeilles (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*), entre 2006 et 2009 nous ont été fournis par des apiculteurs de différentes régions d'Algérie. Ils ont été répartis en trois groupes, le groupe montagne (n=7), le groupe plaine (n=4), et le groupe Sahara (n=3). Le poids de la propolis varie entre 15g et 300 g. La conservation des échantillons a été faite à froid pour certains et à l'air libre pour d'autres.

La récolte a été effectuée par le raclage des cadres (cette méthode permet d'obtenir une propolis de mauvaise qualité « trop d'impuretés » contrairement à la récolte en utilisant des grilles de la propolis) [33].

Quelques échantillons analysés sont présentés dans le tableau ci-dessous:



Fig.III-1 : Propolis de Yakouren 2008.



Fig.III-2 : Propolis Saharienne



Fig.III-3 : propolis de Mitidja 2007



Fig.III-4 : propolis Saharienne (Ain Oussara) 2007

Choix de l'échantillon

Les échantillons ont été choisis selon des régions pédoclimatiques et des races d'abeilles.

Le choix des échantillons se justifie par la différence de la flore botanique entre les régions bioclimatiques.

- **Présentation des échantillons de la propolis**

Tableau N⁰ III-1 : Différents échantillons de la propolis.

	Régions	Race d'abeille	Date de récolte
montagne	Yakourène	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2006
	Yakourène	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2007
	Yakourène (a)	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
	Yakourène (b)	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
	Dellys	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
	Bouzgen	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
	Ain El hammame	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
plaine	Isser	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2007
	Mitidja	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2007
	Chaabet	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2009
	Mitidja	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008
Sahara	Lagouat	<i>Apis mellifica sahariensis</i>	2009
	Ain Oussara	<i>Apis mellifica sahariensis</i>	2007
	Ain Oussara	<i>Apis mellifica intermissa</i>	2008

Remarque

Les échantillons : Yakouren (b) 2008, Mitidja 2008 et la propolis de Sahara 2008 (propolis de l'abeille *Apis Mellifica intermissa*) ont été dégradés à cause des mauvaises conditions de conservation (conservation à l'air libre pendant une année)

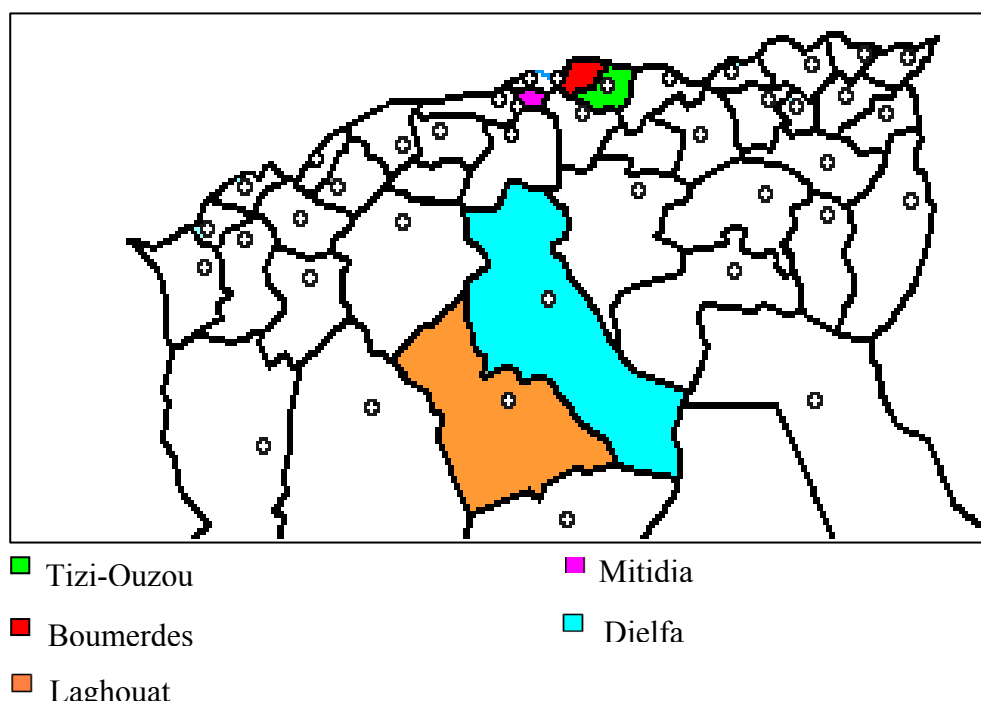


Fig.III-5 : Cartes géographique montrant les stations de récolte.

III.2. Les méthodes d'analyse

Elles se rapportent aux expériences suivantes :

- 1- caractérisation physique et physico chimique de la propolis ;
- 2- évaluation de l'activité antioxydante de la propolis ;
- 3- quantification de quelques composés de la propolis ;
- 4- étude du rendement d'extraction par des différents solvants avec différentes méthodes ;
- 5- analyse de la composition de l'extrait de propolis par la RMN de proton et la chromatographie sur couche mince ;
- 6- Détermination du profil en minéraux.

III.2.1. Les méthodes physiques

III.2.1.1. Détermination de taux des pertes pendant le séchage (NF T 60-305, Juin 1976)

◆ 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 1 g 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 mn) 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.

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

III.2.1.2. 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**

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

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 :

$$Cd = 100 - MO \%$$

III.2.1.3. La masse volumique

- **Principe**

Préparation d'un morceau de propolis de masse déterminée.

Détermination du volume occupé par ce dernier par la mise de l'échantillon dans une éprouvette graduée contenant de l'eau.

L'opération est répétée trois fois pour chaque échantillon.

III.2.1.4. Le point de fusion (Norme NFT60 -226, Méthode 2)

- **Principe**

Chaque substance chimiquement pure possède sa propre température de fusion. C'est une des plus importantes caractéristiques physiques permettant de juger la pureté de la substance envisagée, du même, de l'identifier.

Une matière telle que la propolis n'est pas une substance individuelle mais un mélange de plusieurs composées dont les températures de fusion différentes. Donc, il n'existe pas de température de fusion de la propolis mais un intervalle de température dans lequel fondent leurs différents constituants.

Par convention, la température de fusion de la propolis correspond à la température du début de sa fusion.

• Mode opératoire

- Un tube capillaire propre est introduit dans l'échantillon de la propolis fondue puis rempli sur une hauteur de 2 cm.
- Le tube capillaire et son contenu sont refroidis à l'air libre pendant 20 mn.
- Le tube est attaché à un thermomètre de façon que la colonne de la propolis se trouve au même niveau que le réservoir du thermomètre.
- L'ensemble est introduit dans un bêcher contenant de l'eau ayant une température inférieure de 10 °C environ de la température de fusion présumée.
- Le bêcher est chauffé de façon que la température s'élève d'environ 0,5 °C par minute, en surveillant le moment où la propolis commence à monter dans le tube capillaire.
- La température de fusion est déterminée.

L'essai doit être réalisé au minimum deux fois et la température de fusion représentera la moyenne arithmétique de ces deux valeurs.

III.3. Méthodes d'analyses chimiques

III.3.1. 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 bêcher et y ajouter trois fois son volume d'eau distillée ;
- Chauffer au bain-marie pendant 30 mn 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.

III.3.2. 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 chaude récemment 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.

III.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits ethanoliques de la propolis d'abeille est évaluée par deux méthodes différentes : le pouvoir réducteur et l'activité anti-radicalaire au radical DPPH.

III.4.1. Détermination de pouvoir réducteur de propolis. [89].

L'étude de pouvoir réducteur de la propolis est réalisée par la méthode décrite par Shi et Dalal 1919 avec quelques modifications (voir la figure N° III-5).

Dans cette analyse on prépare des concentrations différentes des extraits pour déterminer la concentration qui nous permet d'éliminer 50 % des radicaux libres (EC50).

On utilise la courbe d'étalonnage de Butyl hydroxy toluène (BHT) comme référence pour faire la comparaison

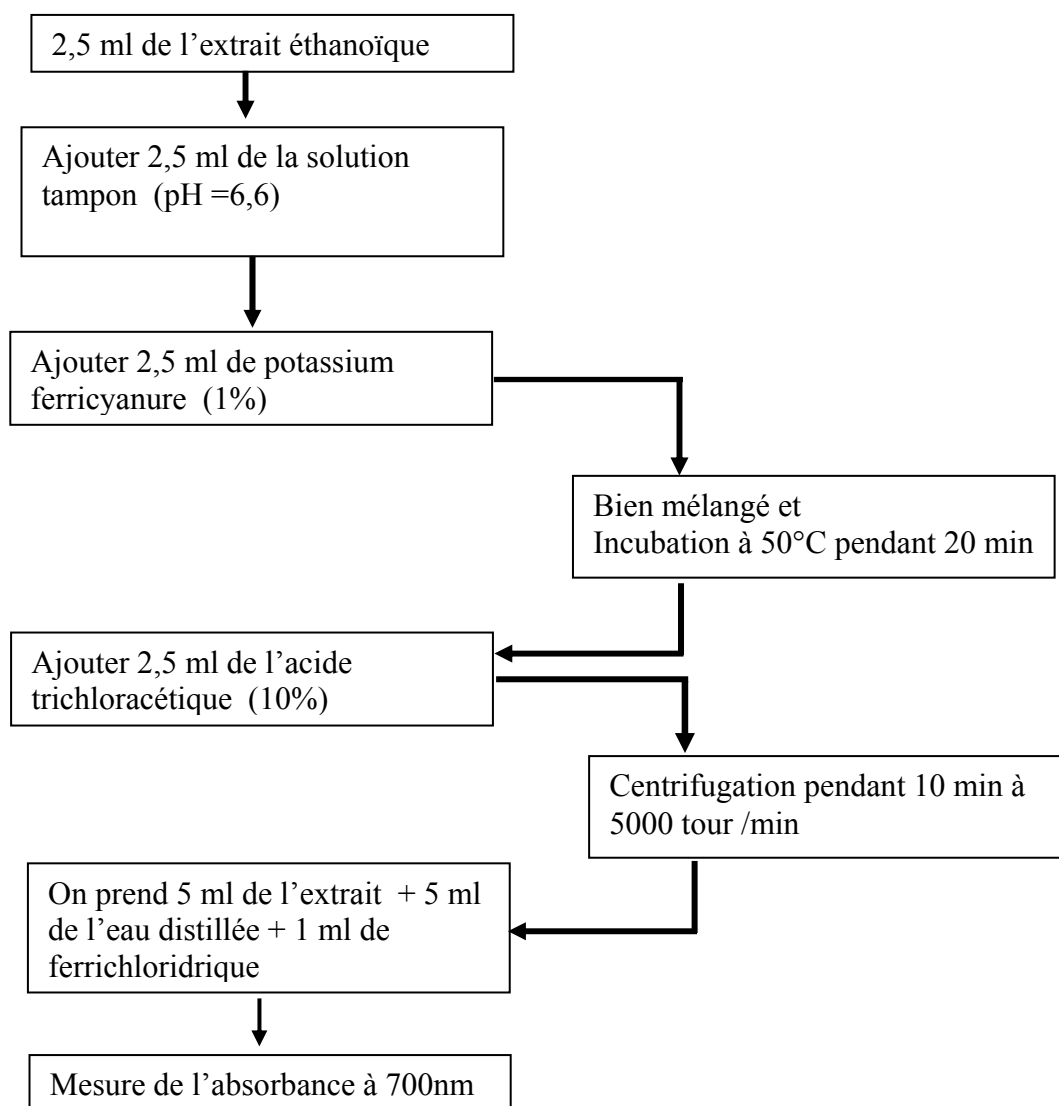


Fig.III-6 : Diagramme de détermination de pouvoir réducteur de la propolis [89].

III.4.2. Activité anti-radicalaire

◆ 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 picryl selon la réaction suivante. [91].

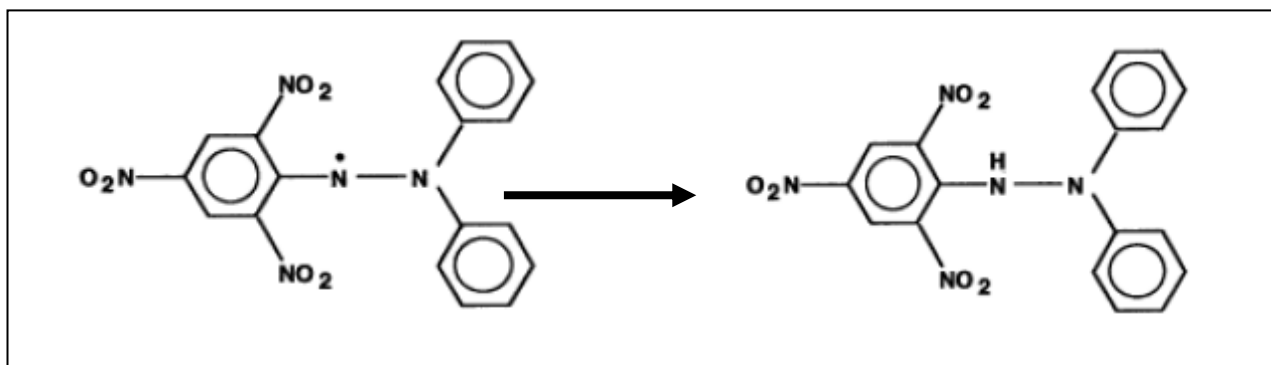


Fig. III-7 : réduction du radical libre DPPH en DPPH₂ [91].

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de propolis via le test DPPH, est effectuée par la méthode décrite dans la littérature [90].

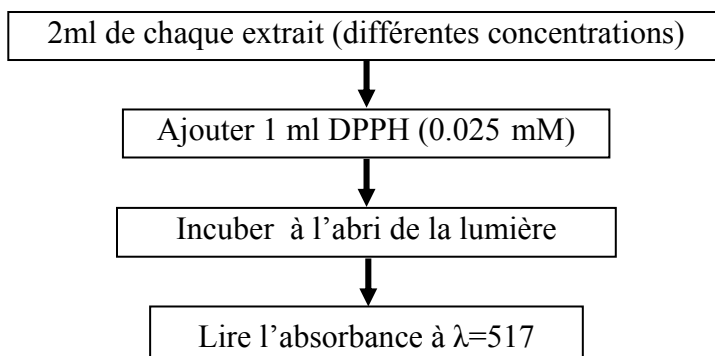


Fig.III-8 : Etapes de test DPPH.

Les absorbances ont été convertis en taux de radical-balayage de DPPH selon l'équation:

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \times 100$$

Tel que : A_C : Absorbance du contrôle.

A_E : Absorbance de l'échantillon.

N.B : Des antioxydants de synthèse (Quercétine, BHA, et acide ascorbique) ont été préparées pour leurs effets sur le pouvoir anti-radicalaire.

A différentes concentrations, le calcul de EC_{50} (equivalent concentration to give 50% effect) est effectué, car cette valeur nous permet d'interpréter les résultats de cette méthode.

III.5. Quantification de quelques composés principaux de la propolis

III.5.1. Dosage des polyphénols de la propolis

- **Extraction des polyphénols**

Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Le principe consiste en ce que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur. La plus part des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion. Le solvant utilisé dans cette présente étude est l'éthanol (70%). Celui-ci possède l'avantage d'être plus facilement éliminé sous vide, il donne en plus un meilleur rendement d'extraction (7 fois plus que celui d'eau) et il évite l'extraction de la cire qui se trouve mélangée [84]. Le rendement d'extraction en polyphénols augmente aussi avec le temps de contact [93].

La figure suivante montre le procédé d'extraction.

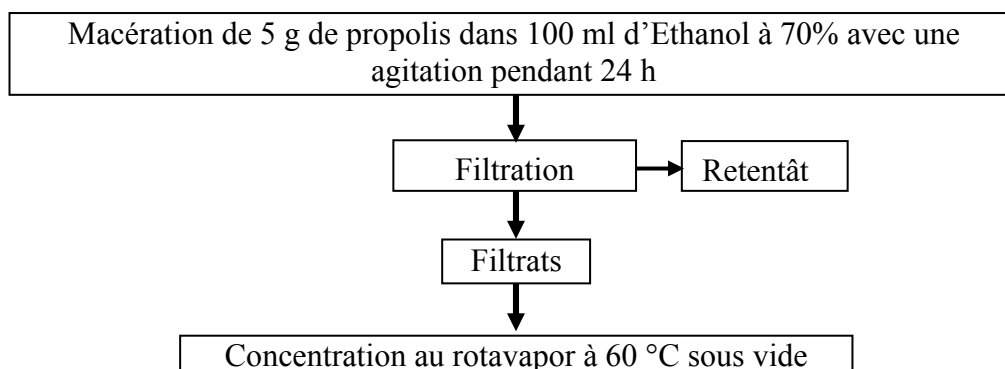


Fig. III-9 : Principales étapes d'extraction des polyphenols [94].

- **Détermination de la teneur en polyphénols totaux**

- **Principe**

En présence de phénols, le mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolibdique (H₃PMo₁₂O₄₀) est réduit en oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), que l'on détermine par colorimétrie [84].

- ◆ **Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite dans la littérature [95, 96] avec quelques modifications (voir *fig. III-9*).

A) Préparation de la gamme d'étalonnage

- Peser 200 mg d'acide gallique;
- Les dissoudre dans 100 ml d'éthanol, soit une solution (S1) avec une concentration de 2 mg/ml ;
- Diluer la solution mère comme suit :
 - Prélever 5ml de la solution mère puis ajouter 5 ml d'eau distillée et l'on obtient la dilution S/2;
 - Prélever 5 ml de la solution S/2 puis rajouter 5 ml d'eau distillée et l'on obtient la dilution S/4;
 - Refaire la même procédure pour les autres dilutions.

Tableau N° III-2: Préparation des dilutions de l'acide gallique pour la réalisation de la courbe standard des polyphénols totaux.

Dilution	S	S/2	S/4	S/8	S/16	S/32	S/64	S/128	S/256
Concentration (mg/ml)	2	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,01	0,007

- **Traçage de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

- Prélever 0,5 ml de chaque dilution d'échantillon dans des tubes à essais ;
- Ajouter 5 ml d'eau distillée dans chaque tube ;
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu's ;
- Après 3 mn, ajouter 0,5 ml de carbonate de sodium à 10 % ;
- Laisser incuber pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le blanc est représenté par 5 ml d'eau distillée additionné de 0,5 ml de Folin-Ciocalteus et 0,5 ml de carbonate de sodium à 10 %.

La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure. La Concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage.

Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de la propolis est illustré dans la figure suivante :

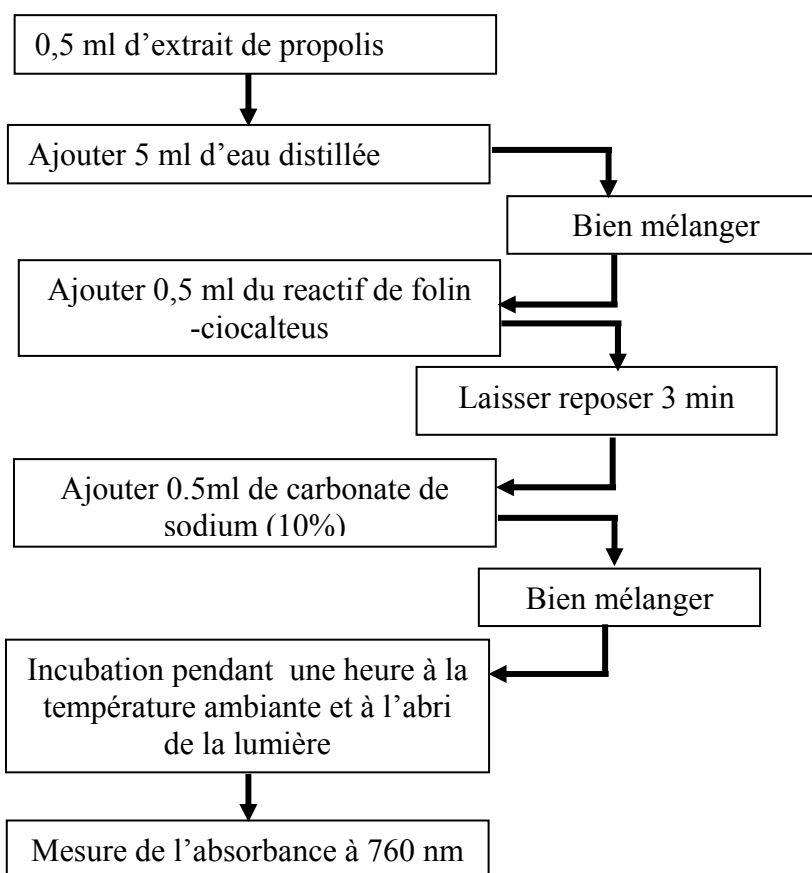


Fig.III-10 : Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux [95].

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = a X + b$) réalisée par l'extrait d'étalon « acide gallique » à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1 g de propolis brute.

III.5.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

• Principe

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits Ethanolique de la propolis est réalisée par la méthode décrite dans la littérature [97].

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. 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.

◆ Mode opératoire

- Mettre 1 ml d'extrait ethanolique de la propolis dans un tube à essai ;
- Ajouter 1 ml de solution de chlorure d'aluminium à 2 % ;
- Après 10 mn, l'absorbance est lue à 430 nm.

La préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau N° III.3 : Préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Dilutions	S	S/2	S/4	S/8	S/16	S/32	S/64
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625

La concentration des flavonoïdes contenus dans les extraits de propolis est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

Le dosage des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de la propolis est représenté dans la figure suivante [68]:

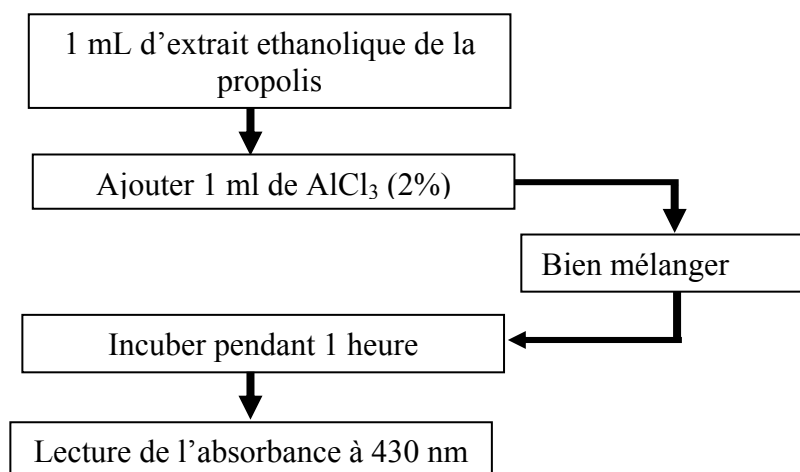


Fig.III-11 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes dans l'extrait de propolis.

La courbe d'étalonnage ($Y=aX + b$) obtenue avec la quercétine à différentes concentrations pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes en μg par g de propolis

III.5.3. Détermination de la teneur en acide ascorbique des extrais éthanoliques de la propolis

La quantification de la vitamine C (acide ascorbique) est réalisée par la méthode de 2,6 dichlorophénolindophénol (DIP) décrite par *Klein et Rerry (1982)* avec quelques modifications [98].

- **Principe**

Traitement de 0,5 g de propolis brut coupée en petits morceaux avec 10 ml d'acide oxalique (1%).

L'extrait est centrifugé à 3000 tour/min pendant 15 minutes. 1 ml de surnageant est mélangé avec 9 ml de DIP à 0,2 mM, bien mélangé pendant 15 seconds, puis l'absorbance est mesurée à 515nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant une gamme de concentration allant de 0 à 500 μg .

III.5.4. Détermination de la teneur en sucres

III.5.4.1. Détermination de la teneur en sucres réducteurs

Seuls les sucres réducteurs sont mesurés par cette méthode. La fonction réductrice se complexe sous certaines conditions avec le réactif DNS (acide di-nitro-3,5 salicylique), ce qui se traduit par une coloration orangée. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres réducteurs [99].

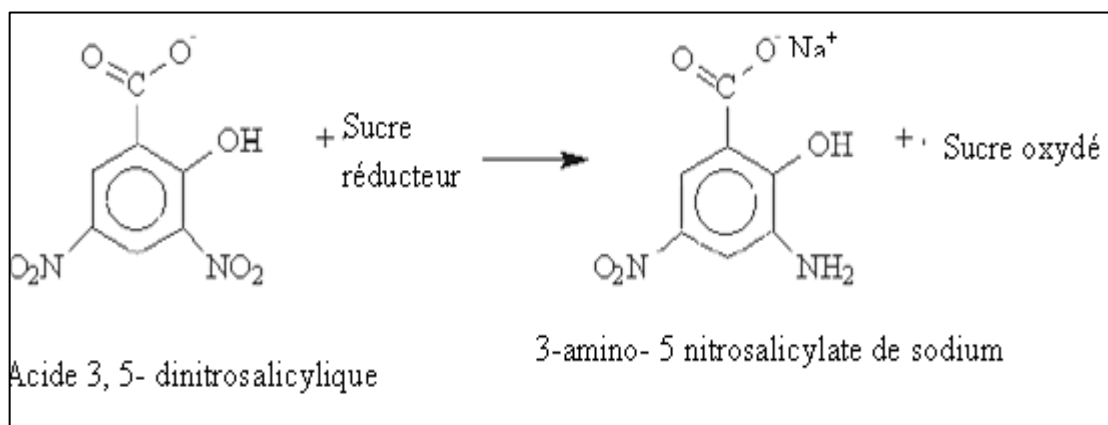


Fig. III-12 : Complexation des sucres réducteurs en présence de réactif de DNS.

Une élimination des protéines (substances réductrices) pouvant interférer avec le dosage au DNS est nécessaire sur les échantillons. Ce traitement consiste à mélanger 4 ml d'échantillon avec 0,5 ml de $ZnSO_4$ à 5 % et 0,5 ml de $Ba(OH)_2$ à 0,3 N. Après un temps de contact de 10 minutes, on élimine le précipité formé par centrifugation ou filtration.

Pour réaliser le dosage, on effectue dans un tube à essai le mélange de 1 ml de réactif de DNS (8 g de soude, 5 g d'acide di-nitro-3,5 salicylique, 150 g de tartrate double de sodium et de potassium, complété à 500 ml avec de l'eau et conservé à l'abri de la lumière) avec 1 ml d'échantillon à analyser précédemment dilué de façon à se trouver dans la gamme d'étalon (0-2 g/l équivalent glucose). Après homogénéisation du mélange, on porte le tout à 100 °C pendant 10 minutes. A la sortie du bain-marie, le refroidissement dans un bain de glace et l'ajout de 10 ml d'eau distillée arrête la réaction. La lecture de l'absorbance à 540 nm permet de déterminer, à partir de la gamme étalon et en tenant compte des dilutions, la teneur en sucres réducteurs des différents échantillons (exprimée en g/l) [100].

III.5.4.2. Dosage des sucres totaux

Les sucres totaux sont déterminés par le test au Phénol (méthode de DUBOIS et autres, 1956)

- **Principe**

En présence de l'acide sulfurique concentré, les oses sont déshydratés en composés de la famille des dérivés furfuriques. Ces produits se condensent avec le Phénol pour donner des complexes jaune-orangé. La teneur en sucres totaux est déterminé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm [101].

- **Mode opératoire**

Dans un tube en pyrex déposer avec précaution 1 ml de la solution à doser, 1ml de la solution phénol (50g/l) et 5ml d'acide sulfurique. Après homogénéisation douce de mélange réactionnel et refroidissement, la densité optique est mesurée à 490 nm.

III.5.5. Dosage des protéines

III.5.5.1. Détermination de la teneur azote totale (Méthode de Kjeldahl)

- **Principe**

Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur. Alcalinisation des produits de la réaction puis distillation de l'ammoniac libéré et titrage.

On introduit dans un matras de minéralisation 1 g de propolis et une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium), puis on ajoute 15 ml d'acide sulfurique pur ; On applique un chauffage progressif : d'abord une attaque à froid pendant 15 mn jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique, puis le chauffage est rendu plus énergique, attaque à chaud pendant 4 à 5 heures. Quand la solution devient limpide, elle est refroidie et complétée à 100 ml avec de l'eau distillée. La distillation est réalisée dans un distillateur semi automatique (VELP) où l'ajout de 20 ml de lessive de soude à 35 % dans le matras et 25 % d'acide borique dans une fiole de 250 ml est réalisé. Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré (mélange de bleu de méthylène et rouge de méthyle). L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0.05 N grâce à un titrateur automatique.

Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans échantillon.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N \text{ (\%)} = \frac{V}{V'} \cdot (N - N') \cdot 0,05 \cdot 1,4}{P}$$

où V est le volume de la solution minéralisée (ml), V' est le volume de la solution de soude ajoutée (ml), N est la quantité d'acide sulfurique lue après titrage (ml) avec l'acide sulfurique de normalité 0,05 N, N' est le volume de l'acide sulfurique dépensé dans le titrage du témoin (ml) et P est le poids de la prise d'essai (g).

III.5.5. 2. Dosage des protéines solubles

- **Extraction des protéines soluble de la propolis brute**

L'extrait de la propolis est préparé par l'incubation des morceaux de propolis dans la solution tompon phosphate 0,1 M (PBS) pH 7,6 avec une proportion de 15 % à (4 à 8°C) pendant 4 à 8 heures.[122]

Les extraits sont centrifugés à 1000 tours par minute pendant 40 minutes et on récupère le surnageant.

- **Quantification des protéines solubles**

Le dosage des protéines totales solubles des extraits de propolis a été réalisé selon la méthode préconisée par **BRADFORD (1976)**. C'est une méthode colorimétrique qui permet la détermination des concentrations d'une solution protéique.

La méthode de BRADFORD est basée sur la variation de la coloration du bleu brillant de coomassie G250 lorsqu'il se fixe aux protéines. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéine dans le milieu.

Le réactif de BRADFORD se prépare en mélangeant

- 1- 100 mg de bleu de coomassie ;
- 2- 100ml de l'acide phosphorique à 85% ;
- 3- 50 ml d'éthanol à 95% ;
- 4- q.s.p 1000 ml d'eau distillée.

Ce réactif peut être conservé pendant 1 mois à 4 °C à l'obscurité.

Pour la quantification des protéines de la propolis, on prend 10 µl de l'extrait protéique de la propolis d'abeille avec 90 µl de la solution tampon et 5 ml de réactif de BRADFORD, bien mélangé. Le mélange est incubé à la température ambiante pendant 10 mn à l'abri de la lumière. On lit la D.O à 597 nm.

Une courbe d'étalonnage est tracée, on utilisant la B.S.A.(Bovin Sérum Albumine)

III. 6. Extraction des composés de la propolis

III. 6.1. Détermination de taux d'extraction par différents solvants

Principe : C'est l'étude de la capacité d'extraction des principes actifs par des différents solvants. Dans notre cas c'est une extraction liquide solide.

Cette dernière se définit donc comme une opération de séparation d'un ou plusieurs constituants solides ou liquides contenus dans un corps solide par solubilisation dans un fluide. Ce fluide, appelé généralement solvant.

On utilise deux types d'extraction :

➤ **Extraction à froid (macération) [120]**

Cette méthode consiste à couper la propolis en petits morceaux (3 à 5 mm), et à les macérer dans le solvant d'extraction, à une température ambiante pendant une semaine.

- On pèse 10 g dans 100 ml de solvant d'extraction ;
- La macération est conservée pendant une semaine sous agitation pour augmenter la surface de contact entre la propolis et le solvant, et à l'abri de la lumière pour éviter l'altération des principes actifs de la propolis ;
- On filtre le mélange, puis on élimine le solvant par rotavapor.

➤ **Extraction à chaud**

Elle est réalisée avec un soxlhet, sauf pour l'extraction avec l'eau (la température d'évaporation de l'eau est très élevée, alors que avec soxlhet on ne doit pas dépasser 60 °C). L'extraction à chaud avec l'eau comme solvant est réalisée en mettant de la propolis dans un ballon de 500 ml raccordé à un réfrigérant, puis chauffage pendant 5 à 6 heures.

III. 6. 2. Etude de l'influence du temps sur le rendement d'extraction

Il s'agit d'une macération de la propolis dans l'éthanol (70%) puis détermination du rendement après un temps d'une semaine, 20 jours, un mois, deux mois et trois mois.

Expression des résultats

$$TE\% = (M_i - M_f) / M_i * 100$$

M_i : Masse initiale

M_f : Masse finale

III. 6. 3. Optimisation de l'extraction de polyphénols de la propolis par combinaison de mélange de solvants [102]:

Cette méthode consiste à optimiser le taux d'extraction en fonction d'un mélange de solvant.

1. Préparation des solvants mixtes

L'extraction des polyphénols à partir des trois solvants utilisés (Ethanol, Hexane, Acétone), le logiciel du modèle expérimental « Minitab 15 » utilisé, nous a

proposé 10 mixtures possibles (tableau III-4), lesquelles sont utilisées pour l'extraction des polyphénols à partir de propolis.

Tableau N°III-4 : Proportion des différents solvants dans les mixtes.

mixtures	Ethanol %	Hexane %	Acétone %
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	17	17	66
5	33	33	33
6	50	0	50
7	50	50	0
8	0	50	50
9	66	17	17
10	17	66	17

Les proportions de chaque solvant dans la mixture varient entre 0 (absence du solvant) et 100% (la mixture est composée d'un seul solvant, et doivent satisfaire les conditions suivantes :

$$0 \leq X_i \leq 1$$

La teneur en polyphénols (la réponse) est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu's.

III.7. Analyse de la composition de l'extrait de propolis

III.7.1. Analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM)

- **Principe**

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire.

- **Méthode**

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de silicagel, sur un support rigide en verre ; 20/20 cm.

Deux microlitres (2 μ l) de l'extrait éthanolique ainsi que des étalons sont déposés à des points repères à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque. On a employé comme éluant trois systèmes différents : 1^{ier} système (Hexane 20%, Chloroforme 70%, eau 10%), 2^{iem} système (Hexane, Ethanol, 1% Acétone) et le troisième système (Ether de pétrole/Acétate éthylique (7 :3)).

Remarque

Le dernier système est utilisé pour étudier la composition en flavonoïdes, concernant les étalons, les temps de rétention donnés par la bibliographie ont été utilisés [103].

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm. Les couleurs des spots et les temps de rétention ont été enregistrés.

III. 7. 2. Caractérisation des extraits de propolis par la résonance Magnétique et Nucléaire (R M N) [104].

Le but de cette étude par la Résonance Magnétique et Nucléaire est de développer un système de classification des composés de la propolis, capable de fournir la caractérisation chimique des différents extraits de propolis Algérienne.

- **Principe :** il s'agit d'une méthode d'analyse basée sur la réponse des atomes d'hydrogène à la stimulation d'un champ magnétique. Les atomes d'hydrogène entament alors un mouvement de précision.

- **Méthode d'analyse**

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur un appareil Bruker DRX-600, fonctionnant à 250 MHz. Les extraits de propolis ont été dissous dans le deutérochloroforme.

Les déplacements chimiques δ sont donnés en ppm.

III.7.3. Détermination de la teneur en éléments minéraux par spectroscopie d'absorption atomique [105].

En absorption atomique la concentration est déduite de la mesure de l'absorption de la lumière par les atomes de l'élément restés à l'état fondamental lorsqu'ils sont éclairés par une source lumineuse convenable. La mesure de l'intensité est faite à une longueur d'onde spécifique de l'élément.

- **Mode opératoire (NF V 05 – 113, 1972)**

Aux cendres obtenues après incinération d'une masse bien déterminée de propolis brut est ajoutée 1 ml d'acide chlorhydrique et 10ml d'eau distillé. Après chauffage du mélange dans un bain marie bien bouillant jusqu' à dissolution des cendres, on complète à 100 ml.

A partir de cette solution, nous avons effectué le dosage des éléments minéraux suivant : le sodium, le fer, le potassium, le plomb, le zinc, le cuivre, le manganèse, le chrome, le cobalt, le cadmium, le nickel, par spectrophotométrie d'absorption atomique.

III.8. Etude statistique

- Toutes les expériences ont été faites en triple. Les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type ($n = 3$) pour chaque cas les différences ont été considérées significatives à $p < 0.05$. L'homogénéité des échantillons est évaluée en utilisant le coefficient d'homogénéité α .
- Pour pouvoir juger de l'homogénéité des variances, de la signification des paramètres de modèle et de sa validité, nous avons procédé aux tests suivants : test de Cochran, test de Student et le test de Fisher.
- Pour la validation de modèle, on a utilisé le critère de coefficient de détermination.
- Analyse en composante principale pour déterminer les paramètres les plus significatifs pour différencier entre les échantillons analysés.



CHAPITRE IV :

Résultats et discussion

Chapitre IV Résultats et discussion

IV.1. Les résultats des analyses physiques

IV.1.1. Pertes pendant le séchage :

Les résultats de la teneur en pertes pendant le séchage (élimination d'humidité et les matières volatiles à 105 °C) sont reportés dans le tableau N°IV-1.

Tableau N° IV-1 : les pertes pendant le séchage et le pourcentage de la matière sèche des échantillons de propolis.

Echantillon		Taux des pertes pendant le séchage (%)	Moy ± SD de la classe	Matière sèche (%)
Montagne	Yakouren (2006)	2,30 ± 0,20	2,50 ± 0,79	97,70
	Yakouren (2007)	1,67 ± 0,06		98,33
	Yakouren (2008) « a »	1,26 ± 0,21		98,74
	Yakouren (2008) « b »	3,17 ± 0,05		96,83
	Dellys	2,97 ± 0,20		97,03
	Bouzgen	2,77 ± 0,15		97,23
	Ain El hammam	3,39 ± 0,26		96,60
Plaine	Isser	2,57 ± 0,3	2,43 ± 0,79	97,43
	Mitidja (2007)	1,47 ± 0,28		98,53
	Mitidja (2008)	3,89 ± 0,06		96,11
	Chaabet	2,31 ± 0,13		97,69
Steppe	Sahara (abeille tellienne)	2,58 ± 0,07	2,48 ± 0,96	97,42
	Sahara (abeille saharienne)	1,47 ± 0,15		98,53
	Laghouat	3,39 ± 0,23		96,61

Nous constatons que les échantillons de propolis Algérienne sont très pauvres en eau et matières volatiles, ce qui procure à la propolis sa structure solide, qui est en adéquation avec la nature hydrophobe de la plupart des constituants. Les analyses des échantillons ont révélé un taux faible de pertes pendant le séchage compris entre 1,26 à 3,89 %. Cela signifie que la presque totalité du poids de la propolis est constituée par la matière sèche (96% à 98,53% de matière sèche).

Comparativement aux propolis d'Argentine (1,4 % à 6,2 %) [2], Ces valeurs de pertes de la propolis Algérienne sont légèrement inférieures. Les conditions de stockage ainsi que les conditions climatiques peuvent influencer cette proportion.

La propolis de la Mitidja 2008 a présenté le taux de perte le plus élevé qui est de l'ordre de 3,89 %, ce la peut s'expliquer par les mauvaises conditions de conservation de cet échantillon (conservation à l'air libre), par contre un autre échantillon de la même région bioclimatique (Mitidja) a présenté un taux de pertes de l'ordre 1,47 c'est-à-dire deux fois moins que le premier échantillon, les autres propolis ont montré des taux moyens de l'ordre 2,57 et 2,31 respectivement pour la propolis des Isser et de Chaabet.

Dans le groupe montagne, l'échantillon de Yakouren 2008 « a », présente le taux de perte le plus faible (1,26 %), contrairement à un autre échantillon de la même région (propolis de Yakouren 2008 « b ») qui a présenté un taux un peu plus élevé (3,17 %). Les autres échantillons de la région montagne de Kabylie ont présenté un taux de pertes moyen de (1,67 % ; 2,3 % ; 2,97% ; 2,77% et 3,39 %) respectivement pour la propolis de Yakouren (2007), Yakouren (2006), Dellys, Bouzgen et la propolis d'Ain El hammam.

Pour la dernière région c'est à dire la steppe, deux échantillons de propolis ont montré un taux de perte un peu élevé, la propolis de Laghouat (3,39 (écart type : 0,23%)) et la propolis de l'abeille tellienne qui a présenté un taux de perte pendant le séchage de l'ordre de 2,58 %, cette dernière peut s'expliquer par l'absorption de l'humidité pendant le stockage (stockage à l'air libre).

En comparant la moyenne des trois régions et en éliminant les échantillons mal conditionnés, on peut en déduire que les trois groupes montagne, plaine et le groupe de la propolis Saharienne présentent respectivement des taux d'humidité moyens comparables de 2,39 (écart type : 0,81%) ; 2,12 (écart type : 0,57%) et 2,43 (écart type : 1,34%), ce qui montre que les pertes pendant le séchage ne permettent pas de faire la différence entre les trois groupes.

IV.1.2. Taux de cendres

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 N° IV-2.

Tableau N° IV-2 : Taux des cendres et de la matière organique de la propolis

Echantillon		Taux des cendres (%)	Taux de la matière organique (MO %)
Montagne	Yakouren (2006)	4,21 ± 0,47	95,79
	Yakouren (2007)	2,91 ± 0,14	97,09
	Yakouren (2008) « a »	3,11 ± 0,15	96,89
	Yakouren (2008) « b »	2,54 ± 0,14	97,46
	Dellys	2,98 ± 0,16	97,02
	Bouzgen	2,80 ± 0,22	97,2
	Ain El hammam	5,32 ± 0,24	94,68
Plaine	Isser	2,29 ± 0,16	97,71
	Mitidja (2007)	2,41 ± 0,21	97,59
	Mitidja (2008)	3,05 ± 0,35	96,95
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	1,58 ± 0,21	98,49
	Laghouat	4,43 ± 0,12	95,57
	Sahara (abeille tellienne)	2,01 ± 0,21	97,99

Nous constatons que les échantillons de propolis Algérienne ont montré un taux de cendres variant entre 1,58% et 5,32 %. 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 (5%) [6, 59].

L'échantillon d'Ain El Hammam de la région montagne de Kabylie présente le taux de cendre le plus élevé qui est de l'ordre de 5,32 %, par contre les autres échantillons de la même région ont présenté des valeurs moyennes de (4,21% ; 2,91% ; 3,11% ; 2,54% ; 2,8% et 2,29%) respectivement pour les échantillons de Propolis de Yakouren (2006), Yakouren (2007), Yakouren (2008) « a », Yakouren (2008) « b », Dellys, et celle de Bouzgen.

Les échantillons de propolis de la plaine ont montré un taux de cendres plus au moins faible par rapport aux échantillons de montagne. Ce taux est de l'ordre de 2,24% ; 2,41% et

3,05% respectivement pour les échantillons de Propolis des Isser ; de la Mitidja (2007) et de la Mitidja (2008). Pour les propolis saharienne eux aussi ont montrés un taux de cendre moyen par rapport aux autres échantillons, 1,58% ; 2,01% et 4,43% respectivement pour la propolis saharienne de l'abeille saharienne, la propolis de Sahara de l'abeille tellienne et la propolis de Laghouat.

Les résultats des taux des cendres d'une propolis de différentes races d'abeille dans la même région (propolis saharienne abeille tellienne et sahariensis), ont révélé un écart moyen de l'ordre de 0,43.

Le tableau N° IV-3 montre la comparaison entre le taux de cendre moyen de chaque région :

Tableau N° IV-3 : Comparaison de taux des cendres entre les trois groupes.

	Groupe montagne n= 7	Groupe plaine n= 3	Groupe sahara n= 3	Tous les échantillons n= 13
Min (%)	2,54	2,29	1,58	1,58
Max (%)	5,32	3,05	4,43	5,32
Moyenne (%)	3,20	2,35	2,67	3,05
Ecart type (%)	0,57	1,08	1,53	1,04
α (Ecart type/moyenne)	0,18	0,46	0,57	0,34

Les échantillons de propolis du groupe plaine ont montré un taux de cendres faible d'une valeur de 2,35 (: 1,08) tandis que le groupe montagne présente le taux le plus élevé de 3,20 (écart type : 0,57%), le groupe de propolis Saharienne présente des valeurs intermédiaires, c'est le groupe le plus hétérogène $\alpha = 0,57$.

Les valeurs du taux de cendres de la propolis algérienne ont été supérieures comparativement aux propolis d'Argentine (1,8% à 2,4%) [2].

IV.1.3. Masse volumique de la propolis brute

Les résultats de détermination de la masse volumique des différents échantillons analysés sont présentés dans le tableau N° IV-4. Les résultats du calcul de la masse volumique et de l'écart type correspondant sont exprimés en Kg/m³.

Tableau N°IV- 4: Masse volumique des différents échantillons de propolis.

Echantillon		Masse volumique moyenne $\times 10^3$ (kg /m³)
Montagne	Yakouren (2006)	1,01 \pm 0,05
	Yakouren (2007)	1,03 \pm 0,01
	Yakouren (2008) « a »	1,06 \pm 0,07
	Yakouren (2008) « b »	1,02 \pm 0,09
	Dellys	1,05 \pm 0,06
	Bouzgen	1,18 \pm 0,09
	Ain al hammam	1,12 \pm 0,10
Plaine	Isser	1,12 \pm 0,05
	Mitidja (2007)	1,04 \pm 0,04
	Mitidja (2008)	0,98 \pm 0,09
	Chaabet	1,14 \pm 0,15
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	1,10 \pm 0,05
	Laghout	1,07 \pm 0,04
	Sahara (abeille tellienne)	0,98 \pm 0,02

Ces résultats varient entre 1,01 (écart type = 0,05) et 1,18 (écart type = 0,09), ce qui signifie que la propolis est plus dense que l'eau. Mais pour les échantillons dégradés, la masse volumique est de l'ordre de 0,98 ; cela peut s'expliquer par la non homogénéité de ces échantillons et la perte d'une grande partie des constituants.

Les résultats illustrés dans le tableau 5, montrent qu'il n'y a pas une différence significative entre la densité des propolis répartis par région (montagne, plaine et la sahara).

Tableau N° IV- 5 : Comparaison de la masse volumique entre les trois groupes.

	Groupe montagne n = 7	Groupe plaine n = 4	Groupe steppe n = 3
ρ Max	1,18	1,14	1,10
ρ Min	1,01	1,04	1,08
ρ Moy	1,07	1,10	1,08
Ecart type	0,06	0,05	0,02
α (Ecart type/moyenne)	0,06	0,04	0,02

IV.1.4. Point de fusion

Les résultats de détermination de point de fusion des différents échantillons analysés sont présentés dans le tableau N° IV-4.

Tableau N° IV-6: le point de fusion des différents échantillons de propolis.

	Echantillon	point de fusion
Montagne	Yakouren (2006)	82,0 ± 1,0
	Yakouren (2007)	71,8 ± 0,8
	Yakouren (2008) « a »	70,1 ± 0,3
	Yakouren (2008) « b »	72,3 ± 0,3
	Dellys	69,1 ± 1,6
	Bouzgen	67,8 ± 0,8
	Ain El hammam	75,3 ± 0,6
Plaine	Isser	65,8 ± 0,8
	Mitidja (2007)	70,5 ± 1,3
	Mitidja (2008)	68,3 ± 1,0
	Chaabet	78,6 ± 0,6
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	75,7 ± 0,6
	Laghouat	76,3 ± 1,2
	Sahara (abeille tellienne)	78,4 ± 0,4

Les résultats obtenus indiquent que le point de fusion des différents échantillons de la propolis Algérienne varie entre **65,8** (écart type : **0,8**) présenté par l'échantillon d'ISSER à **82,0** (écart type : **1,0**) présenté par l'échantillon de Yakouren 2006.

Tableau N° IV-7 : comparaison de point de fusion entre les trois groupes.

	Groupe montagne n= 7	Groupe plaine n= 4	Groupe sahara n= 3	Tous les échantillons n= 14
Min (°C)	67,8	65,8°	75,7	65,8
Max (°C)	82,0	78,6	78,4	82,0
Moyenne (°C)	72,6	70,8	76,8	73,0
Ecart type	4,8°	5,5	1,4	4,8
α (SD/moyenne)	0,07	0,08	0,02	0,06

En comparant la moyenne des trois groupes (tableau N°IV-7), on constate que le groupe steppe présente le point de fusion le plus élevé (**76,8 °C**). Par contre le groupe de la plaine présente la valeur la plus faible (**70,8 °C**).

IV.2. Analyses chimiques

IV.2.1. Détermination de pH de la propolis

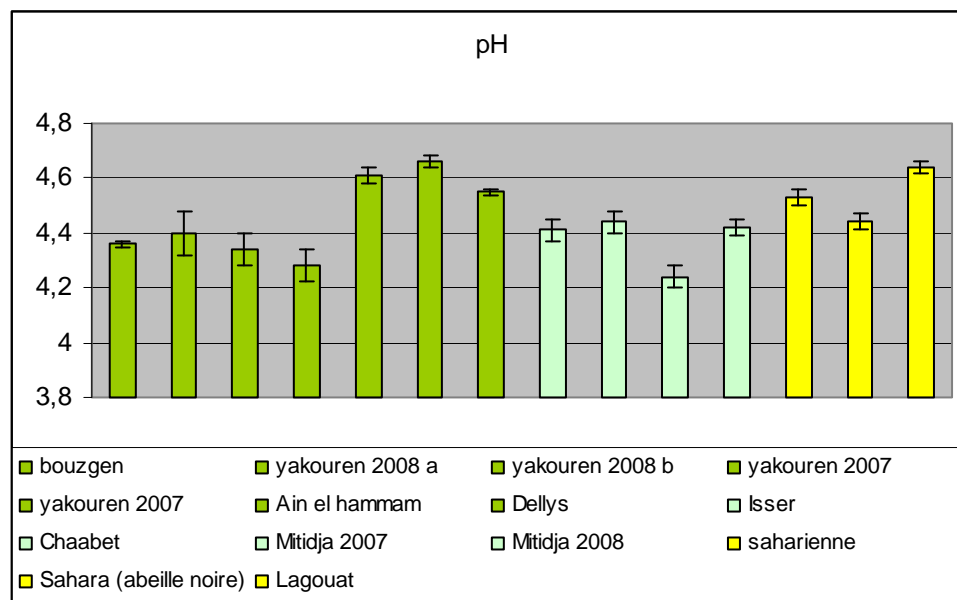


Fig. N° IV-1 : Valeur de pH des différents échantillons de propolis.

Les différents échantillons de propolis ont montré un pH variant entre 4,24 et 4,66. Ce qui signifie que 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.

D'après les résultats illustrés dans le tableau N° 8, on remarque que les échantillons de propolis du groupe steppe ont montré un pH moyen le plus élevé 4,54 (écart type : 0,10), tandis que le groupe montagne présente un pH de l'ordre de 4,45 (écart type : 0,19), le groupe plaine présente des valeurs intermédiaires.

Tableau N° IV-8: comparaison du pH entre les trois groupes.

	Groupe montagne N = 7	Groupe plaine n =4	Groupe steppe n =3
pH Max	4,66	4,44	4,64
pH Min	4,28	4,24	4,44
pH Moy	4,46	4,38	4,54
Ecart type	0,19	0,10	0,10
α (Ecart type/moyenne)	0,04	0,02	0,02

IV.2.2. Détermination de l'acidité titrable de la propolis brute

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

Les résultats de dosage de l'acidité titrable des échantillons de propolis sont présentés dans le tableau N°IV-9.

Tableau N° IV-9: Acidité des différents échantillons de propolis.

	Echantillon	Acidité (%)
Montagne	Yakouren (2006)	7,24 ± 0,34
	Yakouren (2007)	7,52 ± 0,40
	Yakouren (2008) « a »	7,60 ± 0,40
	Yakouren (2008) « b »	6,93 ± 0,23
	Dellys	4,73 ± 0,61
	Bouzgen	7,30 ± 0,42
	Ain El hammam	8,67 ± 0,23
Plaine	Isser	7,33 ± 0,23
	Mitidja (2007)	7,58 ± 0,34
	Mitidja (2008)	10,67 ± 0,23
	Chaabet (2009)	7,87 ± 0,46
Steppe	Sahara (abeille tellienne)	6,27 ± 0,46
	Sahara (abeille saharienne)	6,84 ± 0,16
	Laghouat (2009)	6,53 ± 0,46

Les résultats obtenus mettent en évidence la nature acide de la propolis. L'acidité de la propolis étudiée varie entre 6,25% (écart type = 0,46%) et 8,67% (écart type = 0,23%). L'échantillon de Dellys a montré la valeur la plus faible de 4,73% (écart type = 0,61%). Par contre la propolis de la Mitidja 2008 a montré la valeur la plus élevée de 10,67% (écart type = 0,23%), ce qui peut être expliqué par la dégradation de l'échantillon ou bien la différence de la flore botanique entre ces deux régions.

Le tableau qui suit montre la comparaison entre le pourcentage en acidité par région.

Tableau N°IV-10 : comparaison du pourcentage d'acidité titrable entre les trois groupes.

	Groupe montagne n =7	Groupe plaine n =4	Groupe steppe n =3
Min	4,73	7,33	6,27
Max	8,61	7,87	6,84
Moy	7,14	7,59	6,55
Ecart type	1,19	0,27	0,28
α (Ecart type/moyenne)	0,16	0,04	0,04

En comparant les pourcentages de l'acidité entre les trois régions, on peut en déduire que la région de la plaine a montré la valeur la plus élevée par rapport au deux autres groupes, avec une valeur moyenne de 7,59 % (Ecart type : 0,27).

➤ **Corrélation entre le pH et le pourcentage de l'acidité**

L'étude de l'existence d'une corrélation entre le pH et l'acidité titrable nous donne en effet un coefficient de corrélation linéaire de valeur élevée entre les valeurs du pH et les pourcentages en acidité titrable de différentes régions ($r = 0,94$) (**fig.IV-2**)

L'acidité titrable est inversement proportionnelle au pH et elle est régie par l'équation :

$$AT (\%) = - 4,8 \text{ pH} + 27,9$$

Elle est traduite concrètement par le fait que pour chaque unité pH en plus il y a perte d'acidité titrable de l'ordre de 4,8% ; et ceci pour des pH inférieurs à 5,81 point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses.

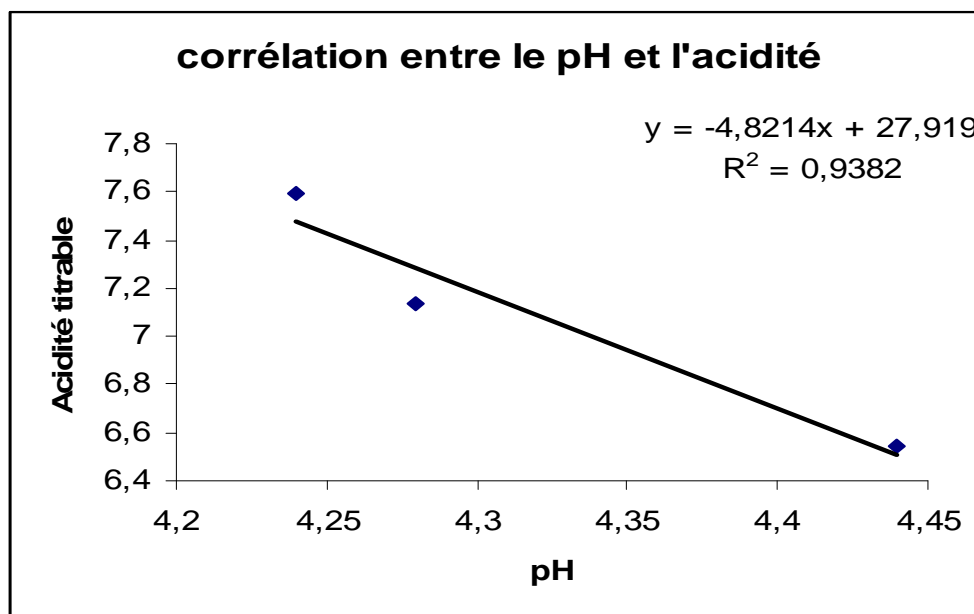


Fig.IV-2. Corrélation entre le pH et l'acidité titrable.

IV.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant, d'autres reposent sur la mesure de la capacité d'une substance à piéger les composés radicalaires [105, 106].

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de propolis étudiées a été déterminée en utilisant deux méthodes différentes :

- La première méthode par l'estimation du pouvoir réducteur, qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux).
- La deuxième est l'évaluation du pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation du radical DPPH[°] par les antioxydants présents dans les extraits éthanoliques des propolis étudiées.

Les antioxydants peuvent réagir à différentes étapes du procédé d'oxydation et ils peuvent avoir plus d'un mécanisme d'action, il n'existe pas de test de référence in vitro pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon. Pour cela, la combinaison de différents tests est un indicateur de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester [107].

IV.3.1. Détermination du pouvoir réducteur

Les figures N°IV-3,4,5 indiquent Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis

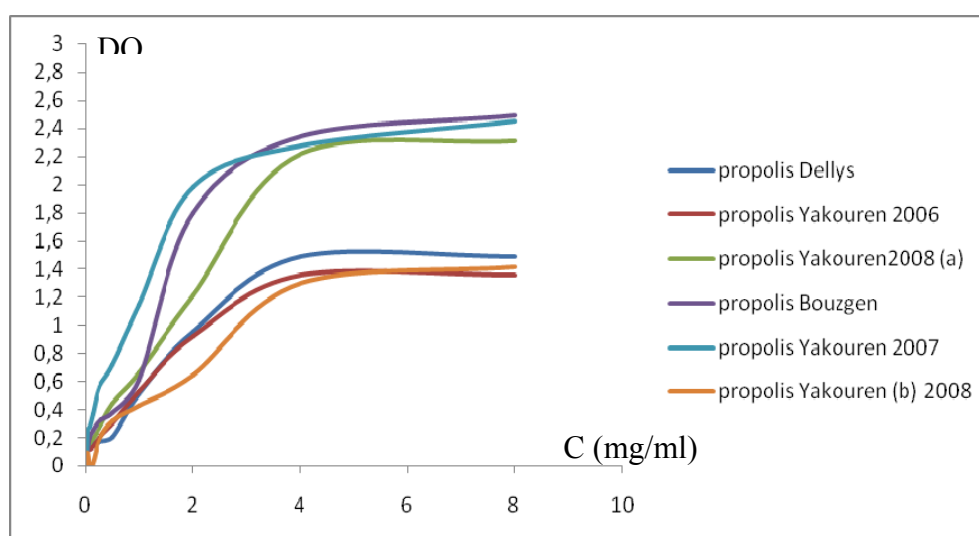


Fig. N°IV-3 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis de la région bioclimatique de la montagne.

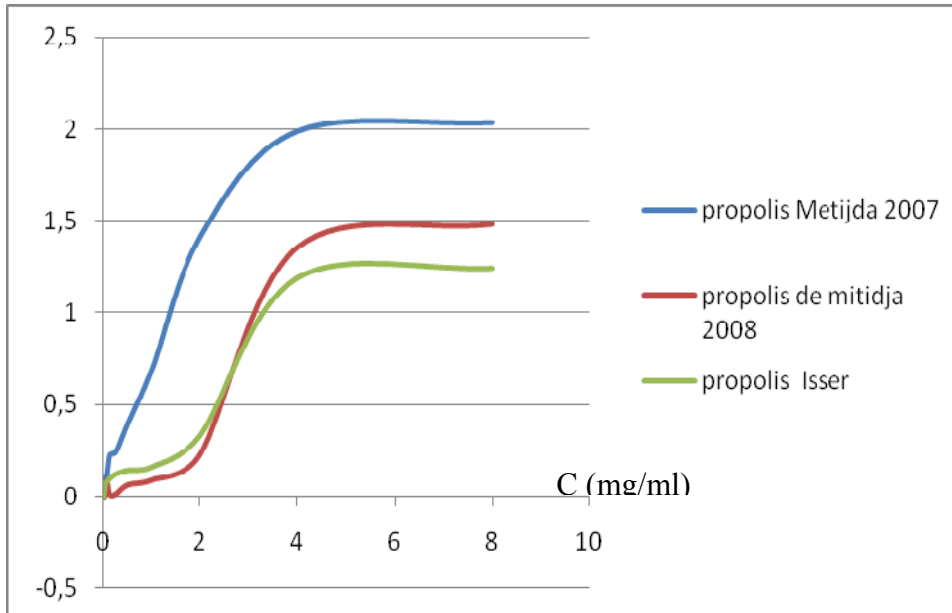


Fig. N° IV-4 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis des échantillons du groupe plaine.

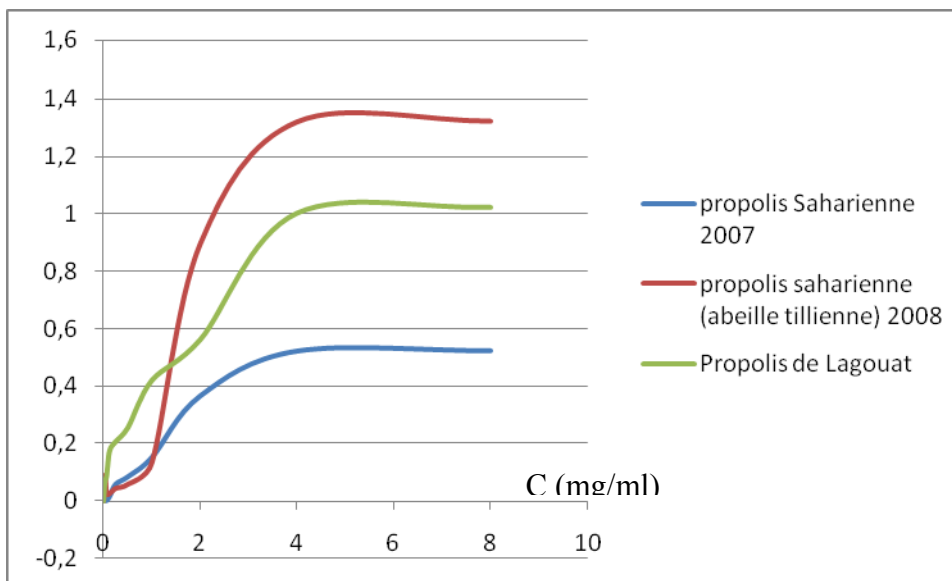


Fig. N°IV-5 : Variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration de propolis des échantillons du groupe steppe.

Le pouvoir réducteur est souvent employé comme indicateur de la capacité d'un composé à céder un électron. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant qui est un mécanisme important qui examine l'action antioxydante des composés phénoliques [108].

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de l'échantillon testé. Cette activité antioxydante est basée sur la réduction du Fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer (II) [109].

La révélation du pouvoir réducteur d'un échantillon est basée sur le virage de la couleur jaune de ferricyanure de potassium vers une couleur bleu verdâtre dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque échantillon. Ce dernier dépend essentiellement de la quantité de réducteurs présents dans le milieu testé. Ce qui se traduit par l'augmentation de l'absorbance au fur et à mesure que cette quantité augmente, elle est estimée par la mesure de l'absorbance de la solution à 700 nm [89].

Les résultats obtenus (fig. 3,4 et 5) montrent que le pouvoir réducteur est fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de la propolis. Ces résultats sont comparés entre eux (les différentes régions) et avec celle d'un antioxydant artificiel (BHT) (voire annexe n°1). Les concentrations des extraits varient entre 2 et 8 mg/ml.

L'analyse des résultats dévoile que le pouvoir réducteur se différencie d'une région à une autre et d'un échantillon à un autre de la même région. On remarque aussi qu'il y a des échantillons qui peuvent transformer totalement le Fer (III) en Fer (II), ce qui signifie que ces extraits de la propolis contiennent suffisamment d'antioxydants pour transformer la quasi-totalité de ferricyanates, c'est le cas des échantillons de Bouzgen, Yakouren (2008) et Mitidja (2007) contrairement aux autres.

La propolis de Bouzgen et Yakouren (2008) ont présenté une activité réductrice plus importante que les autres, par contre la propolis des Isser a présenté la plus faible activité réductrice. Cette activité peut être comparée en calculant la valeur EC_{50} c'est-à-dire la valeur de la concentration de propolis qui nous permet de transformer la moitié de Fe^{+3} en Fe^{+2} .

D'après Les résultats d' EC_{50} reportés dans le (tableau N 11), l'échantillon de Bouzgen a montré une valeur très faible de EC_{50} par rapport aux autres échantillons ($EC_{50} = 1,1\text{mg/ml}$) ce qui prouve que cet échantillon a un pouvoir réducteur très élevé ce qui peut s'expliquer par la présence importante des antioxydants naturels, c'est la même chose pour la propolis de

Ykouren 2007 et 2006 ($EC_{50} = 1,2\text{mg/ml}$). Pour l'échantillon des Isser, le EC_{50} est de $2,2\text{mg/ml}$; c'est la valeur la plus élevée c'est-à-dire la force réductrice la plus faible. Les autres échantillons ont montré des valeurs moyennes (Propolis de Dellys : 1,85, Saharienne : $1,75\text{mg/ml}$, Mitidja : $1,6\text{mg/ml}$, propolis de Yakouren 2008 : $1,75\text{mg/ml}$).

Tableau N° IV-11 : les différentes valeurs de EC_{50} pour le pouvoir réducteur.

Echantillon		EC_{50}
Montagne	Yakouren (2006)	1,2
	Yakouren (2007)	1,2
	Yakouren (2008) « a »	1,7
	Yakouren (2008) « b »	2,3
	Dellys	1,8
	Bouzgen	1,1
plaine	Isser	2,2
	Mitidja (2007)	1,6
	Mitidja (2008)	2,2
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	1,7
	Laghout	1,2
	Sahara (abeille tellienne)	1,2

En comparant nos résultats d' EC_{50} avec ceux de la littérature [89] (la propolis du Portugal), on remarque un écart remarquable. Ces derniers ont un pouvoir réducteur plus élevé que nos échantillons ($EC_{50} = 0,009\text{ mg/ml}$ pour la propolis de Bornes, $EC_{50} = 0,55\text{ mg/ml}$ pour la propolis de Fundao). Cet écart peut être expliqué par la différence de la nature de la flore botanique de l'Algérie et celle du Portugal (la région influe sur la composition de la propolis [7,11] ou bien la race d'abeille est différente de la notre [24] et aussi l'âge de la propolis.

IV.3.2. Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH

Le test au DPPH (2,2 –diphényle-1-picrylhydrazyle) choisi dans cette étude est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne la décoloration de ce dernier [91].

La méthode est rapide et commode à mettre en œuvre, elle s'effectue à température ambiante, permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules testées.

Ce teste consiste à mettre le radical DPPH en présence de molécules dites « antioxydants » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. La forme réduite n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde [91].

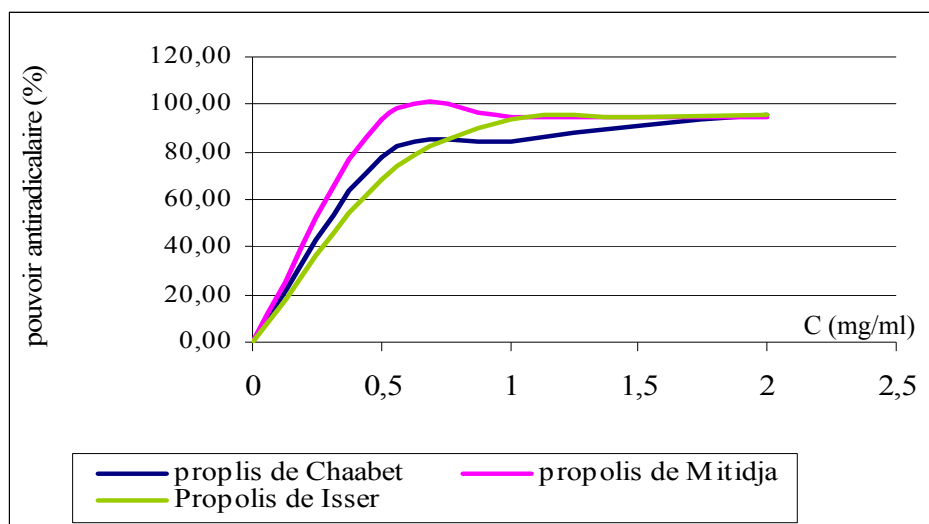


Fig. N° IV-6: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région plaine.

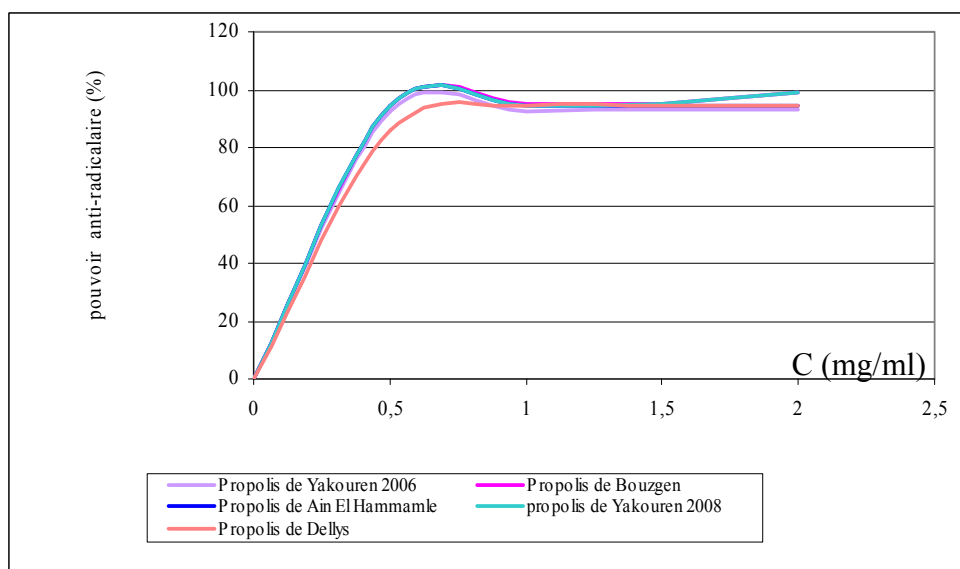


Fig. N°-IV.7: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région Montagne.

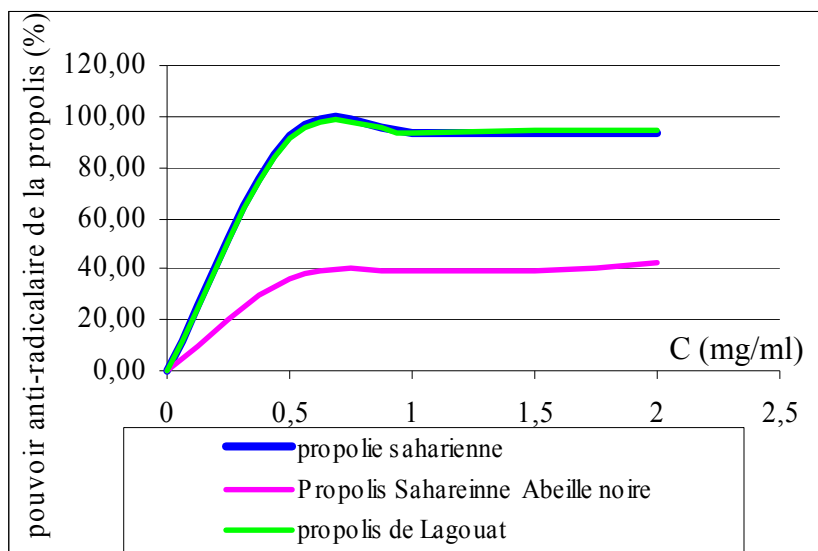


Fig. N° IV-8: Pouvoir anti-radicalaire des propolis de la région steppe.

Les résultats illustrés dans les figures N° (IV-6, IV-7 et IV-8) montre que les activités antiradicalaires des extraits éthanoliques de la propolis sont assez important, tous les échantillons analysés ont éliminé la totalité des radicaux libres (c'est-à-dire le pouvoir antiradicalaire atteint 100 % à des concentration faibles allant de 0,5 à 0,7 mg /ml de propolis brute), sauf pour l'échantillon dégradé (propolis Saharienne « abeille noire ») qui n'a pu réduire que 40 % des radicaux libres.

On remarque aussi que le pouvoir antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration, ce qui a été remarqué avec le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques ainsi que dans l'étude réalisé par [89].

Afin d'établir une comparaison entre les échantillons on a déterminé les EC_{50} Tableau N° V-12. Quelques échantillons de la région Saharienne présentent une activité antiradicalaire importante, le cas des échantillons de Laghouat et la Saharienne (Ain Oussara) ($EC_{50} = 0,19$ mg /ml). Par contre l'échantillon dégradé présente la valeur de EC_{50} la plus élevée ($EC_{40} = 0,5$ mg / ml) ce qui peut s'expliquer par la disparition par transformation des antioxydants aux cours du stockage (mauvais conditionnement implique l'oxydation des antioxydants en premier lieu).

Concernant le groupe montagne, c'est l'échantillon provenant de Dellys qui présente le pouvoir antiradicalair le plus faible ($EC_{50} = 0,28$). Les autres échantillons présentent une valeur moyenne ($EC_{50} = 0,22$ mg / ml).

Les échantillons du groupe plaine présentent des valeurs de EC_{50} de l'ordre 0,22 mg / ml ; 0,30 mg / ml et 0,35 mg / ml respectivement pour Mitidja 2007, Chaabet et Isser.

Tableau N° I-12 : Valeurs d' EC_{50} des différents échantillons de propolis analysés.

Echantillon		EC_{50} (mg / ml)
Montagne	Yakouren (2006)	0,22
	Yakouren (2008) « a »	0,22
	Bouzgen	0,22
	Ain al hammame	0,22
Plaine	Isser	0,35
	Mitidja (2007)	0,22
	Chaabet	0,30
Steppe	Ain Oussara (abeille tellienne)	0,50 (- 40%)
	Ain Oussara (abeille saharienne)	0,20
	Laghouat	0,20

En comparant la moyenne des EC_{50} des trois régions et on éliminant l'échantillon mal conditionné, on peut en déduire que la région Saharienne présente le meilleur pouvoir antiradicalaire estimé à ($EC_{50} = 0,20$ mg / ml) suivi par le groupe montagne ($EC_{50} = 0,23$). La région plaine présente une valeur de $EC_{50} = 0,29$ mg/ml.

L'étude réalisée Sur les extraits éthanolique de la propolis provenant du Portugal a montré que les valeurs obtenus d' EC_{50} sont de l'ordre de 0,006 mg/ml et 0,025 mg /ml respectivement pour la propolis de *Bornes* et *Funddao* [89]. Résultats, de loin, inférieurs à ceux trouvés dans notre étude, donc la propolis du Portugal a un pouvoir antiradicalaire plus important que nos échantillons analysés.

➤ **Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur.**

Plusieurs tests évaluant l'activité antioxydante ont été rapportés par la littérature. Les deux tests employés dans la présente étude sont l'activité anti-radicalaire en employant le radical libre stable DPPH, tandis que l'autre test basé sur le pouvoir réducteur des échantillons, repose sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) en Fer (II). Ces deux tests se reposent sur les propriétés redox des antioxydants, en effet les antioxydants utilisent

deux mécanismes d'action contre les radicaux libres, qui sont respectivement les transferts d'atomes d'hydrogène et d'électrons.

La corrélation est faite en utilisant les EC_{50} des échantillons analysés obtenus par le pouvoir réducteur et celle obtenus par le pouvoir anti-radicalaire (Fig. N° IV-9, IV-10 et IV-11).

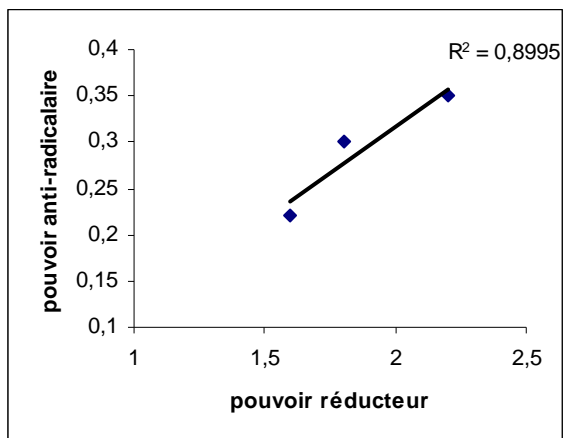


Fig. N°IV-9. a)- région plaine

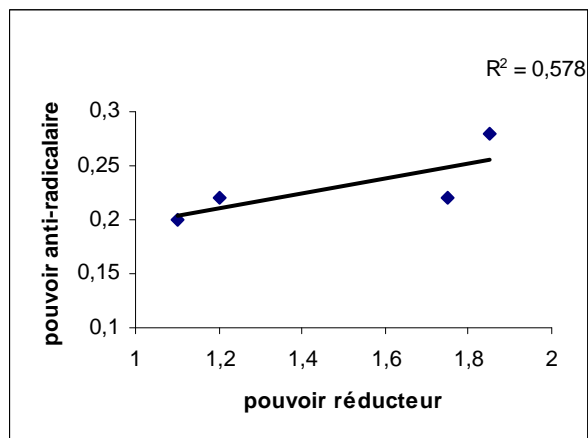


Fig. N°IV-9. b)- région montagne

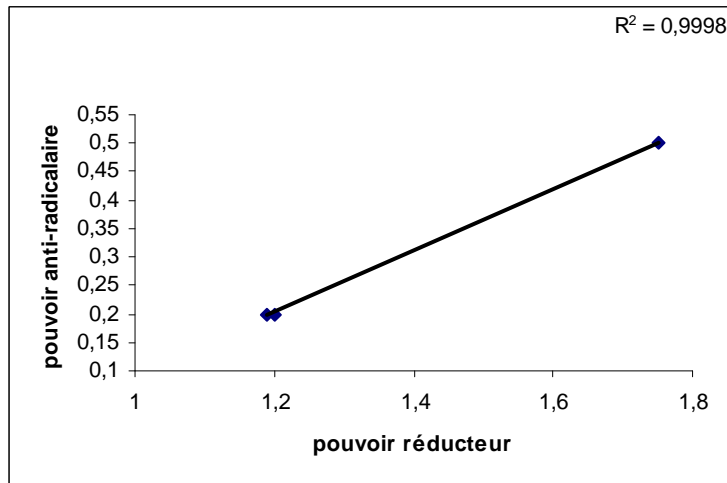


Fig. N° IV-9.c)- région Steppe

Fig. N° IV-9. Corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire et le pouvoir réducteur des propolis de différentes régions.

Les coefficients de corrélation obtenus reflètent l'existence d'une très bonne corrélation entre l'activité anti-radicalaire et le pouvoir réducteur $r = 0,95$ et $0,99$ respectivement pour le groupe plaine et steppe. Par contre dans la région montagne, on a obtenu une mauvaise corrélation ($r = 0,76$), cela peut s'expliquer par la qualité des composés (c'est-à-dire la nature des composés responsables de l'activité antioxydante) [110].

IV.4. Quantification de quelques composés principaux de la propolis

IV.4.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits éthanoliques bruts au moyen du dosage par spectrométrie, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Deux courbes d'étalonnage (**figures 1 et 2, annexe I**) ont été tracées, la première réalisée avec de l'acide Gallique à différentes concentrations, l'autre avec la Quercitine ; les mesures de densité optique ont été réalisées à 760 nm pour les polyphénols et à 430 nm pour les flavonoïdes.

Les quantités des polyphénols et des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminées par deux équations linéaires de type :

$$Y = a X + b$$

La teneur en polyphénols et flavonoïdes se différencie d'un échantillon à un autre selon l'origine botanique de la propolis, c'est-à-dire la région des provenances [89], comme illustrées dans les tableaux N° **IV-13** et **IV-14**.

IV.4.1.1. La teneur en polyphénols

Les résultats du dosage des polyphénols totaux dans les échantillons de propolis analysés sont présentés dans le tableau N° IV-12. Les valeurs de la concentration et de l'écart type correspondant sont exprimés en mg d'équivalent d'acide Gallique par gramme de propolis brute (mg EAG / g M brute). (Annexe I)

Tableau N° IV-13 : Teneur en polyphénols des différents échantillons de propolis.

Echantillon		quantité de polyphénols en mg/g de propolis
Montagne	Yakouren (2006)	206,11 ± 4,98
	Yakouren (2007)	254,30 ± 3,30
	Yakouren (2008) « a »	215,00 ± 5,00
	Yakouren (2008) « b »	11,53 ± 0,60
	Dellys	135,67 ± 0,16
	Bouzgen	310,37 ± 0,6
	Ain al hammame	277,00 ± 6,50
Plaine	Isser	100,57 ± 1,27
	Mitidja (2007)	227,85 ± 1,69
	Mitidja (2008)	35,77 ± 2,25
Steppe	saharienne (abeille saharienne)	247,58 ± 3,80
	Laghouat	241,26 ± 3,25
	Sahara (abeille tellienne)	60,00 ± 1,20

Les teneurs en polyphénols totaux des différents échantillons de propolis présentent des écarts significatifs, la variation passe de 11,53 (Ecart type : 0,6) mg EAG /g de propolis brute (le cas des échantillons dégradés) à 310,37 (Ecart type : 0,16) mg EAG / g de propolis brute (le cas des échantillons en bon état).

Compte tenu des résultats obtenus, nous remarquons que la teneur en polyphénols totaux est différente d'un échantillon à un autre de la même région. Dans le groupe montagne, la propolis de Bouzègen présente la valeur la plus élevée qui de 310,37 (Ecart type : 0,16) mg EAG / g de propolis, par contre la propolis de Yakouren 2008 « b » présente la valeur la plus faible 11,53 (Ecart type : 0,6) mg EAG / g, cela peut s'expliquer par la dégradation de

l'échantillon donc une diminution des polyphénols par l'action de l'oxydation. Les autres échantillons présentent des valeurs moyennes variant entre 135,67 (Ecart type : 0,16) et 277,00 (Ecart type : 6.50) mg EAG / g de propolis.

Concernant le groupe de la plaine, on remarque aussi que l'échantillon dégradé (Mitidja 2008) présente la valeur la plus faible avec 35,77 (Ecart type : 2,25) mg EAG / g de propolis. Les autres échantillons présentent des valeurs moyennes comprises entre 100,57 (Ecart type : 1,27) et 227,85 (Ecart type : 1,69) mg EAG / g respectivement pour les échantillons des Isser et de Mitidja 2007.

Pour ce qui est de la steppe, les échantillons analysés présentent des valeurs moyennes de l'ordre de 241,62 (Ecart type : 3,25) et 247,58 (Ecart type : 3,80) respectivement pour la Saharienne (Ain Safra) et Laghouat, l'échantillon dégradé présente une valeur de 60,00 (Ecart type : 1,20).

En comparant la moyenne des trois régions et en éliminant les échantillons mal conditionnés, on peut déduire que les deux régions Montagne et steppe présentent des valeurs moyennes comparables de 233,75 et 244,42 mg EAG / g de propolis brute, mais les échantillons de la région steppique montrent une répartition plus homogène (Ecart type : 4,46). La plaine présente la valeur moyenne la plus faible de 161,21 mg EAG / g de propolis.

Fig. N° IV-12.

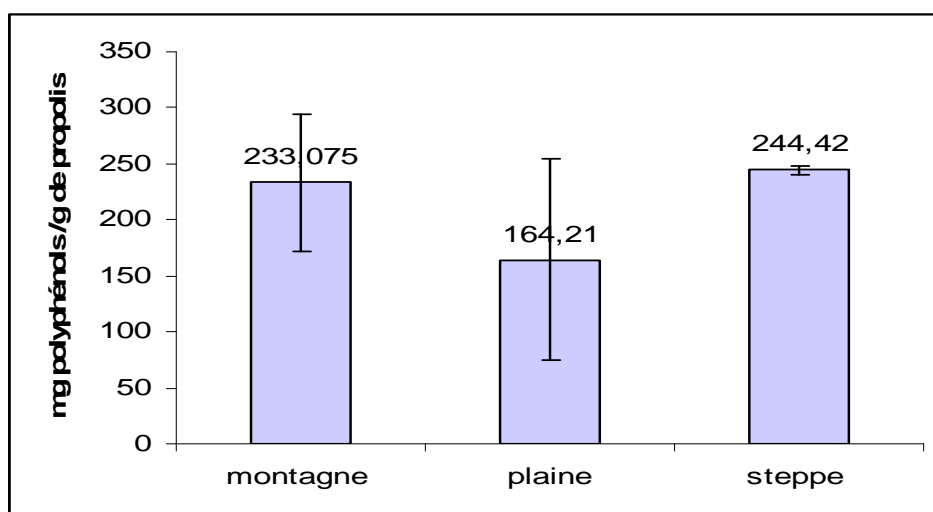


Fig. N° IV-10 : Comparaison de la teneur en polyphénols totaux entre les trois groupes.

Les investigations faites sur la détermination de la teneur en polyphénols totaux de la propolis d'abeille sont nombreuses, les résultats sont différents d'une étude à l'autre, on peut citer quelques unes :

La teneur en polyphénols totaux de la propolis Brésilienne est de l'ordre de 232 (Ecart type : 22.3) mg EAG/g, [49] cette valeur est en accord avec celle trouvée sur la propolis des groupes montagne et steppe.

L'étude réalisé sur la propolis du Portugal, montre des teneurs en polyphénols totaux qui oscillant entre 151,00 (Ecart type : 0,01) et 329,00 (Ecart type : 0,01) mg EAG /g de propolis respectivement pour la région de Fundao et Borne [89].

Les travaux réalisés sur la propolis Iranienne [13], ont rapporté des teneurs en composés phénoliques de l'ordre de 8,46% (Ecart type : 0,03) ; 7,11 % (Ecart type : 0,19) et 3,08% (Ecart type : 0,02) de propolis brute respectivement pour Tehran, Isfahn et Khorasan. Ces valeurs sont inférieures à celles trouvés dans la présente étude (23 à 24 g / 100 g de propolis brute), tandis que d'autres études ont trouvés des résultats comparables aux nôtres, et qui varient entre 11,3 et 83 g / 100g de propolis [2].

L'étude réalisée sur la propolis de la chine indique des résultats semblables aux résultats obtenus dans cette étude, ces valeurs en composés phénoliques oscillent entre 85 (Ecart type : 2) et 228 (Ecart type : 8) mg / g de propolis [111].

- **Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur**

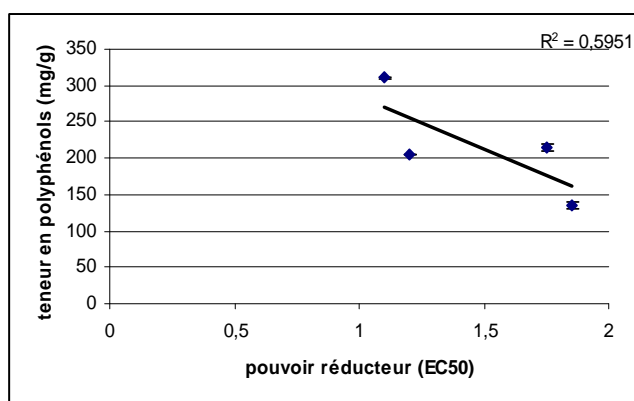


Fig. N° IV-11-a) : Région Montagne

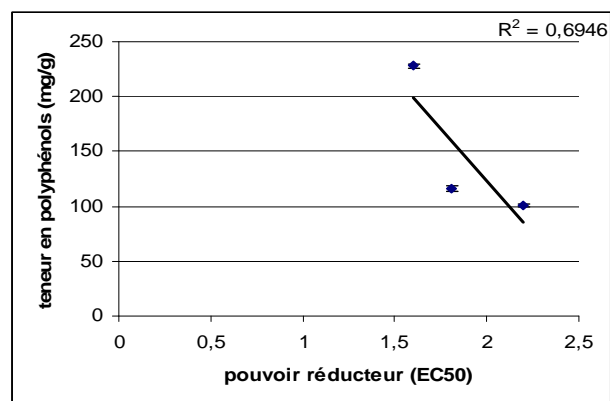


Fig. IN°-11-b) : Région Plaine

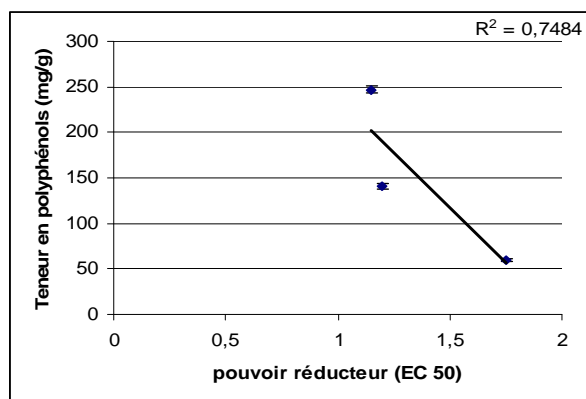


Fig. N° IV-11-c) : Région Montagne

Fig. N° IV-11 : Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir réducteur.

En analysant les coefficients de corrélation obtenus entre les teneurs en polyphénols et le pouvoir réducteur de chaque région, on constate que la corrélation est très bonne entre ces deux paramètres. La région Steppe présente un coefficient de corrélation linéaire un peu plus élevé ($R = 0,86$) par rapport aux deux autres régions ($R = 0,83$ et $R = 0,77$) respectivement pour la plaine et la région montagne.

D'après les résultats obtenus, on peut confirmer que le pouvoir réducteur est lié non seulement à la concentration en produits phénoliques mais aussi à la nature de ces derniers. Généralement l'augmentation du pouvoir réducteur est fortement influencée par la position des groupement hydroxyle (position *ortho* ou *para*) [112].

- **Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et le pouvoir anti-radicalaire**

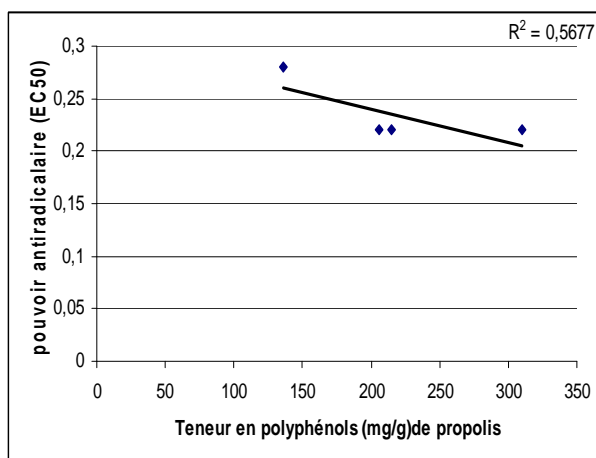


Fig. N° IV-12-a) : Région Montagne

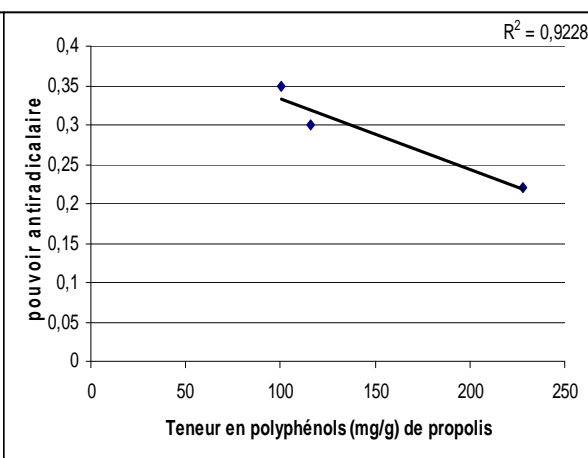


Fig. N° IV-12-c) : Région Plaine

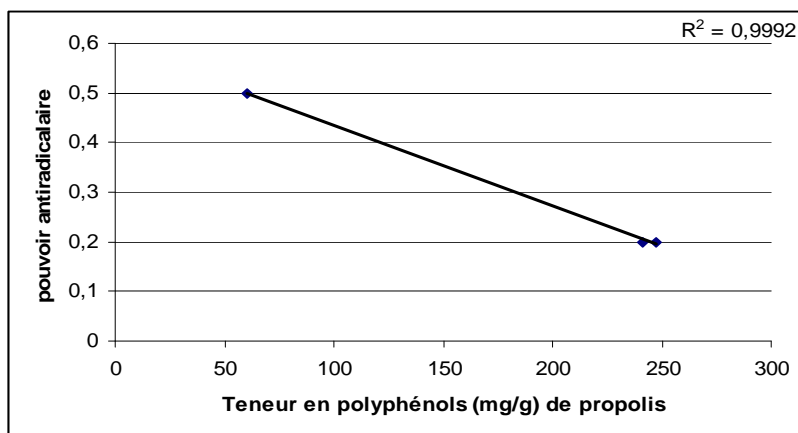


Fig. N° IV-12-b) : Steppe

Fig. N° IV-12 : Corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir anti-radicalaire.

Les résultats obtenus ont confirmé l'existence d'une bonne corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire et la teneur en polyphénols totaux. En effet le coefficient de corrélation linéaire le plus élevé a été relevé pour la région Steppe ($R = 0,99$) suivi par la Plaine avec un coefficient de corrélation de l'ordre de ($R = 0,97$) et enfin la région montagne ($R = 0,75$). Ces différences entre les trois régions reviennent à la qualité des composés phénolique présents, c'est-à-dire la nature de la flore botanique dans chaque région.

L'activité anti-radicalaire dépend de la nature des composés phénoliques disponibles, le pouvoir anti-radicalaire des acides est classé comme suit: Acide Rosmarinique >> Ester de l'Acide caféique > Acide caféique > acide férulique > BHT [113].

Une étude réalisée sur la propolis Brésilienne a rapporté des coefficients de corrélations linéaires entre les teneurs en polyphénols et le pouvoir de neutralisation du radicale libre DPPH moins important que ceux obtenus dans la présente étude, ces coefficients sont de l'ordre de $R = 0,5$; $R = 0,67$ et $R = 0,95$ [114].

IV.4.1.2. La teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis sont reporté dans le tableau N°IV 14.

Tableau N° IV-14: la teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis.

Echantillon		quantité de flavonoïdes en mg/g de propolis
Montagne	Yakouren (2006)	30,90 ± 0,20
	Yakouren (2007)	164,39 ± 2,18
	Yakouren (2008) « a »	83,45 ± 1,20
	Yakouren (2008) « b »	3,33 ± 0,1
	Dellys	48,79 ± 0,19
	Bouzgen	189,8 ± 1,28
	Ain El Hammam	193,75 ± 2,3
Plaine	Isser	15,24 ± 2,31
	Mitidja (2007)	103,48 ± 0,28
	Mitidja (2008)	13,33 ± 0,5
	Chaabet	20,84 ± 1,28
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	159,21 ± 1,34
	Sahara (abeille tellienne)	10,03 ± 1,03
	Laghout	120,35 ± 4,05

Les flavonoïdes sont une classe de composés ubiquitaires dans les plantes (ce qui prouve que la propolis est beaucoup plus d'origine végétal) et représentent un des plus grands groupes de produit naturels phénoliques [115]. Après l'ajout de la solution de chlorure d'Aluminium ($AlCl_3$), une couleur jaunâtre se forme. Cette coloration est due à la formation du complexe entre le chlorure d'Aluminium (Fig. N° IV-13) et les flavonoïdes ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons [84]. La formule du complexe entre le chlorure d'Aluminium et un composé phénolique O-hydroxycarbonylé est présentée comme suite :

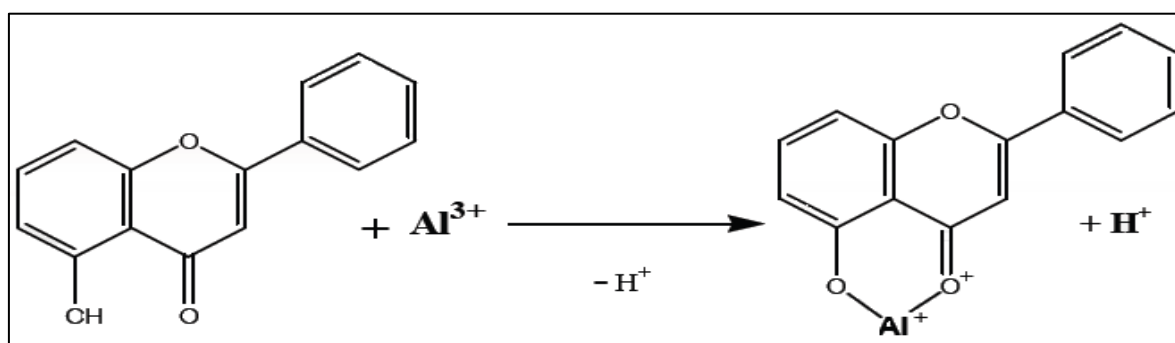


Fig. N° IV-13 : Réaction du Chlorure d'aluminium et les Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques de propolis est exprimée en mg d'équivalent de Quercétine par g de propolis brut (mg EQ/g de propolis), représentés dans le tableau N° IV-14.

Les quantités les plus élevées en flavonoïdes sont repérées chez les échantillons de Ain El Hammame (193,75 mg EQ/g de propolis) suivi de celle de Bouzgen (189,8 mg EQ / g de propolis). Les teneurs les plus faibles sont celles de Yakouren 2008 « b » (3,33 mg EQ/g de propolis), Mitidja 2008 (13,33 mg EQ/g de propolis brute) et la propolis Saharienne dégradée (10,03 mg EQ / g de propolis brute).les autres échantillons ont présentés des valeurs moyennes allant de 13 à 164,39 mg EQ / g de propolis. Ces résultats sont différents d'un échantillon à un autre de la même région, ce qui signifie que la détermination de la teneur en flavonoïdes peut être utilisée comme un indice de provenance de la propolis.

En comparant les résultats des trois régions, avec l'élimination des échantillons dégradés. On peut déduire que les deux régions montagne et steppe présentent des valeurs importantes en flavonoïdes 118,51 et 139,78 mg EQ/g de propolis respectivement, par contre la région plaine présente une valeur faible. Résultats similaires a ceux trouvés pour les polyphénols. **Fig. N° IV-14.**

On analysant les écarts type de chaque région (Fig. N° IV-14) on remarque la non homogénéité des échantillons.

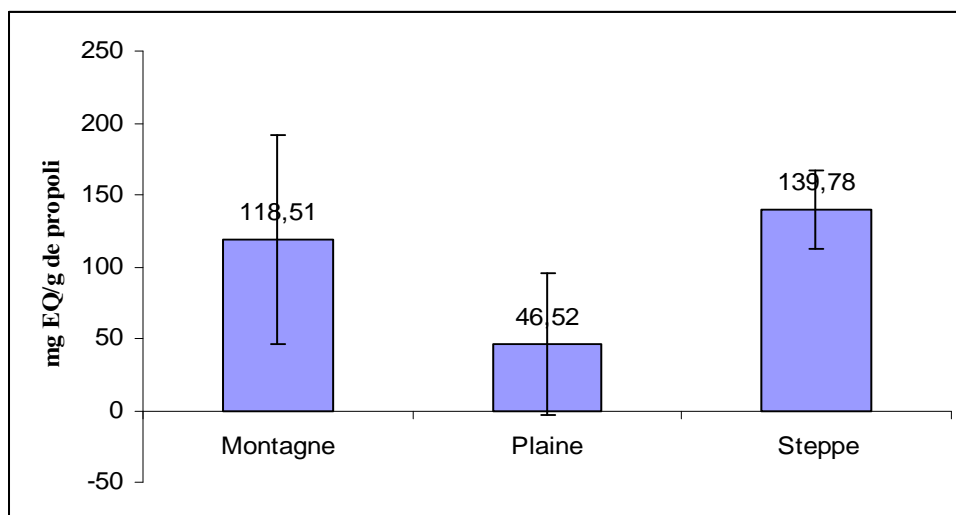


Fig. N° IV-14 : Comparaison de la teneur en flavonoïdes entre les trois groupes.

La teneur en flavonoïdes totale décelée chez la propolis Iranienne, est de 77,9 (Ecart type : 0,39), 31,1 (Ecart type : 0,08) et 12,2 (Ecart type : 0,33) mg EQ / mg de propolis respectivement pour les échantillons de Tahrán, Isfahan et Khorsan. Ces résultats sont proches des résultats obtenus dans notre étude [13].

Le travail réalisé sur l'échantillon provenant du Brésil indique une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 43 (Ecart type : 0,1) mg EQ / g de propolis brut [15].

La teneur en flavonoïdes totale de la propolis de Chine varie de 8,3 (Ecart type : 3,7) à 188 (Ecart type : 6,6) mg EQ / g de propolis brute [111].

L'étude réalisée par [11], confirme que la teneur en flavonoïdes dépend de la région botanique (**tableau N° IV-15**), dévoilant ainsi que la quantification des flavonoïdes peut être très utile pour différencier entre les échantillons de propolis. Résultats approuvés lors d'une autre étude réalisée sur la propolis de la Kerrie, qui montre une teneur en flavonoïdes totale allant de 16 – 136 mg EQ / g de propolis [112].

Tableau N° IV-15: Influence de la région sur la teneur en flavonoïdes de la propolis d'abeille [11].

Provenance	Flavonoïdes (mg EQ /g propolis)	Provenance	flavonoïdes (mg EQ /g propolis)
Argentine	130 (Ecart type : 5,5)	New Zealand	152 (Ecart type : 12,6)
Australie	145 (Ecart type : 6,5)	Sud d'Afrique	50,8 (Ecart type : 0,8)
Brésil	51,9 (Ecart type : 2,4)	Thailand	2,5 (Ecart type : 0,8)
Bulgarie	157 (Ecart type : 8,9)	Ukraine	63,7 (Ecart type : 3,2)
Chilie	116 (Ecart type : 9,3)	Uruguay	168 (Ecart type : 6,4)
Chine	147 (Ecart type : 9,3)	U S A	122 (Ecart type : 6,2)
Hongrie	176 (Ecart type : 1,7)	Uzbekistan	94,2 (Ecart type : 6,8)

- **Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux**

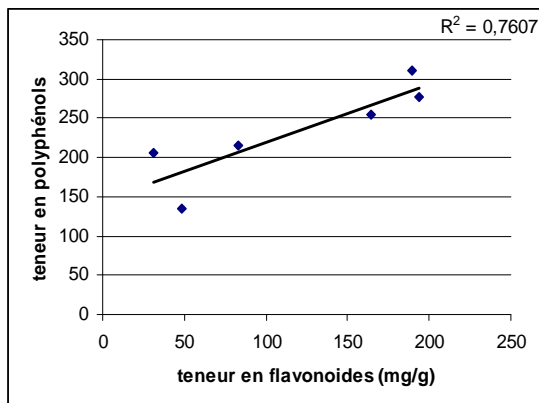


Fig. N° IV-15-a) : Région Montagneuse

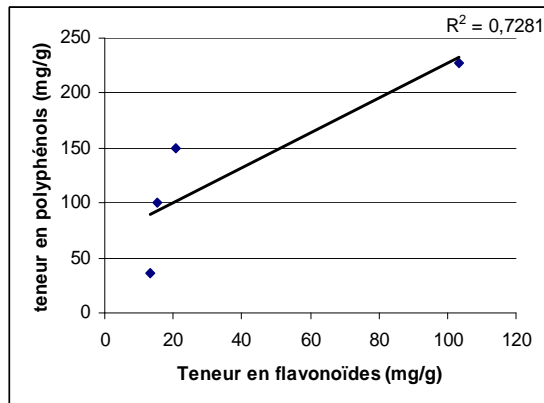


Fig. N° IV-15-b) : Région plaine

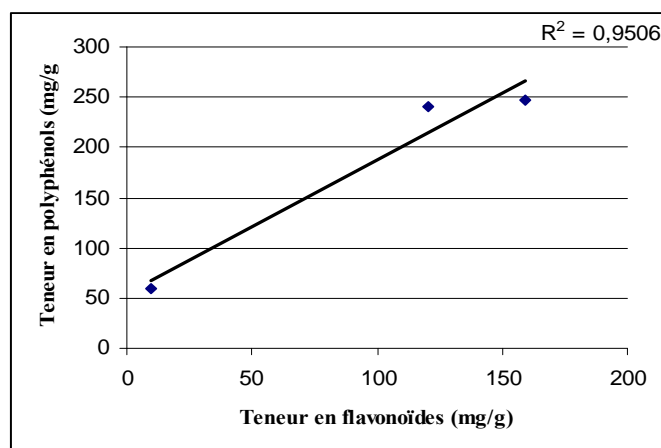


Fig. IN°IV-15-c) : Steppe

Fig. IN°IV-15. Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et les polyphénols totaux.

On remarque que les échantillons de propolis du groupe « steppe » ont montré un coefficient de corrélation linéaire de l'ordre de 0,95. Un résultat plus élevé que les deux autres groupes qui ont présenté des coefficients de corrélations de 0,72 et 0,76 respectivement pour le groupe de la plaine et montagne.

Des résultats inférieurs ont été constatés avec la propolis Brésilienne ($r = 0,51$). En effet en mesurant la corrélation entre le contenu en polyphénols et les flavonoïdes, des auteurs ont obtenus un coefficient de corrélation linéaire très faible ($r = 0,45$). Résultat inférieur à celui trouvé dans la présente étude [114].

- **Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et les activités antioxydantes de la propolis**

L'analyse de la relation entre l'activité antioxydante et la teneur totale en flavonoïdes contenue dans un extrait éthanolique de la propolis présente des coefficients de corrélation linéaire moyennement positifs. Tableau N° IV-16.

Tableau N° IV-16: Corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante.

Corrélation	Région	Coefficient de détermination (r^2)	Coefficient de corrélation (r)
Pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes	Montagne	0,22	0,47
	Plaine	0,64	0,80
	Steppe	0,97	0,98
Pouvoir anti-radicalaire et la teneur en flavonoïdes	Montagne	0,14	0,37
	Plaine	0,89	0,94
	Steppe	0,94	0,97

D'après les résultats illustrés dans le tableau N° 15, on constate que les deux groupes plaines et steppe ont montré une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes ($r = 0,80$ et $0,98$) respectivement. Ainsi que pour la corrélation entre le pouvoir anti-radicalaire et la teneur en flavonoïdes ($r = 0,94$ et $0,97$).

Le groupe montagneux présente un coefficient de corrélation linéaire faible ($r = 0,47$ et $0,37$) respectivement pour (pouvoir réducteur / teneur en flavonoïdes) et (le pouvoir anti-radicalaire / la teneur en flavonoïdes).

Une étude réalisée sur la propolis Brésilienne indique que les coefficients de corrélation linéaire entre la concentration en flavonoïdes et le pouvoir anti-radicalaire sont de l'ordre de 0,85 ; 0,90 et 0,63 [114].

IV.4.2. Dosage de la vitamine C

À notre connaissance, La teneur en acide ascorbique (vitamine C) de la propolis brute, n'a pas été étudiée préalablement, alors que c'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E [115]. La littérature rapporte que la vitamine C est principalement présente dans les végétaux, ce qui conforte la théorie de l'origine de la propolis.

Les résultats du calcul de la concentration et de l'écart type correspondant sont exprimés en ($* 10^{-3}$ mg/g) de propolis brute.

Tableau N° IV-17 : Teneur de l'acide ascorbique des différents échantillons de propolis.

Echantillon		Vitamine C (* 10 ⁻³ mg/g) de propolis
Montagne	Yakouren (2006)	0,38 ± 5,21 e ⁻⁰⁵
	Yakouren (2007)	0,56 ± 7,98 e ⁻⁰⁵
	Yakouren (2008) « a »	0,44 ± 2,09 e ⁻⁰⁵
	Yakouren (2008) « b »	0,39 ± 6,28 e ⁻⁰⁵
	Dellys	0,55 ± 7,28 e ⁻⁰⁵
	Bouzgen	0,57 ± 9,67 e ⁻⁰⁵
	Ain El hammam	0,27 ± 7,38 e ⁻⁰⁵
Plaine	Isser	0,64 ± 4,13 e ⁻⁰⁵
	Mitidja (2007)	0,45 ± 5,26 e ⁻⁰⁵
	Mitidja (2008)	0,62 ± 5,10 e ⁻⁰⁵
	Chaabet	0,45 ± 4,00 e ⁻⁰⁵
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	0,54 ± 6,58 e ⁻⁰⁵
	Sahara (abeille Tellienne)	0,31 ± 4,43 e ⁻⁰⁵
	Laghouat	0,12 ± 7,87 e ⁻⁰⁵

Les résultats obtenus varient entre 0,64 (Ecart type : 4,13E-05) mg/g de propolis brut, la teneur la plus élevée et elle a été enregistrée par l'échantillon provenant des ISSER. L'échantillon de Laghouat présente la valeur la plus faible 0,12* 10⁻³ (Ecart type : 7,87E-05).

En comparant la moyenne des trois régions, on peut en déduire que les deux régions plaine et Montagne présentent des valeurs importantes de vitamine C estimées à 0,54* 10⁻³ mg/g et 0,48* 10⁻³ mg/g de propolis brut respectivement, mais les échantillons de la région steppe présentent la moyenne la plus faible 0,32* 10⁻³ mg/g, en plus la non homogénéité la plus importante (α : 0,66). **Fig. N° IV-24.**

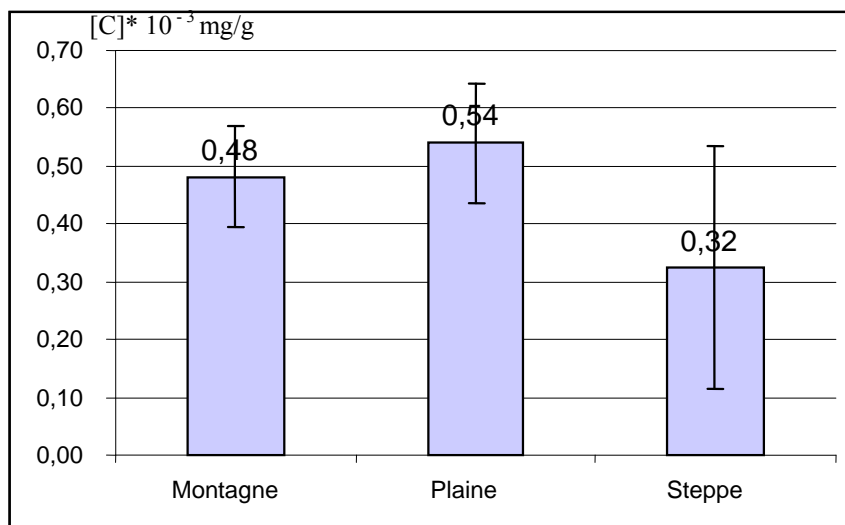


Fig. N° IV-16 : Comparaison de la teneur en acide ascorbique entre les trois groupes (Montagne, plaine et la Steppe).

- **Corrélation entre le teneur en acide ascorbique et les activités anti-oxydantes de la propolis**

Tableau N° IV-18: Corrélation entre la teneur en acide ascorbique et l'activité antioxydante.

Corrélation	Région	Coefficient de détermination (r^2)	Coefficient de corrélation (r)
Pouvoir réducteur et la teneur en acide ascorbique	Montagne	0,38	0,61
	Plaine	0,88	0,94
	Steppe	0,02	0,13
Pouvoir anti-radicalaire et la teneur en acide ascorbique	Montagne	0,23	0,48
	Plaine	0,63	0,75
	Steppe	0,003	0,05

En analysant la relation entre la teneur en acide ascorbique et l'activité antioxydante des différents groupes de propolis Algérienne, on constate que les deux groupes montagne et plaine présentent des coefficients de corrélation linéaire positifs. Par contre le groupe steppe présente des coefficients de corrélations linéaire négatives de l'ordre ($r = 0,05$) pour la corrélation entre la teneur en acide ascorbique et l'activité anti-radicalaire, ($r = 0,13$) pour la corrélation entre la teneur en acides ascorbique et l'activité réductrice.

IV.4.3. Détermination de la teneur en sucres

Les teneurs en sucres totaux et réducteurs dans les extraits de propolis sont exprimées en g équivalent de glucose par 100 g de propolis brut qui sont présentés dans le tableau N°IV-19.

Tableau N° IV-19 : Teneur en sucres totaux et réducteurs des différents échantillons de propolis.

Provenance		les sucres réducteurs (g Glucose /100g propolis)	Les sucres totaux (g Glucose /100g propolis)
Montagne	Yakouren (2006)	1,75 ± 0,04	2,72 ± 0,02
	Yakouren (2007)	2,06 ± 0,01	2,35 ± 0,04
	Yakouren (2008) « a »	1,72 ± 0,01	3,09 ± 0,01
	Yakouren (2008) « b »	1,09 ± 0,04	2,65 ± 0,06
	Dellys	0,98 ± 0,05	0,49 ± 0,02
	Bouzgen	0,59 ± 0,03	1,03 ± 0,05
	Ain El hammame	0,58 ± 0,02	0,66 ± 0,02
Plaine	Isser	0,31 ± 0,02	0,98 ± 0,01
	Mitidja (2007)	2,37 ± 0,04	2,41 ± 0,03
	Mitidja (2008)	0,06 ± 0,01	0,68 ± 0,02
	Chaabet (2009)	0,61 ± 0,02	0,56 ± 0,01
Steppe	Sahara (abeille tillienne)	0,30 ± 0,01	3,46 ± 0,01
	Sahara (abeille saharienne)	0,78 ± 0,01	2,57 ± 0,02
	Lahgouat (2009)	0,32 ± 0,06	0,47 ± 0,01

- **Les sucres réducteurs** : La quantité la plus élevée en sucre réducteur est repérée chez l'échantillon de Mitidja 2007 (2,37 ± 0,01). Par contre la teneur la plus faible est celle de l'échantillon de Mitidja 2008 (0,06 ± 0,01) ce qui peut s'expliquer par la dégradation des sucres réducteurs au cours du conditionnement.

Les teneurs moyennes en sucres totaux entre les trois régions sont illustrées dans le tableau N° IV-20. (Les valeurs des échantillons dégradés sont exclues).

Tableau N° IV-20 : Comparaison de la teneur moyenne (g Glucose /100g propolis) en sucres réducteurs entre les trois groupes.

	Groupe montagne n = 7	Groupe plaine n = 4	Groupe steppe n = 3	Tous les échantillons n = 14
Min	0,58	0,31	0,30	0,06
Max	2,06	2,37	0,78	2,37
Moy	1,28	1,09	0,55	1,15
Ecart type	0,64	1,11	0,32	0,76
α (SD/moyenne)	0,50	1,01	0,59	0,65

D'après le tableau N° IV-20, on remarque que le groupe Montagne présente la moyenne de sucres réducteurs la plus élevée (**1,28 g E G / 100 g de propolis brut**) et le coefficient d'homogénéité le plus faible (**$\alpha = 0,50$**).

- **Les sucres totaux :** La quantité la plus élevée en sucres totaux est donnée par l'échantillon Saharienne (abeille noire) $3,46 \pm 0,01$ g E G /100 g de propolis brut, et la quantité la plus faible est observée avec l'échantillon de Laghouat ($0,47 \pm 0,01$) g E G /100 g de propolis brute.

Tableau N° IV-21 : Comparaison du la teneur (g Glucose /100g propolis) en sucres totaux entre les trois groupes.

	Groupe montagne n =7	Groupe plaine n =4	Groupe steppe n =3	Tous les échantillons n= 14
Min	0,49	0,56	0,47	0,47
Max	2,75	2,41	2,57	2,75
Moy	1,72	0,77	1,52	1,49
Ecart type	1,13	0,29	1,48	1,05
α (SD/moyenne)	0,65	0,38	0,97	0,70

En comparant la moyenne des trois régions et on éliminant les échantillons mal conditionnés, on peut en déduire que le groupe Montagne présente la valeur la plus élevée (**1,72 g E G /100 g de propolis brut**), résultats semblable à celui obtenu en analysant la teneur en sucres réducteurs. Concernant l'homogénéité, c'est le groupe plaine qui présente le coefficient le plus faible (**$\alpha = 0,38$**).

La teneur en sucres totaux relevée pour la propolis de diverses provenances est les suivant : Kenya (2,84 %), Bulgarie (0,47 %), Tanzanie (0,19 %), Zambie (0,32 %) et l'Inde (0,5 %) [117].

IV.4.4. Teneur en protéine soluble

Les résultats de dosage des protéines solubles des échantillons de propolis analysées sont présentés dans le **tableau N° IV-22**, ils varient entre $7,23 \times 10^{-5} \%$ à $2,83 \times 10^{-4} \%$. Les valeurs obtenues ne sont pas significatives (traces). Ces dernières sont du à la présence de pollen dans la propolis [6].

Tableau N° V-22 : Teneur en protéines solubles des différents échantillons de propolis.

Echantillon		Protéine soluble (g/100gde propolis)
Montagne	Yakouren (2007)	$7,63 \times 10^{-5}$ (Ecart type : $3,66 \times 10^{-5}$)
	Yakouren (2008) « a »	$1,64 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $3,66 \times 10^{-5}$)
	Dellys	$7,23 \times 10^{-5}$ (Ecart type : $1,39 \times 10^{-5}$)
	Bouzgen	$2,32 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $2,69 \times 10^{-5}$)
	Ain El Hammam	$2,83 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $4,25 \times 10^{-5}$)
Plaine	Isser	$1,37 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $1,36 \times 10^{-5}$)
	Mitidja (2007)	$2,16 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $3,13 \times 10^{-6}$)
Steppe	Sahara (abeille saharienne)	$1,95 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $2,42 \times 10^{-5}$)
	Laghout	$1,99 \times 10^{-4}$ (Ecart type : $1,96 \times 10^{-5}$)

À notre connaissance, la teneur en protéines soluble de la propolis brute, n'a pas été étudiée

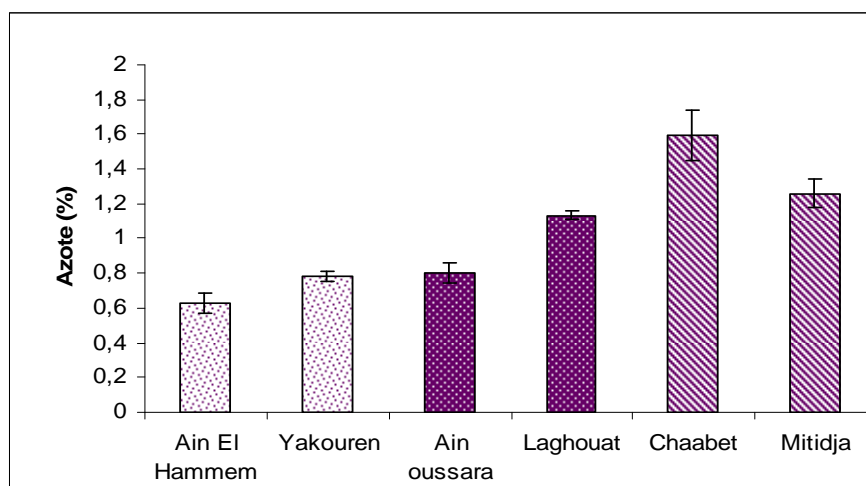
Le tableau tableau N° IV-23 montre la comparaison entre le pourcentage en protéines par région.

Tableau N° IV-23 : comparaison de la teneur en protéines (g/100gde propolis) entre les trois groupes.

	Groupe montagne n =5	Groupe plaine n =2	Groupe steppe n =2	Tous les échantillons n= 14
Min	7,23 e ⁻⁰⁵	1,37 e ⁻⁰⁴	1,95 e ⁻⁰⁴	7,23 e ⁻⁰⁵
Max	2,83 e ⁻⁰⁴	2,16 e ⁻⁰⁴	1,99 e ⁻⁰⁴	2,83 e ⁻⁰⁴
Moy	1,65 e⁻⁰⁴	1,76 e⁻⁰⁴	1,97 e⁻⁰⁴	1,75 e⁻⁰⁴
Ecart type	0,93 e⁻⁰⁴	0,56 e⁻⁰⁴	0,03 e⁻⁰⁴	0,70 e⁻⁰⁴
α (SD/moyenne)	0,56	0,32	0,01	0,40

On peut en déduire que la région steppe montre la valeur la plus élevée 1,97 e⁻⁰⁴ (Ecart type : 0,03 e⁻⁰⁴), avec un coefficient d'homogénéités le plus faible ($\alpha = 0,01$). Les deux autres régions ont été moins homogènes $\alpha = 0,32$ et 0,56 respectivement pour la région plaine et la steppe.

IV.4.4. Taux de l'azote total

**Fig. IV-17** : Taux de l'azote total.

Les différents échantillons de propolis analysées ont montré un taux de l'azote total entre 0,63 et 1,59 %. Les valeurs de l'azote total englobe l'azote non protéiques et l'azoté protéique, donc on peut en déduire que la propolis est pauvre en protéines, résultat prémuni dans l'analyse des protéines solubles.

En comparant la moyenne entre les trois régions. On peut en déduire que la région plaine montre la valeur la plus élevée (1,42 %), la steppe (0,97 %) et la montagnaise (0,70 %).

IV.5. Extraction des composés de la propolis

IV.5.1. Etude de taux d'extraction par des différents solvants

IV.5.1.1. L'extraction à froid

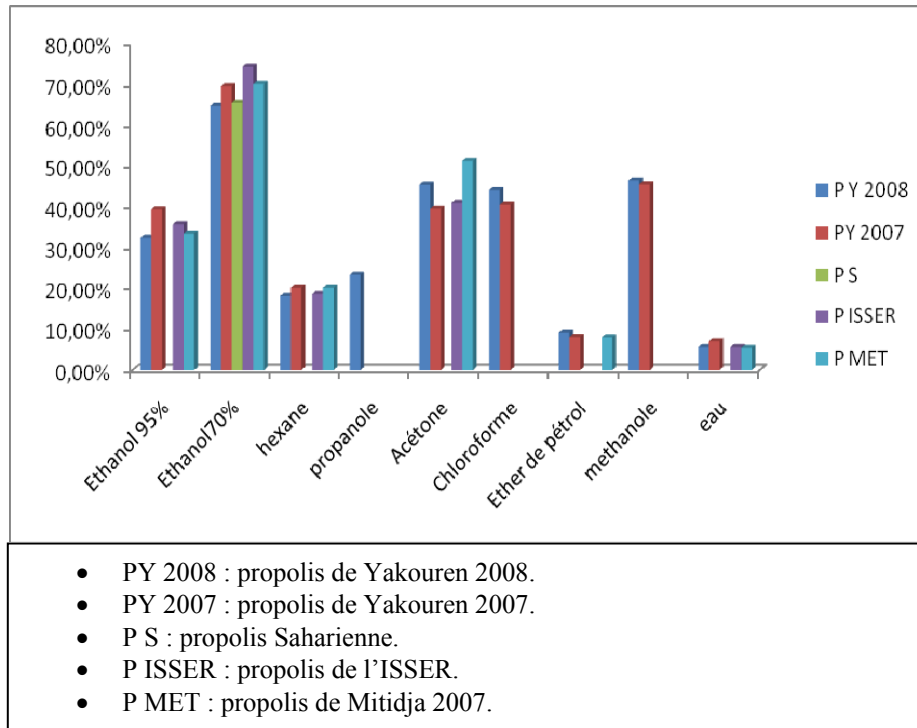


Fig. N° IV-18: le taux d'extraction à froid avec des différents solvants.

IV.5.1.2. L'extraction à chaud

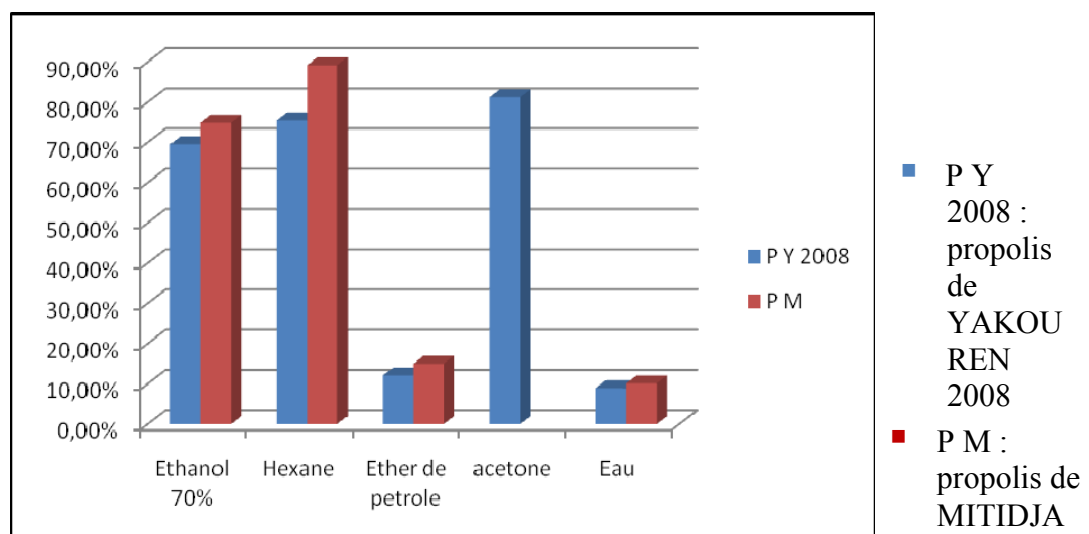


Fig. N° IV-19 : le taux d'extraction a chaud.

L'extraction n'est qu'une étape de transformation de la matière première (dans notre cas c'est la propolis) en un extrait. Toutes les étapes qui précèdent ou suivent l'extraction doivent être maîtrisées avec précision pour un produit final de qualité optimale. Dans cet optique, le découpage de la propolis a été réalisé de façon à pouvoir récupérer des morceaux très fins dans le but d'optimiser l'extraction [118].

L'extrait récupéré par les différents solvants a été pesé pour déterminer le poids sec résultant après évaporation à sec sous pression réduite. Ces extraits renferment tous les composés qui peuvent être extraits par les différents solvants (selon l'affinité du solvant d'extraction avec les composés extraits), ces composés peuvent être des flavonoïdes, des composés phénoliques ou bien des lipides, etc. le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de propolis brute. Rendue en petit morceaux, subissant une extraction soit à température ambiante pendant une semaine (macération), soit à chaud pendant 6 à 8 heures (par Soxhlet). Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p / p).

Le rendement d'extraction varie de 5,4 à 74,30 % pour l'extraction à froid et de 8,9 à 89,2 % pour l'extraction à chaud. Cette variation dépend du type de solvant ainsi que la provenance de la propolis, ce qui prouve la complexité de la composition de la propolis.

Pour l'extraction à froid, le rendement est plus important avec les solvants polaires, ce qui explique la richesse de la propolis en composés polaires. Le rendement peut être augmenté en utilisant un mélange de solvants, c'est le cas de l'éthanol /eau à 70 % car le taux d'extraction est de l'ordre de 64,8 à 74,30 %.

Les solvants polaires purs ont donné des taux d'extraction allant de 32,42 à 39,36 pour l'éthanol ; 45,40 à 46,33% pour le méthanol ; 39,5 à 51,10% pour l'acétone et environ 23,45 pour le propanol.

Pour les solvants apolaires, les rendements sont très faibles, ils varient de 5,4 à 7 ; de 7,9 à 9,09 et de 18 à 18,5 respectivement pour l'eau, l'éther de pétrole et l'Hexane.

Dans le cas de l'extraction à chaud, le rendement s'est amélioré, surtout dans le cas de l'hexane et de l'acétone. Cela est dû à la rupture des liaisons sous l'effet de la chaleur, c'est-à-dire que notre matière est pratiquement altérée. Dans le cas de l'eau on remarque une légère amélioration de l'ordre de 4 %.

Une étude sur l'extraction avec l'eau a indiqué des rendements de l'ordre 7,7%, 3,2% et 9,6 % respectivement pour la propolis de Chine, du Pérou et du Brésil [119]; un taux d'extraction de 14,3 % à 46,2 % et de 26,6 % à 75,8 % respectivement pour l'hexane et l'éthanol 70% [2]; une autre étude a rapporté des taux d'extraction par l'éthanol et l'eau respectivement de 35 % et 7%, [5].

Les résultats relevés sur la propolis Brésilienne confirment que le taux d'extraction change d'un échantillon à un autre de la même région, ont été obtenus des taux d'extraction allant de 40,7% à 73,9 % avec l'éthanol (70%) [120].

Touts ces résultats abondent dans le même sens que ceux trouvés par notre étude aussi bien pour les rendements d'extraction que pour le choix des solvants les plus performants, qui sont ici l'Ethanol (70%) et le Méthanol.

IV.5. 2. L'influence du temps de contact sur le taux d'extraction

Les résultats de l'étude de l'influence du temps sur le taux d'extraction des composés des différents échantillons de la propolis sont présentés dans la **figure N° IV-20**. On constate que le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation du temps de contact, c'est-à-dire le temps de séjour de la propolis dans notre solvant d'extraction (dans notre cas c'est l'Ethanol à 70%).

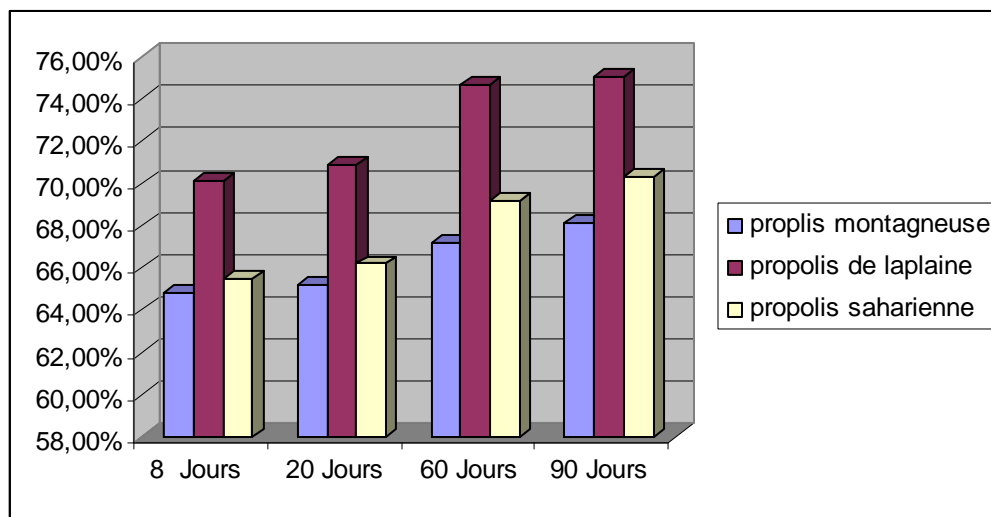


Fig. N° IV-20 : Influence du temps sur le taux d'extraction.

Le taux d'extraction varie d'un échantillon à un autre selon la région de provenance, on constate une augmentation de 64,8 à 68,1% ; de 70,1 à 75,2% et de 65,5 à 70,3% respectivement pour la propolis de montagne, de plaine et de steppe (le temps varie de 8 jours à 90 jours).

C'est-à-dire qu'en 82 jours il y a eu gain de 3,3 %, de 4,1% et de 4,8% ce qui est très faible pour prolonger inutilement l'extraction.

La représentation de l'évolution du taux d'extraction à travers le temps rend plus lisible cette conclusion.

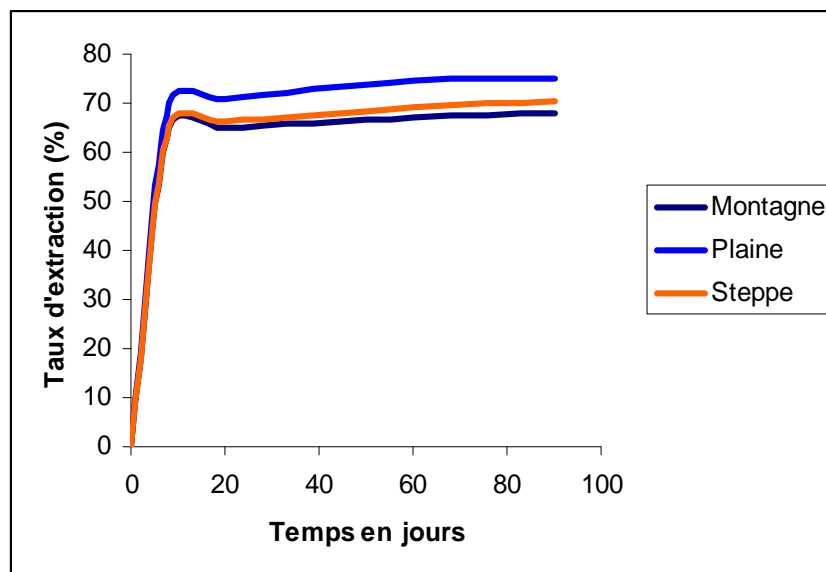


Fig. N° IV-21. Evolution du rendement d'extraction à travers le temps.

Le taux d'extraction obtenue sur la propolis brésilienne croît avec l'augmentation du temps de macération, mais la composition qualitative reste la même [120].

IV.5. 3. Optimisation de l'extraction des principes actifs de la propolis par combinaison de mélange de solvants :

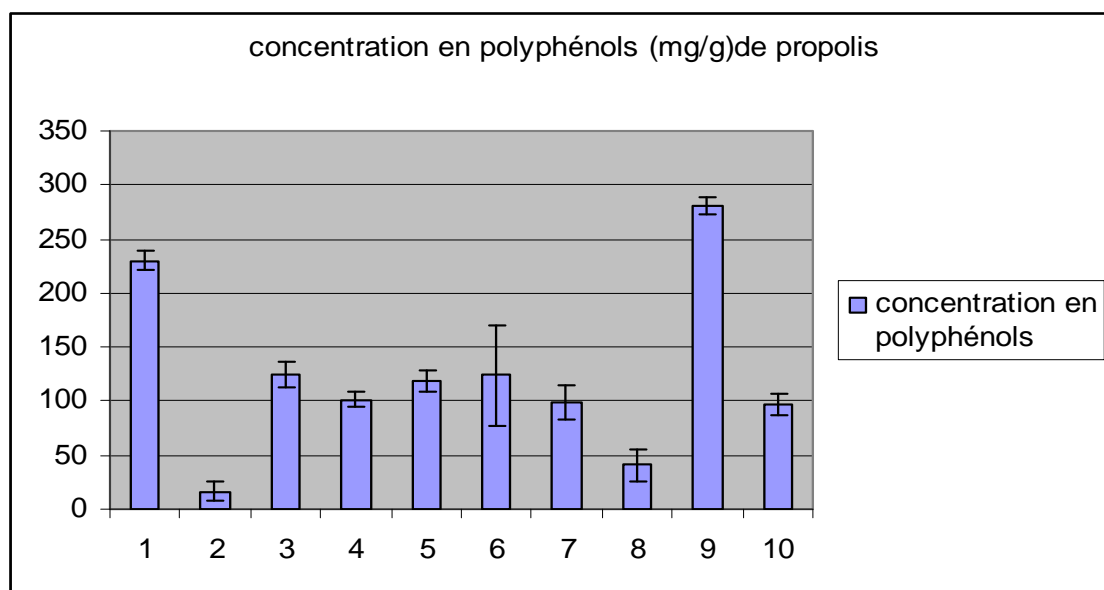
Dans cette partie ; il s'agit de déterminer la quantité des polyphénols existant dans la propolis. Dans le but d'optimiser le rendement d'extraction des polyphénols, nous avons employé différents types de mélanges de solvants à partir de l'éthanol, l'hexane et de l'acétone.

Les concentrations obtenues en polyphénols dans l'extrait de propolis en fonction de différents mixtes de solvants utilisés, sont reportées dans le **tableau N° IV-24**. Elles ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau N° IV-24: Concentrations en polyphénols dans les extraits de propolis en fonction de la composition des mixtes de solvants utilisés.

mixtures	Ethanol %	Hexane %	Acétone %	mg/g de propolis
1	100	0	0	229,94
2	0	100	0	16,61
3	0	0	100	125,37
4	17	17	66	101,01
5	33	33	33	118,72
6	50	0	50	124,14
7	50	50	0	98,67
8	0	50	50	40,72
9	66	17	17	280,80
10	17	66	17	97,02

Le rendement d'extraction est conditionné par la matrice du solvant.

**Fig. N° IV-22:** Concentration en polyphénols en fonction des différentes mixtes de solvant.

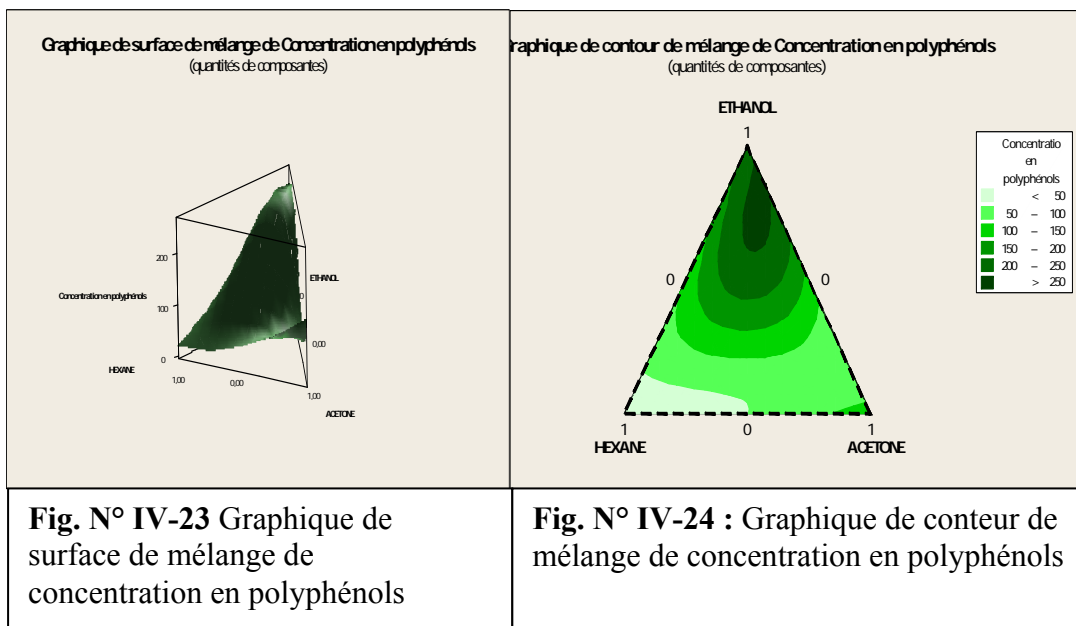
A la lumière de ces résultats (**tableau N° IV-24** et **fig. IV-30**), il ressort que l'extraction des polyphénols en présence de la mixture N° 9 (66% d'éthanol, 17% d'hexane et 17% d'acétone) donne la concentration des polyphénols la plus élevée (estimée à 280,80 mg/g de propolis), suivi de celle de la mixture N°1. Par contre, l'extraction en présence de la mixture N° 2 (100% d'hexane) donne la concentration en polyphénols la plus faible soit 16,61mg/g. l'hexane étant un solvant apolaire d'où le faible rendement d'extraction.

Les mixtures 3, 5, 6, 7 donnent des bons résultats d'extractions en raison de la proportion élevée de l'Ethanol dans les mixtures. Il apparaît ainsi que le pourcentage de l'éthanol influe notablement sur le rendement de l'extraction.

a. Estimation statistique du modèle mathématique

L'optimisation des réponses s'avère souvent utile dans le développement de produits, lorsque nous devons par exemple déterminer les conditions de fabrication qui donneront un produit ayant les propriétés souhaitées. Dans notre cas, c'est la détermination des proportions des solvants utilisés qui optimisent l'extraction des principes actifs de la propolis (polyphénols).

Les figures N° IV- 24 et 25 montrent la surface de variation des concentrations des polyphénols selon le plan de mélange.



Pour optimiser l'extraction on doit établir un modèle mathématique qui est un polynôme de la forme suivante :

$$Y = B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + B_{12} X_1 X_2 + B_{13} X_1 X_3 + B_{23} X_2 X_3 + B_{123} X_1 X_2 X_3$$

Formation de la matrice de Cheffé

Tableau N° IV-25 : la matrice de Scheffé.

	Ethanol %	Hexane %	Acétone %	Y1	Y2	Y moyen	Ecart type	Dispersion σ^2
1	1	0	0	236,47	236,47	229,94	9,22	229,95
2	0	1	0	10,09	23,13	16,61	9,22	85,04
3	0	0	1	133,86	116,88	125,37	12,01	144,13
4	1/6	1/6	2/3	96,21	105,81	101,01	6,78	46,04
5	1/3	1/3	1/3	125,25	112,20	118,72	9,22	85,04
6	1/2	0	1/2	157,23	91,04	124,14	46,80	2190,62
7	1/2	1/2	0	87,84	109,50	98,67	15,31	234,44
8	0	1/2	1/2	30,76	50,69	40,72	14,09	198,62
9	2/3	1/6	1/6	285,92	275,68	280,80	7,24	52,46
10	1/6	2/3	1/6	89,96	104,08	97,02	9,99	99,81

Selon les données consignées dans le tableau N° IV-25, on détermine les coefficients des équations de régression, la dispersion de reproduction et l'adéquation du modèle.

Selon le critère de Coochrène on vérifie l'homogénéité des dispersions des 10 essais:

$$C_e = \sigma^2 \max (y) / \sum \sigma^2 (y) = 0.68$$

D'après la table de Coochrène ($\alpha = 0,05$; $N = 10$; $m = 2$): $C_t = 0,801$

N = le nombre des essais

m = le nombre des répétitions.

Comme C_e est inférieur à C_t les dispersions sont homogènes et la dispersion de reproduction est positive.

Pour le modèle (le taux d'extraction des polyphénols – la composition du mélange) on a pris le polynôme de la troisième puissance complet.

On mettant les valeurs moyennes du tableau N° IV-25 dans les formules qui déterminent les coefficients du polynôme on obtient les résultats illustrée dans le tableau N IV-26.

Les formules de détermination des coefficients du polynôme sont :

- $B_1 = Y_1$
- $B_{12} = 4 Y_{12} - 2 (Y_1 + Y_2)$
- $B_{123} = 27 Y_{123} - 12 (Y_{12} + Y_{13} + Y_{23}) + 3 (Y_1 + Y_2 + Y_3)$

Tableau N° IV-26 : les coefficients du modèle mathématique.

Paramètre	Valeur	Tc	Paramètre	Tc	Valeur
B₁	229,94	57.3	B₁₂	24,53	- 98,44
B₂	16,61	4.14	B₁₃	53.35	- 214,08
B₃	125,369094	31.24	B₂₃	30.31	- 121,64
B₁₂₃	1159.64	288.97			

En utilisant la table de la loi de Student ($\alpha=0.05$, $N=10$) on a **Tt = 2,228**

D'après les résultats illustrés : $Tc > Tt$ donc tous les coefficients sont significatifs et l'équation prend la forme suivante :

$$Y = 229.95 X_1 + 16.61 X_2 + 125.37 X_3 - 98.44 X_1 X_2 - 214.08 X_1 X_3 - 121.64 X_2 X_3 + 1159.64 X_1 X_2 X_3$$

Test sur la validation du modèle

Vérification de l'adéquation du modèle mathématique : il s'agit de contrôler si le modèle estimé explique correctement les variations de la réponse observée [121].

Il peut se baser sur le critère de Fisher.

Les valeurs calculées **Yc** sont illustrées dans le *tableau N° IV-27*:

Tableau N° IV-27: les réponses calculées à partir du modèle.

Les mixtures	Les réponses calculées (Yc)
Mixture 1	229,95
Mixture 2	16,61
Mixture 3	125,37
Mixture 4	106,11
Mixture 5	118,69
Mixture 6	124,13
Mixture 7	98,66
Mixture 8	40,57
Mixture 9	160,35
Mixture 10	61,35

Le teste de Fischer-Snedecor

La valeur calculée du critère de Fischer est donnée par la formule suivante :

$$F_c = \frac{\sigma_2^2\{Y\}}{\sigma_1^2\{Y\}}$$

$$\sigma_2^2\{Y\} = \frac{m \times \sum_{i=1}^N (\bar{Y}_i - Y_{ic})^2}{N - Z_s}$$

$F_c > 1$, pour les valeurs de F comprises entre 0 et 1, on a :

$$F_{1-p}(v_1, v_2) = \frac{1}{F_p(v_2, v_1)}$$

$\sigma_1^2\{Y\}$: La moyenne des variances de la série ;

$\sigma_2^2\{Y\}$: La variance d'adéquation ;

\bar{Y}_i : Valeur moyenne du paramètre d'optimisation dans la $i^{\text{ème}}$ expérience ;

Y_{ic} : Valeur du paramètre d'optimisation dans la $i^{\text{ème}}$ expérience, calculée d'après le modèle mathématique obtenu ;

m : Le nombre de répétitions ;

N : Le nombre d'expériences ;

Z_s : Le nombre de coefficients significatifs dans le modèle mathématique.

Si $F_c < F_t(\alpha=0,05, \nu_1, \nu_2)$, le modèle obtenu est adéquat ;

Si $F_c > F_t(\alpha=0,05, \nu_1, \nu_2)$, le modèle n'est pas adéquat , il faut passer à la recherche d'un modèle plus complexe.

Après les calculs on a :

$$F_c = 3,13$$

D'après la table de Fischer on a :

$$F_t : (\nu_1 = N - Z_s = 3, \nu_2 = N (m-1) = 10) = 3,71$$

$F_c < F_t$ donc notre modèle est adéquat.

La figure qui suit présente la corrélation entre les valeurs prédites par le modèle et des valeurs mesurées.

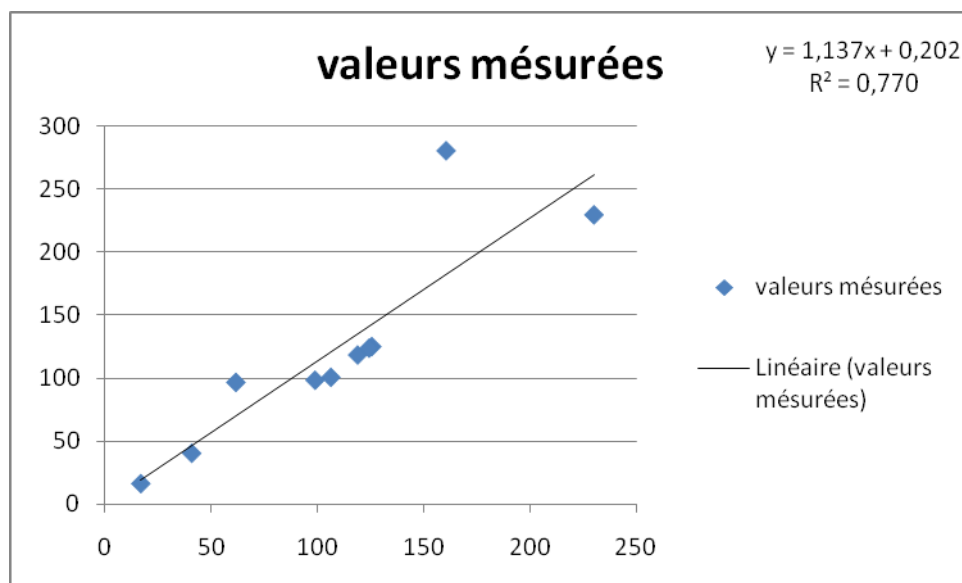


Fig. N° IV-25: représentation graphique des valeurs prédites en fonction des valeurs mesurées.

On peut dire que La corrélation est satisfaisante ($R = 0,88$).

Il existe une autre manière de vérifier la validité du modèle, elle consiste à comparer la moyenne calculée à partir du modèle et celle mesurée au centre du domaine expérimental [122].

La moyenne des réponses, peut être considérée comme la valeur de la réponse lorsque tous les facteurs sont au niveau zéro. C'est-à-dire la valeur de la réponse au centre du domaine expérimental.

La valeur calculée par le modèle est de l'ordre de 118,69. La moyenne mesurée au centre du domaine ($1/3, 1/3, 1/3$) est de l'ordre de 118,73 (Ecart type= 9,22). Les deux valeurs sont proches, la validité du modèle est ainsi confirmée.

Le modèle mathématique ne présente pas la même précision dans tout le domaine expérimental, c'est au point central qu'il est plus précis [122].

IV-6. Résultats d'analyse de la composition de l'extrait de propolis

IV-6. 1. Analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM)

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie et les dimensions de la chambre de développement ont un effet prononcé sur la séparation [123].

Trois systèmes de solvant ont été utilisés, les chromatogrammes résultant comportent une série de spots (**fig.N° IV-26**), l'identification des composées étant basée sur la comparaison des rapports frontaux (R_f) et la couleur observée sous la lumière UV (**Tableau N° IV-28, IV-29 et IV-30**). Suite au nombre réduit des étalons disponibles, pour certains, on s'est arrêté à l'identification de la famille, ou bien à utiliser des données bibliographiques.

Les classes de l'extrait éthanolique de la propolis varient dans le type (la nature de la tache) et la quantité (surface de la tache) ceci est dû aux variations de la provenance de la propolis. Le tableau qui suit comporte les R_f des différents spots apparus avec les différents systèmes de solvant utilisés, ainsi que la couleur révélée sous lumière UV.

Un ensemble de spots a été obtenu pour les différents extraits de propolis (extrait éthanolique de chaque région).

- **Composés identifiés dans la propolis de montagne**

Quatre taches révélées avec le premier système de solvant (chloroforme, méthanol et eau (70 %,20%, 10 %), onze taches par le système (hexane, éthanol et 1 % d'acétone) et sept taches avec le système (Ether de pétrole et Acétate éthylique (7 :3)). Les composés identifiés par le troisième système font partie des flavonoïdes.

- **Composés identifiés dans la propolis de la plaine**

Trois spots présentés par le système (chloroforme, méthanol et eau), onze taches par le système (Hexane, Ethanol et 1% de l'Eau) et six par le troisième système. Dans cette propolis on remarque l'absence de la famille des acides gras qui sont révélés par le premier système, et aussi l'absence de pinostrobine révélée par le troisième système dans la propolis de montagne.

- **Composés identifiés dans la propolis de la steppe**

Trois taches ont été présentées par le premier système, onze par le deuxième système, et six par le troisième système.

En comparant les Rf ainsi que la coloration observée sous UV des spots avec ceux des étalons élusés dans les mêmes conditions expérimentales. On a pu identifier la famille des acides aliphatique et celle des acides phénoliques dans les extraits éthanolique de la propolis des trois régions, et la famille des acides gras dans l'extrait éthanolique de la propolis de montagne.

Pour l'identification des flavonoïdes, on a constaté la présence de pinosombrine, chyrisine et le caffeate phenéle dans les extraits de propolis de montagne et de la plaine. Par contre on a constaté l'absence de pinosombrine dans l'extrait de la propolis de la steppe. Ses résultats vont dans le même sens que ceux obtenues dans d'autres travaux [102], qui ont identifiés la présence de la pinosombrine et la chyrisine dans les extraits éthanolique de la propolis des différentes régions de Turquie.

Tableau N° IV-28 : Les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis du groupe montagne par les différents solvants.

extrait	Système éluant	Couleur sous l'UV (365 nm)	Rf	Type de famille possible	Composé probable
L'extrait de la propolis de montagne	Chloroforme - Méthanol- Eau (70%, 20%, 10%)		0,16	Acide aliphatique	Acide salicylique
			0,33	-	-
			0,72	Acide gras	Acide oléique
			0,83	-	-
	Hexane - Ethanol et 1% acide Acétique		0	Polyphénols	Acide gallique
			0,04	-	-
			0,18	-	-
			0,24	-	-
			0,28	-	-
			0,39	-	-
			0,47	Les stérols	Cholestérol
			0,57	-	-
			0,62	-	-
			0,68	-	-
			0,83	-	-
		Ether de Pétrole et acétate éthylique (7 : 3)	Gris	0,06	-
	Marron		0,13	-	-
	Jaune		0,26	phénols	Cafféate phénéthyle
	Violet		0,34	-	-
	Brune foncée		0,41	Flavonoïdes	chyrisine
	Jaune claire		0,68	Flavonoïdes	pinosombrine
	Bleu clair		0,84	Flavonoïdes	Pinostrobin

Tableau N° IV-29: les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis de la plaine par les différents solvants : Adsorbant gel de silice.

extrait	Système éluant	Couleur sous l'UV (365 nm)	Rf	Type de famille possible	Composé probable	
L'extrait de la propolis de la plaine	Chloroforme Méthanol- Eau (70%, 20%, 10%)		0,16	Acides aliphatiques	Acide salysilique	
			0,33	-	-	
			0,83	-	-	
	Hexane – Ethanol et 1% acide Acétique			0	Polyphénols	Acide gallique
				0,03	-	-
				0,17	-	-
				0,24	-	-
				0,28	-	-
				0,39	-	-
				0,47	Stérols	Cholestérol
				0,57	-	-
				0,62	-	-
				0,68	-	-
				0,83	-	-
	Ether de Pétrole et acétate éthyliquin (7 / 3)	Gris		0,06	-	-
		Marron		0,13	-	-
		Jaune		0,26	phénols	Cafféate phénéthyle
		Violet		0,34	-	-
		Brune foncée		0,41	Flavonoïdes	Chyrisine
		Jaune claire		0,68	Flavonoïdes	Pinosombrine

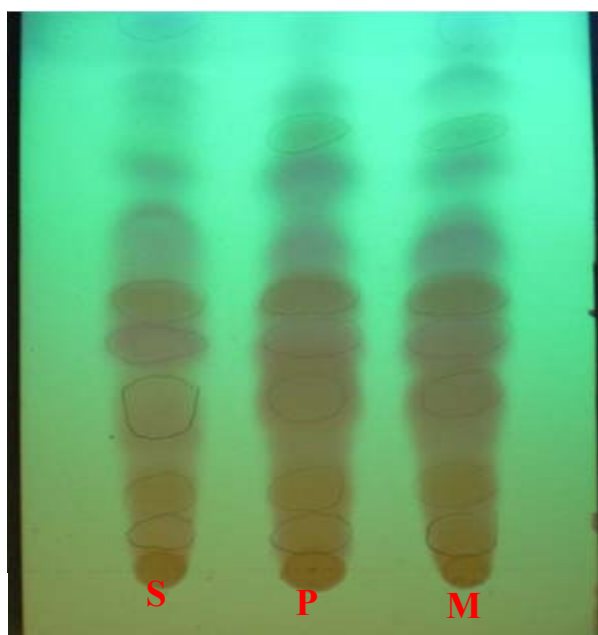
Remarque :

- : Tache non identifié

On remarque aussi que le système éluant deux a donné le nombre le plus élevé des taches, mais on a observé une trainée ce qui s'explique par la mauvaise séparation des familles.

Tableau N° IV-30: les classes des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de la propolis de la plaine par les différents solvants.

extrait	Système éluant	Couleur sous l'UV (365 nm)	Rf (cm)	Type de famille possible	Composé probable	
L'extrait de la propolis de la steppe	Syst 1		0,16	Acides aliphatiques	Acide salicylique	
			0,33	-	-	
			0,83	-	-	
	Syst 2			0	Polyphénols	Acide gallique
				0,04	-	-
				0,18	-	-
				0,24	-	-
				0,28	-	-
				0,39	-	-
				0,47	Stérols	Cholestérol
				0,57	-	-
				0,62	-	-
				0,68	-	-
			0,83	-	-	
	Syst 3		Gris	0,06	-	-
			Marron	0,13	-	-
			Jaune	0,26	phénols	Cafféate phénéthyle
			Violet	0,34	-	-
		Brune foncée	0,41	Flavonoïdes	Chyrisine	
		Jaune claire	0,68	Flavonoïdes	Pinosombrine	



M : propolis montagnaise

P : propolis de la plaine

S : propolis Saharienne

Fig. N° IV-26 : Chromatogrammes des extraits éthanolique de propolis (phase mobile : Ether de pétrole et acétate éthylique)

IV-6. 2. Résultats de la caractérisation des extraits de propolis par la résonance magnétique et nucléaire (R M N)

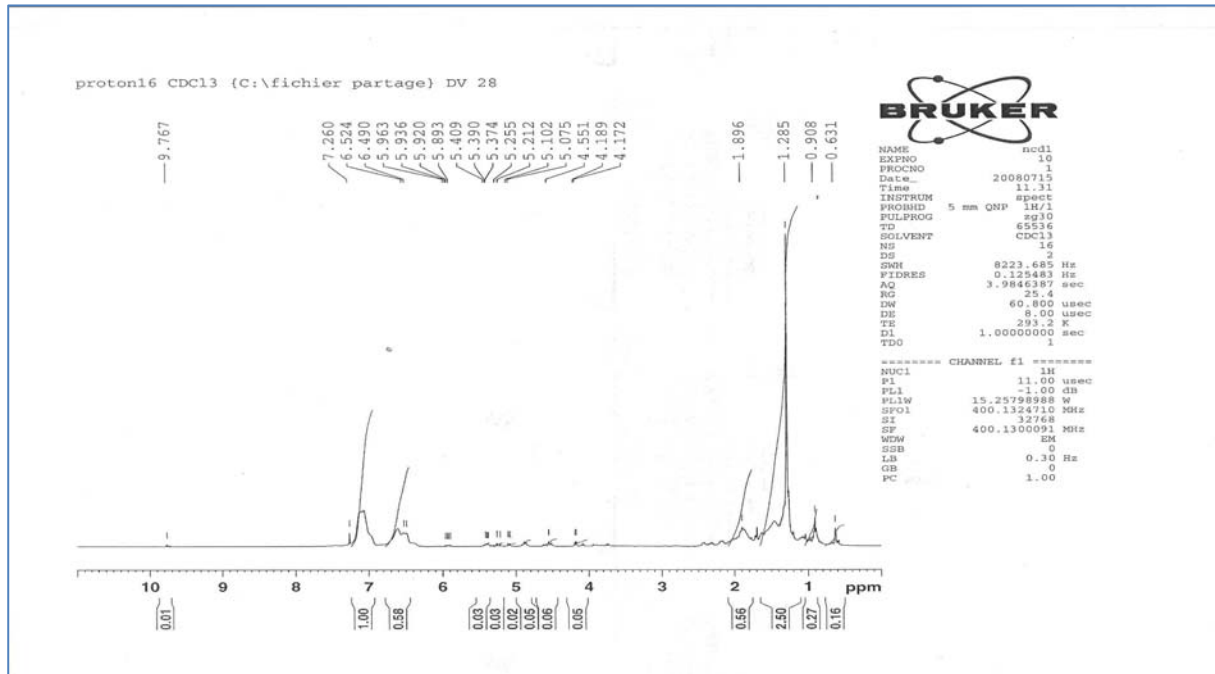


Fig. N° IV-27 : L'extraction à chaud dans l'Ethanol (70 %), la propolis Saharienne.

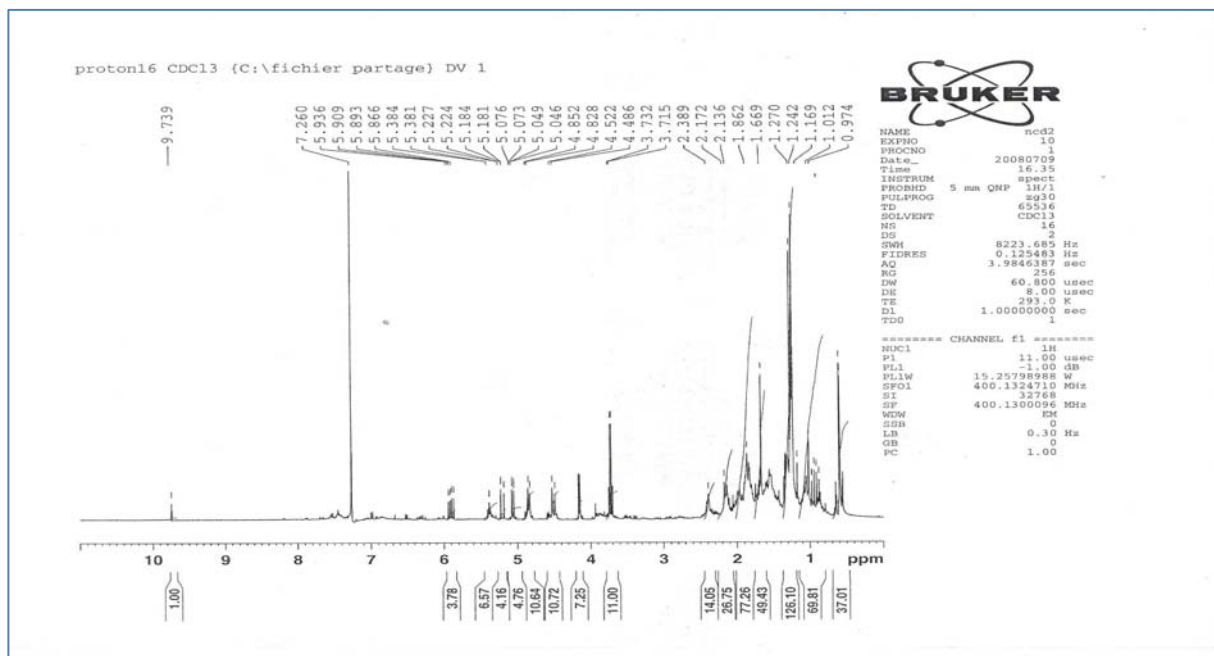


Fig. N° IV-28 : L'extraction par macération dans l'Ethanol (70%), la propolis Saharienne.

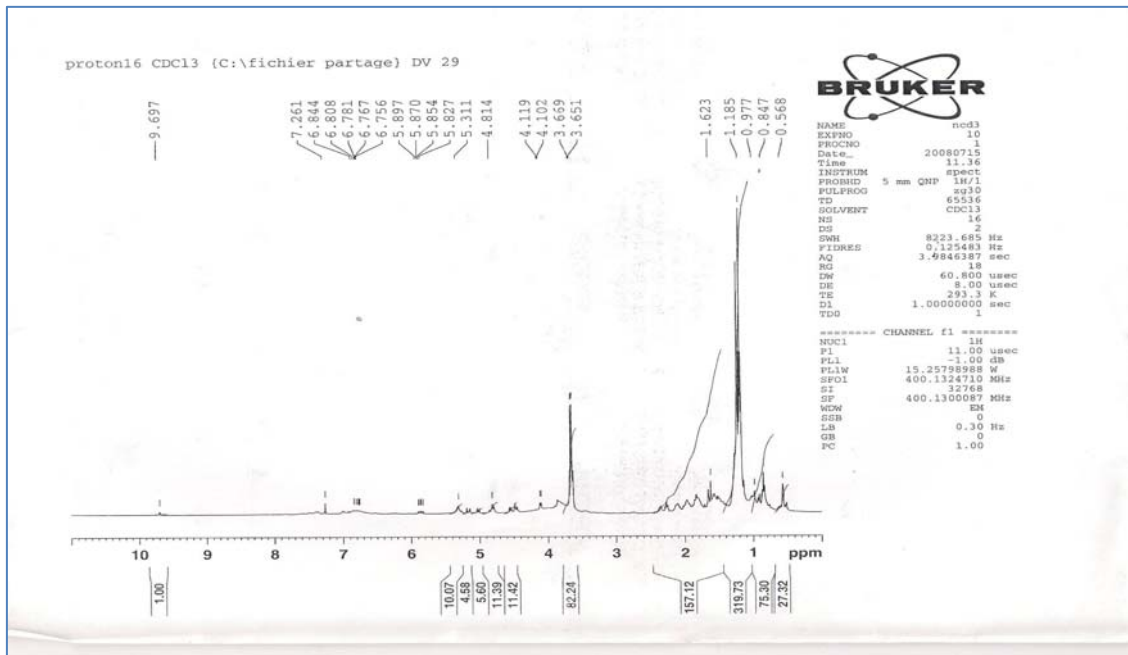


Fig. N° IV-29 : Extraction par le Méthanol, propolis montagnaise (Yakouren 2006).

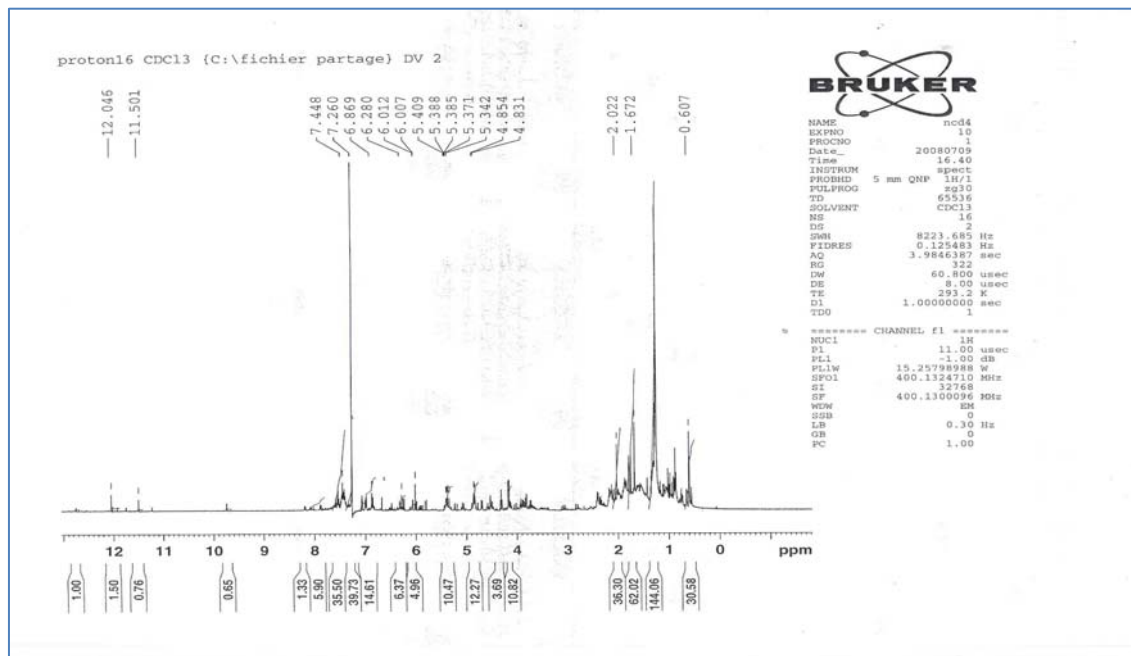


Fig. N° IV-30 : Extraction par l'Ethanol (70%), propolis montagnaise (Yakouren 2006).

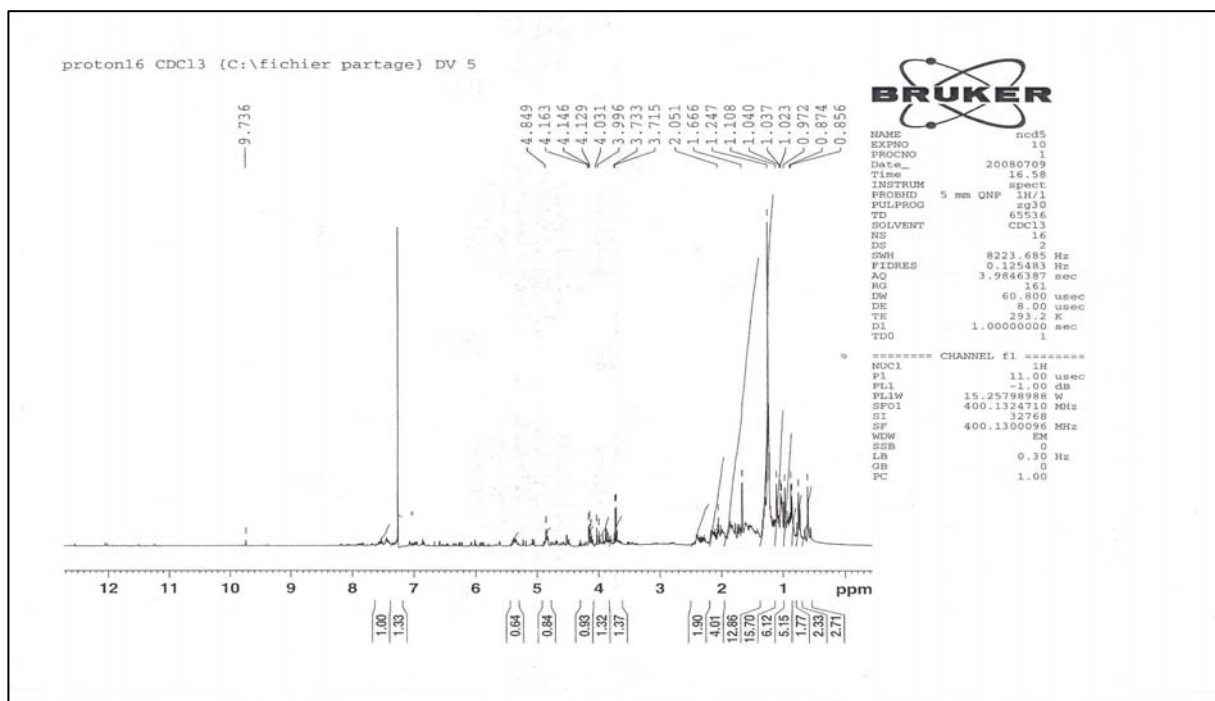


Fig. N° IV-31 : l'extraction Ethanologique de la propolis de Yakouren 2007.

L'RMN permet de détecter les composés qui s'ionisent dans les conditions utilisés, elle présente une méthode simple pour obtenir des informations globales sur des échantillons complexes. Dans notre cas, elle nous a fourni comme une empreinte digitale des différents extraits de la propolis.

Les figures 27 et 28 présentent les deux spectres RMN-H réalisés sur les extraits éthanologique (70%) de la propolis de la steppe. Le premier spectre (Fig. 27) illustre les résultats d'extraction à chaud, par contre le deuxième spectre (fig. 28) c'est les résultats d'extraction par macération.

Dans les deux figures les signaux de la RMN de proton sont présents entre 0,63 et 0,76 ppm avec différentes intensités, et ils sont regroupés en trois zones bien séparées. Les signaux présentés par l'extraction par macération sont plus distincts que ceux obtenue par l'extraction à chaud, mais le nombre de pics est plus important dans l'extraction à froid.

La première, c'est la zone aliphatique allant de 0,63 à 1,89 ppm pour l'extraction à chaud, et de 0,97 à 2,38 ppm pour l'extraction à froid. Donc les composés aliphatiques sont bien extrait à froid avec de l'Ethanol (70 %). Cette zone peut inclure le groupe méthyle isoprenyle.

La zone 2 allant de 3,7 à 6 ppm c'est la zone des doublets, cette région peut inclure les signaux aromatiques des méthoxyle qui apparaissent entre 3,75 à 3,82 ppm. L'extraction à

chaud (**fig.27**) a montré des signaux faibles dans la zone des doublets car ces derniers peuvent être détruits par la chaleur.

La troisième, c'est la zone aromatique complexe. De 6 – 10 ppm. Cette zone est presque absente, dans les deux cas d'extraction.

En résumant, les deux figures **27** et **28** montrent que la propolis de la steppe englobe des composés aliphatiques et des composés avec des doublets, mais elle est pauvre en composés aromatiques complexe.

Pour la région montagne on a pris la propolis de Yakouren 2006 (**fig. 29** et **30**). Ces figures montrent les résultats obtenus par RMN-H en utilisant les différents solvants d'extraction. L'extraction par le Méthanol (**fig. 29**) présente des signaux intenses dans la zone aliphatique entre 0,56 et 1,62 ppm, ainsi que dans la zone des composés contenant des doubles liaisons. Par contre les signaux sont faibles dans la zone aromatique. Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature sur la propolis brune de Cuba [**104**].

La fig.30 : l'extraction éthanolique (70%) de la propolis de Yakouren montre un profil semblable à celui de la propolis de la steppe, sauf que la propolis Saharienne a présenté un nombre de pics plus intense que la propolis de Yakouren ; mais cette dernière a montré une zone aromatique plus large que la propolis Saharienne (allant jusqu'à 12 ppm).

En comparant l'extraction par l'éthanol et le méthanol, on remarque que l'extraction éthanolique a permis de présenter des pics plus clairs que l'extraction méthanolique.

Fig.31 : présente l'extrait éthanolique de la propolis de Yakouren 2007. On remarque que cette extrait a montré trois (3) zones distinctes de signaux semblables à celles obtenues par l'extrait éthanolique de la propolis de Yakouren 2006, mais la zone aliphatique est plus intense, Cela prouve que la composition de la propolis change légèrement selon l'année de récolte.

IV-6. 3. Composition de la propolis en Métaux

D'après les résultats illustrés dans le tableau N° IV-31, on constate que le profile en éléments minéraux change d'une région à une autre.

Tableau N° IV-31 : Teneur moyenne des métaux analysés.

	Plaine (Mitidja)	Sahara (Laghouat)	Montagne (Ain El Hammam)
Potassium (K) (mg /kg)	190,82	268,28	276,58
Sodium (Na) (mg /kg)	755,32	607,26	563,15
Plomb (Pb) (mg /kg)	51,68	52,30	55,92
Zinc (Zn) (mg /kg)	207,70	397,09	1209,19
Cuivre (Cu) (mg /kg)	7,95	7,75	12,97
Manganèse (Mn) (mg /kg)	30,81	45,52	35,95
Chrome (Cr) (mg /kg)	< 4,97	< 4,83	< 4,98
Fer (Fe) (mg /kg)	993,84	968,51	559,15
Cobalt (Co) (mg /kg)	< 4,97	< 4,83	< 4,99
Cadmium (Cd) (mg /kg)	< 0,99	< 0,97	< 0,99
Nickel (Ni) (mg /kg)	< 5,96	< 5,80	< 5,99
Totale (mg /kg)	2255,01	2363,95	2719,86

Le Potassium, le Sodium, le Zinc et le Fer ont présenté les concentrations les plus élevées dans les échantillons analysés, les autres éléments ont diminué dans l'ordre : Plomb > Manganèse > Cuivre. Tandis que le Chrome, le Cobalt, le Cadmium et le Nickel étaient aux dessous de la limite de détection dans tous les échantillons analysés.

La concentration de Zinc était plus élevée dans la propolis provenant de montagne (1209 mg/Kg) contrairement à celles provenant de la Plaine et Sahara (207,70 et 397,09 mg/kg respectivement). Le même échantillon a présenté la plus faible concentration en Fer (559,15 mg /Kg).

Les résultats obtenus dans notre étude sont comparables à ceux trouvés dans la littérature [104] ; celle-ci a signalé que la teneur en minéraux change d'une région à une autre et que le potassium et le calcium présentent les concentrations les plus élevées : 473 et 1650 mg/Kg respectivement.

En comparant la teneur totale en minéraux présente dans les propolis brutes des trois régions différentes, on peut en déduire que la propolis montagnaise présente la valeur la plus élevée (2719,86 mg/Kg), suivie de celle Saharienne (2363,95 mg/Kg) et en fin de la Plaine (2255,01 mg/Kg).

IV-7. Etude de la composante principale

Les analyses statistiques élémentaire réalisés restent insuffisantes, d'autres analyses descriptives sont nécessaires pour :

- Identifier les interactions entre les différents paramètres.
- Identifier les paramètres significatifs permettant de différencier entre les propolis.

Pour cette raison nous utiliserons l'analyse de la composante principale (ACP).

IV-7. 1. Présentation des données

Tableau N° IV-32 : Variables et individus utilisés.

Variables	Individus
V ₁ : H+M V (pertes pendant le séchage)	I ₁ : Yakouren 2006
V ₂ : Cendres (%)	I ₂ : Yakouren 2007
V ₃ : Acidité (%)	I ₃ : Yakouren 2008 "a"
V ₄ : Masse Volumique	I ₄ : Dellys
V ₅ : Teneur en Polyphénols	I ₅ : Bouzgen
V ₆ : Teneur en Flavonoïdes	I ₆ : Ain El Hammam
V ₇ : Teneur en Acide ascorbique	I ₇ : Isser
V ₈ : Sucres totaux (%)	I ₈ : Mitidja 2007
V ₉ : Sucres réducteurs (%)	I ₉ : Chaabet
	I ₁₀ : Ain Oussara
	I ₁₁ : Lagouat

Tableau N° IV-33 : Représentation des données.

	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉
I ₁	2,3	4,21	7,24	1,01	206,11	30,9	0,38	2,72	1,75
I ₂	1,67	2,91	7,52	1,03	254,3	164,39	0,56	2,35	2,06
I ₃	1,26	3,11	7,6	1,06	215	83,45	0,44	3,09	1,72
I ₄	2,97	2,98	4,73	1,05	135,67	48,79	0,55	0,49	0,98
I ₅	2,77	2,8	7,3	1,18	310,37	189,8	0,57	1,03	0,59
I ₆	3,39	5,32	8,67	1,12	277	193,75	0,27	0,66	0,58
I ₇	2,57	2,29	7,33	1,12	100,57	15,24	0,64	0,98	0,31
I ₈	1,47	2,41	7,58	1,04	227,85	103,48	0,45	2,41	2,37
I ₉	2,31	2,51	7,87	1,14	160,42	20,84	0,45	0,59	0,61
I ₁₀	1,47	1,58	6,84	0,98	247,78	159,21	0,54	2,57	0,78
I ₁₁	3,39	4,43	6,53	1,07	241,62	120,35	0,12	0,47	0,32

L'analyse des données par l'ACP nous conduit tout d'abord à calculer les paramètres descriptifs élémentaires présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N° IV-34 : Résultats des paramètres descriptifs.

Variable	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
V ₁	1,26	3,39	2,32	0,81
V ₂	1,58	5,32	3,20	1,12
V ₃	4,73	8,67	7,13	1,01
V ₄	0,98	1,18	1,06	0,05
V ₅	100,57	310,37	221,62	62,76
V ₆	15,24	193,75	110,93	65,48
V ₇	0,12	0,64	0,45	0,15
V ₈	0,47	3,09	1,67	1,03
V ₉	0,31	2,37	1,14	0,76

Le paramètre écart-type montre que les résultats obtenus par l'analyse des polyphénols et les flavonoïdes sont plus dispersés autour de la moyenne.

IV-7. 2. Analyse de la composante principale (ACP) globale

Déterminons la matrice de corrélation pour l'ensemble des paramètres étudiés.

La matrice de corrélation nous donne une première idée sur les associations existant entre les différentes variables.

Tableau N° IV-35 : Matrice de corrélation globale.

Variabes	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆	V ₇	V ₈	V ₉
V ₁	1								
V ₂	0,648	1							
V ₃	-0,178	0,280	1						
V ₄	0,558	0,237	0,258	1					
V ₅	-0,015	0,257	0,478	0,160	1				
V ₆	0,065	0,136	0,414	0,232	0,894	1			
V ₇	-0,443	-0,794	-0,177	0,042	-0,339	-0,180	1		
V ₈	-0,915	-0,360	0,304	-0,613	0,124	-0,090	0,216	1	
V ₉	-0,718	-0,166	0,160	-0,518	0,077	-0,112	0,140	0,753	1

Conditions pour l'analyse ACP

- On remarque que les variables sont inter- corrélées, car la matrice de tableau N° IV-35 comporte un certain nombre de coefficients de tailles intéressantes (0,613, 0,558, 0,478, etc.) et même quelques coefficients particulièrement élevé (-0,915, 0,894, -0.794, etc.).
- Le test de sphéricité de Bartlett confirme que la matrice n'est pas une matrice d'identité.
- Le déterminant de la matrice est différent de zéro et un, donc la matrice n'est pas singulière.

Donc on peut procéder à l'analyse de la composante principale proprement dite.

Interprétation des corrélations

Des fortes corrélations sont constatées entre :

- L'acide ascorbique est négativement corrélé au taux de cendres. Les essences d'arbres les plus riches en vitamine C sont les plus pauvres en minéraux.
- Corrélation positive entre les polyphénols et les flavonoïdes qui est due à la coexistence de ces deux composés dans les plants.
- Corrélation positive entre les sucres réducteurs et les sucres totaux. Indiquant que les sucres réducteurs participent en grande partie à la composition des sucres totaux.
- Corrélation négative entre les sucres (réducteurs et totaux) et les pertes pendant le séchage (humidité + matières volatiles), ceci est largement expliqué par le fait que l'humidité c'est ce qui reste par rapport à la matière sèche.

IV-7. 3. Analyse ACP proprement dite

IV-7. 3.1. Détermination des valeurs propres

Les valeurs propres, sont liées à un concept mathématique très simple : c'est la qualité de la projection des individus lorsque l'on passe de N dimensions (N étant le nombre de variables, ici 9) à un nombre plus faible de dimensions.

Tableau N° IV-36 : Valeurs propres.

	Valeur propre	Variabilité (%)	% cumulé
F1	3,534	39,267	39,267
F2	2,477	27,528	66,794
F3	1,433	15,924	82,719
F4	0,836	9,288	92,006
F5	0,384	4,261	96,268
F6	0,175	1,943	98,211
F7	0,122	1,356	99,567
F8	0,039	0,433	100,000
F9	0,000	0,000	100,000

En utilisant le critère de Kaiser, on juge du nombre optimal des composantes à extraire. Celui-ci, exige que la valeur propre de la composante soit ≥ 1 .

Dans notre cas il suffirait d'extraire trois composantes qui, en tout, peuvent expliquer 82,72 % de la variance totale.

Une lecture du tableau N° IV-36 montre que :

- Une variance de 3,53 sur le 1^{er} axe explique 39,27% (PC1 :39,27%). de l'information initiale.
- Une variance de 2,48 sur le 2^{ème} axe explique 27,53 % (PC2 : 27,53%) de l'information ce qui représente 66,79 % de l'information cumulée.
- Une variance de 1,43 sur le 3^{ème} axe explique 15,92 % (PC3 : 15,92%) de l'information soit 82,70 de celle cumulée.

Cela signifie que si l'on représente les données sur les deux axes (F1 et F2), alors on aura 66,79% de la variabilité totale qui sera préservée.

IV-7. 3.2. Qualité de la représentation des variables

Une variable sera d'autant mieux représentée sur un axe si :

- Sa corrélation avec la composante principale correspondante est en valeur absolue proche de 1. En effet, le coefficient de corrélation empirique entre une ancienne variable V_i et une nouvelle variable F_i n'est autre que le cosinus de l'angle du vecteur joignant l'origine au point V_i représentant la variable sur l'axe avec cet axe.
- elle est proche du bord du cercle des corrélations, car cela signifie que le cosinus de l'angle du vecteur joignant l'origine au point représentant la variable avec le plan est, en valeur absolue, proche de 1, etc.

Tableau N° IV-37 : Corrélation entre les variables et les axes principaux.

Variable	F1	F2	F3
V ₁	0,938	-0,273	-0,106
V ₂	0,691	0,292	-0,584
V ₃	0,065	0,745	0,109
V ₄	0,670	-0,025	0,524
V ₅	0,240	0,879	0,201
V ₆	0,319	0,744	0,418
V ₇	-0,542	-0,362	0,689
V ₈	-0,855	0,420	-0,145
V ₉	-0,735	0,358	-0,289

Le tableau ci-dessus montre que :

- les pertes pendant le séchage (V₁), Cendres (V₂), masse volumique (V₄), sucres totaux (V₈) et sucres réducteurs (V₉) contribuent le plus à la formation de la première composante principale (CP1). On peut constater que les facteurs de PC1 sont plutôt reliés à la composition physico chimique et donc relié à l'origine géographique. On appellera PC1 « provenance ».
- L'acidité (V₃), Polyphénols (V₅) et Flavonoïdes (V₆) contribuent le plus à la formation de la deuxième composante principale (PC2). On peut constater que PC2 est définie par les facteurs reliés à l'activité anti-oxydante de la propolis. On appellera PC2 « activité anti-oxydante ».
- L'acide ascorbique (V₇) contribue le plus à la formation de la troisième composante principale (PC3). Qui est plus relié à l'origine botanique de la propolis. On appellera cette composante « origine botanique ».

IV-7. 3. 3. Etude des liaisons entre les variables

On peut interpréter les positions des anciennes variables les unes par rapport aux autres en termes de corrélations à l'aide de graphique du cercle des corrélations. Pour mieux interpréter on fait une rotation pour simplifier la structure obtenue (rotation orthogonale Varimax).

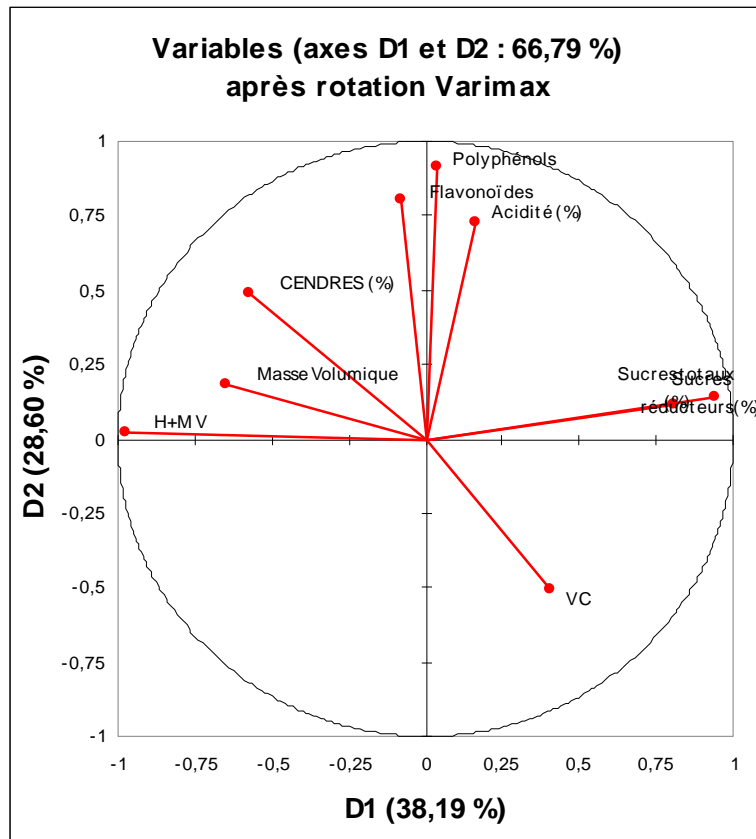


Fig. N° IV-40 : Graphique du cercle des corrélations des variables.

Nous pourrions déduire du graphique ci-dessus :

D'une part, une forte corrélation positive entre les poly-phénols et les flavonoïdes, ainsi que entre les sucres totaux et sucres réducteurs. L'acide ascorbique et les cendres sont négativement corrélés.

D'autre part, les variables sucres totaux, pertes pendant le séchage, polyphénols et les flavonoïdes sont les plus significatifs.

IV-7. 3.4. Représentation des individus dans les nouveaux axes

Le graphique ci-dessous permet de présenter les individus (échantillons) sur une carte à deux dimensions.

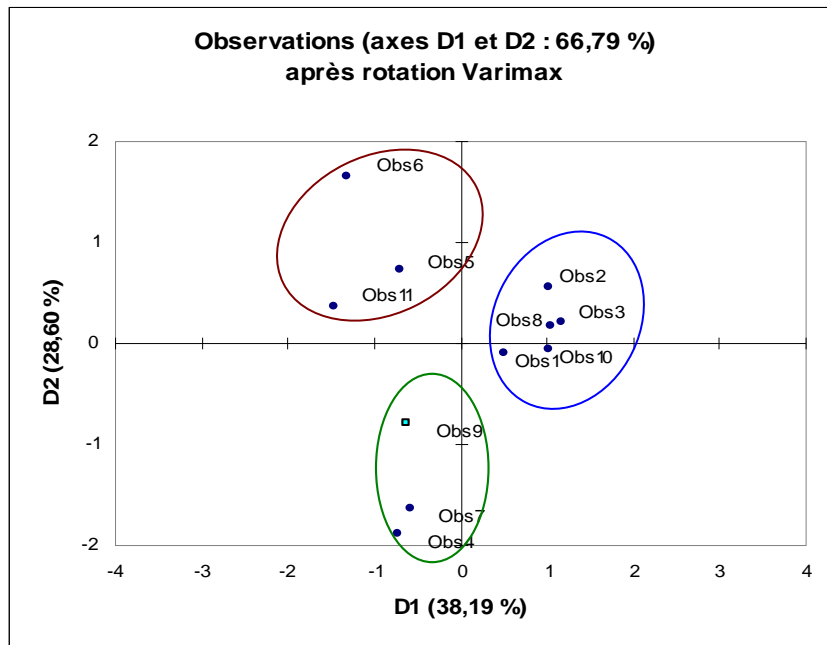


Fig. N° IV-41 : Représentation des individus sur le plan D1 et D2.

On remarque que :

- Les variables sucres réducteurs et les sucres totaux caractérisent un groupe d'individus bien définis ($I_1, I_2, I_3, I_8, I_{10}$). Et ils sont mieux différenciés par rapport au PC1 et donc par les facteurs liés à la provenance géographique.
- Les variables : taux des cendres, les flavonoïdes caractérisent le groupe des individus (I_6, I_5, I_{11}). Donc ils sont différenciés par rapport à leur activité antioxydante.
- Le troisième groupe (I_9, I_7, I_4) est aussi caractérisé par son activité antioxydante mais qui diamétralement opposée au groupe précédent.

Conclusion : notre ACP nous a permis de déterminer :

- Les variables qui caractérisent l'origine géographique et ceux qui caractérisent l'activité antioxydante ;
- Les variables corrélées entre elles.



CONCLUSION

Conclusion

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, la propolis d'abeille constitue de véritable usine chimique dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien être de population.

Notre travail qui est une contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques de la propolis Algérienne selon les régions pédoclimatiques et les races d'abeilles, nous a permis de comprendre que le domaine des produits de la ruche demeure encore un terrain valable de recherches scientifiques.

Les caractéristiques biochimiques des échantillons de propolis étudiés montrent qu'elle contient 1,26 à 3,89 % des pertes pendant le séchage (humidité + matières volatiles), et un taux de matière sèche aux environs de 98,53 %.

Concernant le taux des cendres, il varie entre 2,01 à 4,43 % dont les minéraux les plus dominants sont : le Potassium, le sodium, le Zinc et le fer. Le groupe Montagne présente le taux des cendres le plus élevé (3,20 %) ainsi que le taux des minéraux (2719,86 mg / kg). Tandis que les protéines et les sucres sont présents sous forme des traces.

La propolis généralement est de nature acide, c'est le cas pour la propolis Algérienne : son pH varie de 4,38 à 4,54, et son acidité de 4,73 à 10,67 %. Elle a par contre un point de fusion très élevé, qui peut atteindre 76,8 °C pour le groupe saharienne.

L'étude de l'activité antioxydante des échantillons de propolis Algérienne par l'évaluation de leurs pouvoirs anti-radicalaires, pouvoir réducteur et la quantification de leurs composées phénoliques (polyphénols et flavonoïdes), a confirmé les propriétés puissantes qui possèdent les extraits ethanoliques de la propolis à piéger les radicaux libres. Suivant les résultats qu'on a obtenu expérimentalement, nous pouvons en déduire que la propolis de groupe Sahara présente une meilleur activité antioxydante rapport aux autres groupes.

Le rendement d'extraction des composés de la propolis est conditionné par la matrice de solvant et le temps de contact. Le modèle mathématique obtenu par l'optimisation de l'extraction en utilisant le plan de mélange est type linéaire avec les interactions des trois solvants :

$$Y = 229.95 X_1 + 16.61 X_2 + 125.37 X_3 - 98.44 X_1 X_2 - 214.08 X_1 X_3 - 121.64 X_2 X_3 + 1159.64 X_1 X_2 X_3.$$

L'analyse de la composition des extraits éthanoliques de la propolis par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a permis d'identifier la présence des acides aliphatiques, des acides gras, des composés phénoliques, des stérols et des flavonoïdes (chryisine, pinosombrine, pinostrobine). Tandis que la résonance magnétique et nucléaire (RMN) a révélé la présence de trois (3) groupes des composés différents : les composés aliphatiques, les composés insaturés et les composés aromatiques.

On n'a pas pu déterminer l'influence de la race d'abeille sur les caractéristiques physico-chimiques de la propolis, car il nous a été difficile de mettre nos deux races (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica Sahariensis*) dans les mêmes conditions pédoclimatique.

L'analyse de la composante principale (ACP) a mis en évidence les paramètres les plus significatifs pour la caractérisation des propolis (taux en Polyphénols, pertes pendant le séchage, pourcentage en sucres totaux, pourcentage en sucres réducteurs et le taux des flavonoïdes). Elle nous a permis aussi de déterminer les paramètres (variables) qui caractérisent certains groupes des individus.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation d'un sous produit de la ruche, et parvenir à mettre à la disposition de la population un produit naturel, efficace et accessible.

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

- La mise en place de deux ruches d'abeille de races différentes (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*) dans le même emplacement, afin de confirmer l'influence de la race d'abeille sur la composition ;
- Elargissement du nombre des échantillons pour toucher toutes les wilayas du pays ;
- Evaluation des propriétés thérapeutiques des extraits de propolis ;
- Identifier les principales plantes productrice 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 observés.



BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

- [1]: Eric Debuyser., 1984. La propolis. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. *Université De Nante, Faculté de pharmacie.*
- [2]: Tosi, Enzo A.; Ciappini, Maria C., Cazzolli, Ampelio F., Tapiz, Luis M. 2006. Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentine). *APIACTA 41 (2006) PAGE 110-120.*
- [3]: Marcucci, M.; 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie, 26, 83 – 99.*
- [4]: Suraj Prakash Shrestha .; Yuji Narukawa.; Tadahiro Takeeda. 2007. Chemical constituents of nepalase propolis: isolation of new dalbergiones and related compound. *Journal of Natural Medicine (2007) 61 : 73 – 76.*
- [5]: Mohsen Fathi Najafi.; Fatemeh vahdy.; Mohammed Seyyedini.; Hamid reza Jomehzadeh.; Kazem Bozary. 2007. Effet of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnologie. (2007) 54: 49 – 56.*
- [6]: R. KRELL., 1996. Value - edded products from beekeeping. *Food and agriculture organization of the United Nations Rome. Chapitre 5.*
- [7]: Bankova V., de Castro SL., Marcucci MC. 2000. Propolis : récent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie 31: 3 – 15.*
- [8]: Dobrowolski, J. W.; Vohora, S. B.; Sharma, K.; Shah, S. A.; Naqvi, S. A.; Dandiya, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol. 1991, 35, 77–82.*
- [9] : Liqin Jiang. ; Guozhen Fang. ; Yan Zhang. ; Guojie Cao. ; Shuo Wang. 2008. Analysis of Flavonoids in Propolis and *Ginkgo biloba* by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 11571–11577.*
- [10]: Burdock, G. (1998), Review of the biological properties and toxicity of bee
- [11]: Shigeniro Kamazawa.; Tomoka Hamasaka.; Tsutomu Nakayama. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry. 84: 329- 339.*
- [12]: Jianchun Sheng, Jing Zhou, Lin Wang, Juan XU. 2007. Antioxidant activity of Ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *Eur Food Technol.225: 249- 253.*
- [13]: Shiva.Mohammadzadeh,Mohammad Shariatpanahi.; Manoochehr Hamdi.; Reza Ahmadkhniha.; Nasrin Samadi.; Seyed Nasser Ostad. 2006. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis . *food Chemistry.*
- [14]: Atac Uzel.; Kadriye Sorkun. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research 160 (2005) 189 – 195.*

- [15]: 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* . 113. 278- 283.
- [16]: Fenge Li. ; Suresh Awwale. ; Yasuhiro Tezuka et Shigetoshi Kadota. 2008. cytotoxic constituents from brazilian red prrpolis and their structure- acivity relationship. *Biorganique et Medicinal chemistry* 16: 5434 – 5440.
- [17]: Docteur Yves Donadieu, les produit de la ruche. 3^{ième} Edition.1981
- [18] : Pierre Jean prost. ; Pierre Medori Raul. 1984. Apiculture. *Ed J. B. Baillière*.
- [19] : K. Ghedira. ; P. Goetz. ; R. Le Jeune. 2009. Propolis. *Phytothérapie* 7: 100-105.
- [20]: Erkmen O.; Ozcan MM. 2008. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food* 11: 92-587.
- [21]: Liu CF, Lin CC, Lin MH, et al. (2002) Cytoprotection by propolis ethanol extract of acute absolute ethanol-induced gastric mucosal lesions. *Am J Chin Med* 30: 245-255.
- [22]: Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, et al. (2008) Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina (Kaunas)* 44: 977-83.
- [23]: Esin Basim .; Huseyin Basim b.; Musa Ozcan. 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering* 77 : 992–996
- [24] : 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.
- [25]: Eun-Hee Park.; Sun-Hee Kim et Soo-Sun Park. 1996. Anti-inflammatory Activity of Propolis. *Arch. Pharm. Res. VoL19, No.5, pp. 337-341*.
- [26]: M. Amoros.; F. Sauvager. ; L. Girre. ; M. Cormier. 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 23: 231 – 240.
- [27]: Feng Li.; Suresch Awale.; Yasuhiro Tezuka et Shigetoshi Kadota. 2008. Cytotoxic constituent from brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic et medicinal Chemistry* 16: 5434 – 5440.
- [28]: Arjun H. Banskota.; Yasuhiro Tezuka.; Jeevan K. Prasain.; Katsumichi Matsushige.; Ikuo Saiki et Shigetoshi Kadota. 2004. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 72867292
- [29]: G. A. Burdock. 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36: 347 – 363.

- [30]: Ghisalberti E. L. 1997. Propolis: a review. *Bee World* 60: 59 – 84.
- [32]: Pierre Jean-Proste, Yves Le Conte. 2005. Apiculture : Connaître l'abeille, conduire le rucher. *Edition lavoisier*.
- [33]: Shigenori Kumazawa.; Jun Nakamura.; Masayo Murase.; Mariko Miyagawa.; Mok-Ryeon Ahn et Shuichi Fukumoto. 2008. Plant origin of Okinawa propolis: honeybee behaviour observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften* (2008) 95:781–786.
- [34]: Erica Weinstein Teixeira.; Giuseppina Negri.; Renata M. S. A. Meira.; Antonio Salatino. 2005. Plant origin of green propolis : Bee Behavior, Plant Ana Chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.1*: 85 – 92.
- [35]: Bruno B. Saliva. ; Pedro L. Rosalen. ; Jaime A. Cury.; Masaharu Ikegaki.; Vinivius C. Souza.; Alessandro Esteves et Severino M. Alencar. 2007. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*.
- [36]: Gulhan Vardar-Unlu.; Sibel Silici.; Mehmet Unlu. 2008. Composition and in vitro antimicrobial activity of populus buds and poplar-type propolis. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1011 – 1017.
- [37] : Moudir Naima, 2004. Les polyphénols de la propolis algérienne. . Thèse de magister en chimie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila.
- [38] : Frère Adam. 1985. Les croisements et l'apiculture de demain. SNA Paris. 126 page .
- [39] : Lejeune. B. ; Pourrat, A. et Dehmouche. H. 1988. Propolis utilisation en dermatocologie. Parfums, Cosmétiques, Aromes: 73-77.
- [40]: Neumann. D.; Gotze G.; et Binus. W. 1986. Clinical study of the testing of the inhibition of plaque and gingivitis by propolis. *Stomatologie der DDR*: 677-681
- [41]: Mizuno. M.; Inuma. M.; et Kato. H. 1987. Useful ingredients and biological activity of propolis. *Fragrance Journal*, 15(2): 20-28.
- [42]: Gülhan Vardar-Ünlü.; Sibel Silici.; Mehmet ünlü. 2008 . Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World J Microbiol Biotechnol* : 1011 – 1017.
- [43]: Sibel Silici.; Semiramis Kutulka. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 69 – 73.
- [44]: Li – Chang Lu.; Yue-Wen Chen. ; Cheng-Chun Chou. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 102: 213-220.
- [45]: Atac Uzel., Kadriye Sorkun., 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research* 160 (2005) 189 – 195.

- [46]: Enzo A Tosi.; Edmundo Ré.; Marta E Ortega. ; Ampelio F Cazzoli. 2007. Food preservative based on propolis : Bacteriostatic activity of propolis polyphénols and flavonoïdes upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry* : 1025- 1029.
- [47]: Lucrecia L Chaillou.; Monica A Nazareno. 2009. Bioactivité of propolis from Santiago del Estro, Argentina, related to their chemical composition. *Food Science and Technology*: 42: 1422 – 1427.
- [48]: Ricardo O. Orsi.; José M Sforcin.; Silvia R C Funari.; Vassya Bankova. 2005. Effect of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacologie* (5): 359 – 368.
- [49]: 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* 113 (2007) 278- 283.
- [50]: Eleni Melliou.; Eleftherios Stratis.; Ioanna Chinou. 2007. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chemistry* 103: 375 – 380.
- [51]: Ludmila Plenina.; Petr Krassotchko.; Irina Krassotchko. Propriété antivirales des produits de la ruche. *Apithérapie*.
- [52]: Elena Gregoris.; Roberto Stevanato. 2009. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology*.
- [53]: S. Buratti.; S. Benedetti. ; M. S. Cosio. 2007. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* 71: 1387- 1392.
- [54]: Banskota AH.; Nagaoka T.; Sumioka LY. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 80: 67 – 73.
- [55]: Eun-Hee Park.; Sun-Hee Kin et Soo-Sun Park. 1996. Anti-inflammatory activity of propolis. *Arch Pharm. Res. Vol 19 No 5, PP 337-341*.
- [56]: Vassya Bankova., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 114 – 117.
- [57]: Érica Weinstein Teixeira.; Giuseppina Negri.; Renata M.S.A. Meira.; Dejair Message.; and Antonio Salatino.; 2005. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence- based complementary and alternative medicine*. V2:85 – 92.
- [58]: Bruno B. Silva.; Redro L. Rosalen.; Jaime A. Cury.; Masaharu Ikegaki.; Vinicius C. Souza.; Alessandro Esteves.; and Severinom. Alencar. 2007. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence- based complementary and alternative medicine*.

[59]: 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.

[60]: Nagy, M. 1989. Constituents of propolis of Czechoslovak origin. *V. Chemical Papers*, 42 (5): 691-696.

[61]: Omar, M.O.M. 1989. Some characteristics of propolis from Upper Egypt. Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, *Cairo, Egypt, 6-10 November 1988*, 88-92.

[62]: Papay, V. 1987. Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta Pharm. Hung.*, 57:143-151.

[63]: Gabrys, J. 1986. Free amino acids in bee hive products (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. *Pharmac. Research Communications* 18 (6): 513-518.

[64]: Cuellar Cuellar, A. and Rojas Hernandez, N.M. 1987. Chemical components of Cuban propolis. *Revista Cubana de Farmacologia*, 21(3): 365-372.

[65]: Scazzocchio, F., D'auria, F.D., Alessandrini, D., Pantanella, F., 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* 161, 327–333.

[66]: Genya Gekker.; Shuxian Hua.; Marla Spivak.; James R.; Lokensgard.; Phillip K. Peterson. 2005. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology* 102 (2005) 158–163

[67]: Amoros, M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M., 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55, 1732–1740.

[68]: Branen A L.; Davidso PM.; Katz B. 1980. Antimicrobial properties of phenolics antioxydants and lipids. *Food technologie*.rr42-63.

[69]: Lucrecia L. Chaillou.; Monica A. Nazareno. 2009. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* 42 (2009) 1422–1427.

[70]: 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.

[71]: Kamazawa. S, Hamaska. T, Nakayama. T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry* 84. 329 – 339.

[72]: Ghedira. K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) Numéro 4: 162-169.

[73] : Ghedia K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie (2005) Numéro 4* : 162-169.

[74]: Erlund I.,2004. Review of the flavonoïds quircétine, hesperetin and naringine. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res 24*: 851 – 74.

[75]: Havsteen B. H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. *Pharmacol Therap 96*: 67-2002.

[76]: Häkkinen S.; 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. *These doctorale. KUOPIO. 93p.*

[77]: Rice- Evans C. A. ; Miller N.J.; Paganga G. 1996. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoïdes and phenolique acids. *Free radical Biology and Medicine, 20, (7), 933 – 956.*

[78]: Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot, 91, 179-194.*

[79]: Fiorucci. 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoides : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de Doctorat.Université de Nice-Sophia Antipolis. Spécialité: *Chimie, pp: 19-25.*

[80] : Marfak A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes .Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de Depsides. Thèse de Doctorat.Université de Limoges. Spécialité: *Biophysique, pp:6-34.*

[81] : Fiorucci (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoides : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de Doctorat.Université de Nice-Sophia Antipolis. Spécialité: Chimie, pp: 19-25.*

[82] : Milane H (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications. *Thèse de Doctorat .Université Louis Pasteur (Strasbourg). Spécialité Pharmacologie, pp : 13-3.*

[83]: De Whalley CV, Rankin SM, Houlst JRS, Jessup W and Leake DS (1990). Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol, 39(11), 1743-50.*

[84] : Ribéreau-Gayon. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. *Ed. Dunod Paris, 254.*

[85]: Nicola Volpi.; Gianluca Bergonzini. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42*: 354 – 361.

[86]: Sibel Silici.; Semiramis Kutluca., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology 99 (2005) 69 -73.*

[87]: Macheix J. J. ; Fleuriet A. ; Billot J. 1990. Fruit phenolics-boca rato, *USA: CRC Press.*

[88]: Beatriz Lima, Alejandro Tapia, Lorena Luna, Maria p. Fabani, Guillermo Schmeda-Hirschmann, Natalia S. Podio, Daniel A. Wunderlin, and Gabriela E. Feresin. 2009. Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of the Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2691–2698.

[89]: Leandro M., Luis G., Diase, José Alberto Pereira, Leticia Estevinho; 2008. Antioxydant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology* 46 (2008) 3482 – 3485.

[90]: Shi X., Dala N.S; 1991. Antioxydant behaviour of caffeine : efficient scavenging of hydroxyl radical. *Food and Chemical toxicology* 29, 1 – 6.

[91]: Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakarim. *Journal of science technology*, 26 (2): 211-219.

[92]: Vercautern J.; Cheze C.; Triau J. 1996. Polyphénols . *Edition : INRA, Paris : PP 31 – 43.*

[93]: Lapornik B., Prosek M., et Wandra A. L. 2005. Comparison of extracts prepared from plant byproduct using different solvent and extraction time. *Journal of food engineering*, 71 (2): 214-222.

[94]: Owen P.L., Johns T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, pp 149-160.

[95] : Kamazawa S, Tanguchi M., Suzuki Y., Shimra M., Kwon M-S et Nakayama T. 2002. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 373 – 377.

[96]: Singoleton V., Orthofer R et Lamuela-Raventos R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxydants by means of folin-ciocalteau reagent. *Methode of enzymologie*, 299, 152- 178.

[97]: Bahorun T. ; Gressier B. ; Trotin F. ; Brunet C. ; Dine T. ; Luyckx M. ; et autres ., Vasseur J. ; Cazin M. ; Cazin J.C. ; Pincas M. 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittle Forshing*, 46 (11), pp 1086-1089.

[98]: Yue-Horng Yen, Chia-Ho Shih and Ching-Hui Chang, 2008. Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food Chemistry Volume 107, P. 265-272.*

[99] : PASCAL BARBIN, 2006. Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

[100] : Akin H. 2008. Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins, modilisation et interprétation métabolique. Thèse doctorat, Institut National. *Polytechnique de toulouse, option genie des procédés et environnement. P40.*

[101] : B. Goodon, 1997. Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales. *Tec. et Doc. P 346, 347-353,354.*

[102] : Maria Jesus Periago. ; Francisco Rincon.; Maria Dolores Agüera et Gaspar Ros. 2004. Mixture Approach for optimizing Lycopene Extraction from Tomato Producuts. *J. Agric Food Chem 2004, 52, 5796 – 5802.*

[103]: M.Popova, S. Silici, O. Kaftanoglu, V. Bankova ; 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition.*phytomedicine 12 (2005)221-228.*

[104]: Osmany Cuesta-Rubio, Anna Lisa Piccinelli, Mercedes Campo Fernandez, Ingrid Maã Rquez Hernaã Ndez, Aristides Rosado, et Luca Rastrelli. 2007. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 7502-7509.*

[105]: Javanmardi J.; Stushnoff C.; Locke E.; et Vivanco J. M. 2003. Antioxidant activity and total phenol content of Iranian Ocimum accession. *Food Chemistry, 101: 410 – 550.*

[106]: Marc F.; Davin A.; Deglene-Benbrahim L.; Ferrand C.; Baccaunaud M et Fritsch P. 2004. Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences, 54, 458 – 63.*

[107]: Amic D. ; Becol D et Trinaijsti N. 2003. Structure-Radical Scavenging activity relationships of Flavonoïdes. *Croatica Chemica Act, Original Scientific Paper 76 (1).*

[108]: Wang H.; Zhao M.; Yang B.; Jiang Y et Guohua R. 2008. Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chemistry. 163: 1399 – 1406.*

[109]: Mohammdi Z. 2004. Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Telmcen. Thèse de magistère, option : produit naturels, activités biologiques et synthèse.

[110]: Jiang Hong Chen et Chi-Tang Ho., 1997. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 2374-2378.*

[111]: Mok-Ryeon Ahn , Shigenori Kumazawa , Yumiko Usui , Jun Nakamura , Mitsuo Matsuka , Fang Zhu , Tsutomu Nakayama.,2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry 101 (2007) 1383–1392.*

[112]: Katalinic V., Milos M., Kulisic T et Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extract for antioxidant capacity and total phenol. *Food Chem, 94: 550 – 557.*

[113]: Jiang Hong Chen et Chi-Tang Ho., 1997. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 2374-2378.

[114]: Joaquim Fernando Mendes da Silva., Maria Clara de Souza, Samara Ramalho Matta, Marisol Ribeiro de Andrade, Flavia Vila Nova Vidal., 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry* 99 (2006) 431– 435.

[115]: waridel P. 2003. Investigation phytochimique des plantes aquatiques Potamogeton pectinatus L., P. lucens L. (Potamogetonaceae). *Thèse de doctorat, Université de lausanne.* Pp : 3 – 4.

[116] : Jean Adrian., Jacques Potus et Régine FRAGNE, 1995. La Science alimentaire de A à Z. Technique & Documentation, *Lavoisier, Paris.*

[117]: Wei Liang Qian. ; Zeeshan Khan. ; David G., Watson. ; James Fearnley. 2008. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* 21. 78 – 83.

[118] : Monpon B., Lemair B., Mengal P., et Surbled M. 1996. Extracyion des polyphénols : de laboratoire à la production industrielle. In « polyphénols 96 ». *Ed . Inra Bordeaux France.*

[119] : Arjun H Banskota, Yasuhiro Tezuka , I Ketut Adnyana, Kiyoshi Midorikawa, Katsushige, Dejair Message, Alfredo A.G. Huertas, Shigetoshi Kadota ., 2000. cytotoxique, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology* 72 (200) 239 – 246.

[120]: Ideize Barbosa da Silva., Maria Lucia Tiveron Todrigues., Eduardo Cesar Meurer., Vassia sbonkova ., Maria Cristina Marcucci., Marcos Nogueira Eberlin., Alexandra Helena Frankland Sawaya. 2006. Effet of maceration time on chemical composition of extracts of brasilian propolis. *Journal of apicultural research* 45 (3): 137 – 144.

[121]: Schimmerling P.; Sisson J. C.; et Zaidi A. 1998. Pratique des plans d'expériences, Technique et documentation. *Lavoisier* 61 – 438.

[122]: Goupy. J 2001. Introduction aux plans d'expérience. *Paris 2ème édition* 293.

[123] : J. M. Bobbitt, A. E. Schwarting et R. J. Gritter. Introduction à la chromatographie . 1968 by Reinhold Book Corporation. *Library of congress catalog Card Number: 69-22 841.*

[124]: Rezanejad, 2007. The effet of air pollution on microsporogenesis, Pollen develepeement and soluble pollen proteins in spartium junceum L.V.33, 183 – 191.



ANNEXES

1- Courbe d'étalonnage des protéines par la méthode de BRADFORD

concentration en B.S.A ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	DO 1	DO2	DO3
0	0	0	0
0,3	0,2	0,155	0,232
0,6	0,439	-	0,35
0,9	0,627	0,566	0,546
1,2	0,983	0,904	0,891
1,5	1,139	1,026	0,96

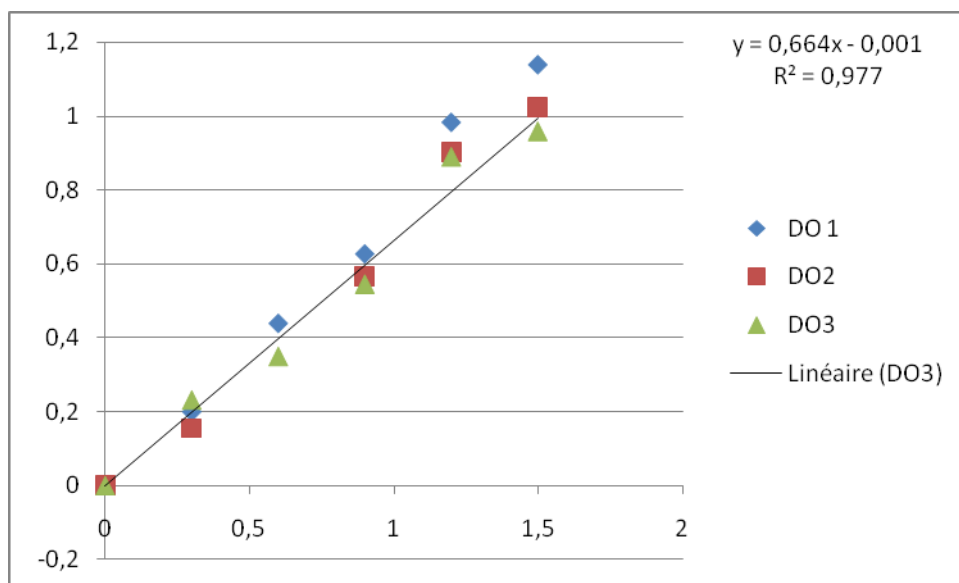


Figure 1 : courbe d'étalonnage des protéines

2- Courbe d'étalonnage des polyphénols

Acide gallique C(mg/ml)	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	0,0039	0,0019
DO	1,309	0,704	0,364	0,204	0,13	0,085	0,075	0,046

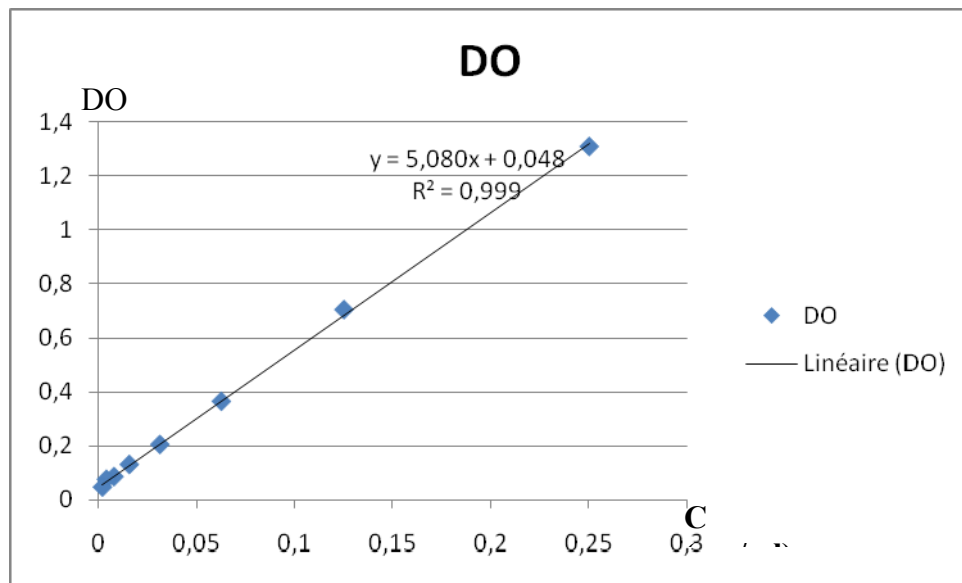


Fig. N°2 : Courbe d'étalonnage des polyphénols [DO = f (concentration en acide gallique)]

3- La courbe d'étalonnage des flavonoïdes

concentration de quercitine mg/ml	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625
DO	1,375	0,695	0,364	0,253	0,146	0,1	0,081

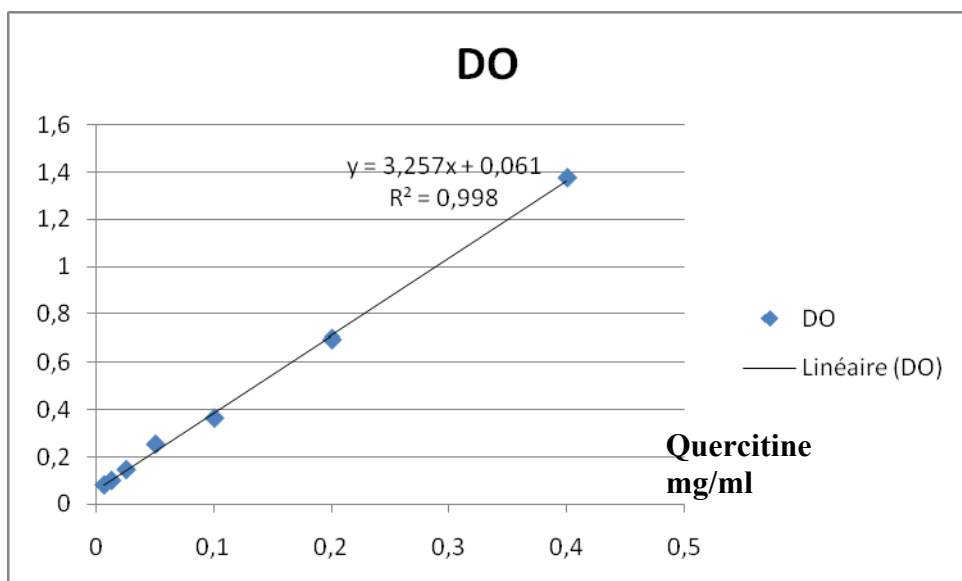


Fig. N°3 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes [DO = f(concentration en quercitine)]

4- Pouvoir réducteur de BHT

concentration en BHT(mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,0156	0,0078	0,0039
DO	1,646	1,59	0,864	0,486	0,363	0,297	0,125	0,077	0,07

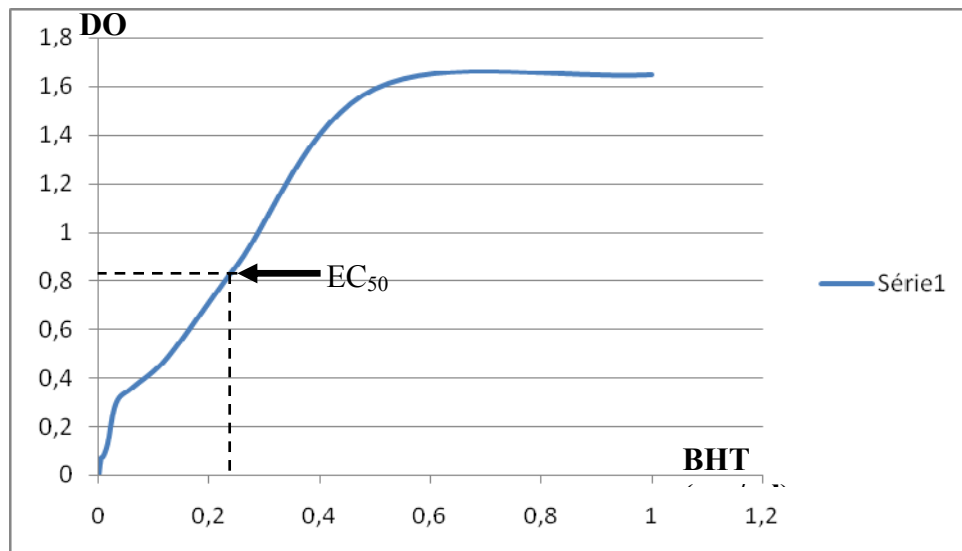


Fig.4 : la courbe de pouvoir réducteur de BHT

5- Courbe d'étalonnage de la vitamine C

concentration V.C (g/100ml)	0	0,005	0,01	0,015	0,02	0,03	0,035
DO	1,105	1,043	1,001	0,752	0,616	0,088	0,03

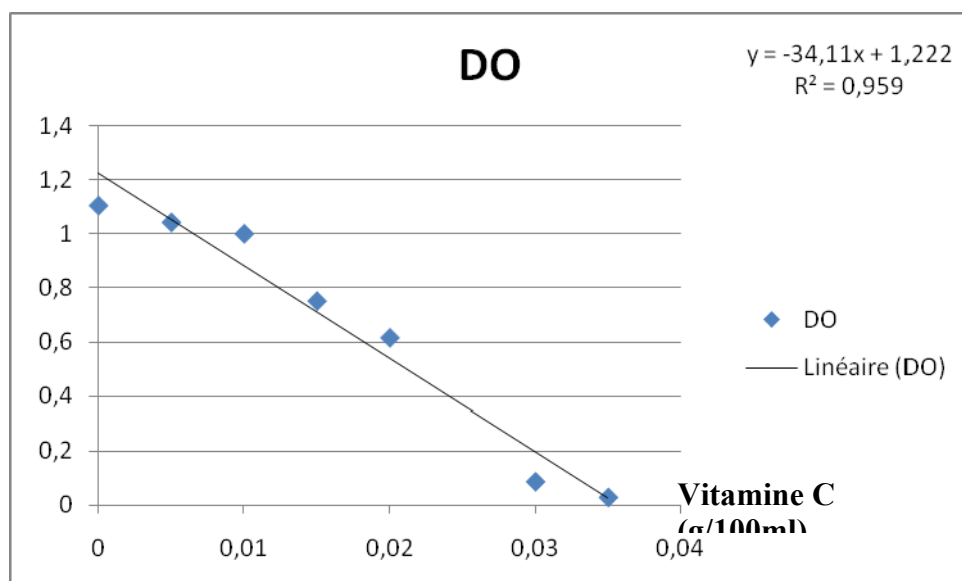


Fig.5 : Courbe d'étalonnage de la vitamine C

6- Courbe d'étalonnage pour les sucres totaux

Glucose (mg/ml)	0,010	0,009	0,008	0,007	0,006	0,005	0,004	0,003	0,002	0,001
DO	0,815	0,770	0,612	0,554	0,421	0,384	0,220	0,149	0,092	0,010

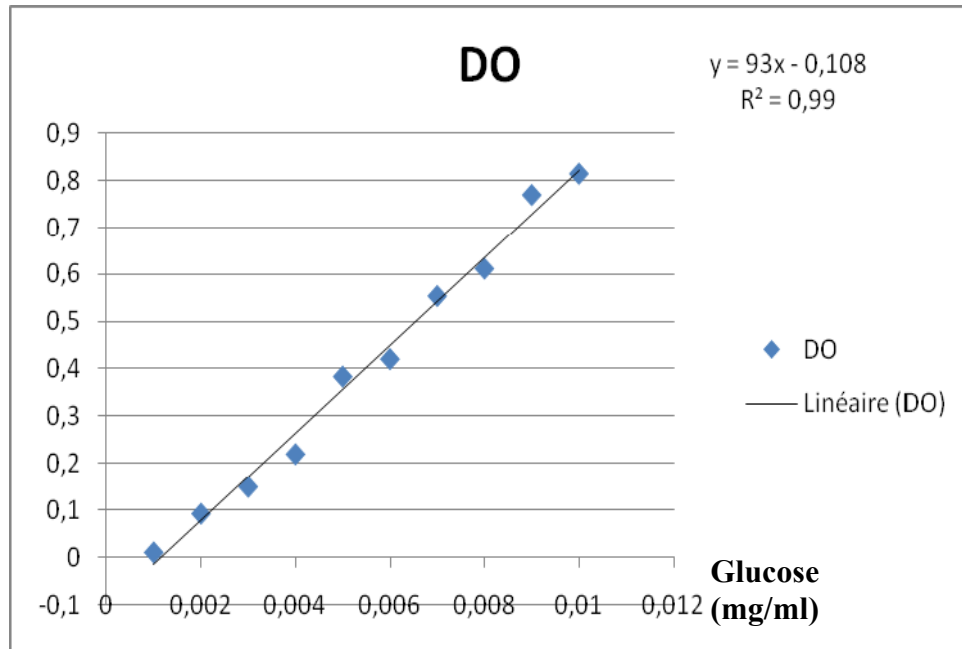


Fig.6 : courbe d'étalonnage des sucres totaux

7- courbe d'étalonnage des sucres réducteur

Glucose g/l	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
DO	0,016	0,222	0,453	0,667	0,878	1,107

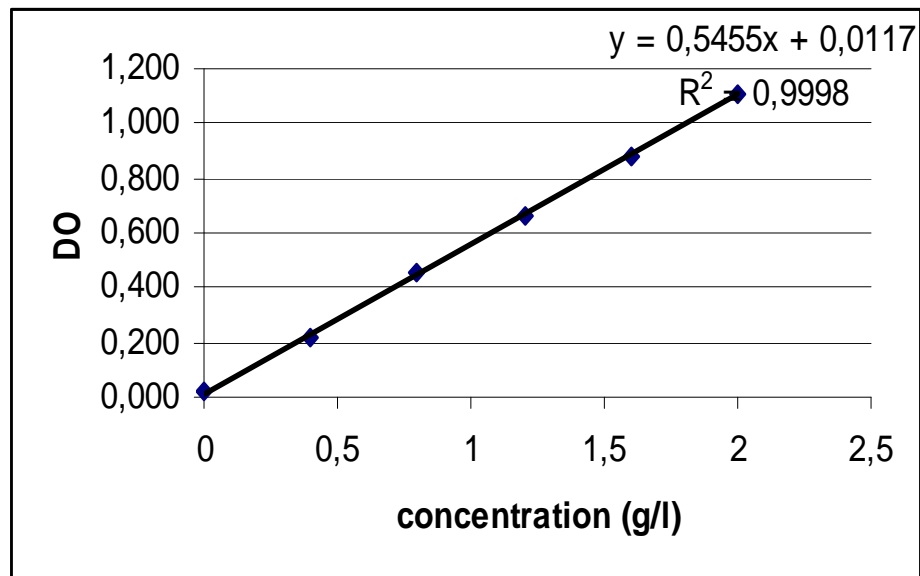


Fig.7 : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs

Matériel de laboratoire

Nous utilisant le matériel courant de laboratoire à savoir :

- Verreries courantes de laboratoire ;
- Etuve avec ventilation type MELAG 405 ;
- Balance analytique ;
- Plaque chauffante ;
- Thermomètre ;
- Burette graduée ;
- Fioles rodées ;
- Ballons ;
- Réfrigérants à reflux ;
- Bain thermostat ;
- Soxhlet ;
- Spectrophotomètre (JASCO V-530);
- Evaporateur type rota vapeur ;
- Fourre à moufle;
- pH mètre ;
- RMN ;
- Spectrophotométrie de flamme,
- Centrifugeuse (HERMLE / Z 323K) ;
- Papiers filtres.

Les réactifs utilisés

- l'Ethanol 95% ;
 - l'Ethanol 70% ;
 - Chloroforme ;
 - Acétone ;
 - Hexane ;
 - Propanole ;
 - Ether de pétrole ;
 - Méthanol ;
 - Phosphate de Sodium (pH =6.6) ;
 - Potassium ferricyaride ($K_3(FeCn_3)$) (1%) ;
 - Trichloracétique 10% ;
 - Ferrchloridrique ($FeCl_3$) ;
 - Acide gallique ;
 - réactif de Folin-Ciocalteu's ;
 - Carbonate de sodium ;
 - Trichlorure d'aluminium ;
 - La quircétine ;
 - La soude ;
 - Glucose ;
 - BSA.
-

Les plans de mélanges

Présentation générale

On parle de plan de mélange lorsque les facteurs du plan d'expérience sont les proportions de divers constituants dans un mélange. Ces types de plans sont très utilisés dans le cas de formulation d'un produit (alimentaire, chimique ou pharmaceutique, etc).

La particularité de ces plans par rapport aux autres plans réside dans le fait que les proportions des k constituants d'un mélange ne sont pas indépendantes. En effet, la proportion d'un constituant se déduit des proportions de $k - 1$ autres constituants. Si un utilisateur est confronté aux problèmes de la modélisation de la qualité d'un mélange en fonction de sa formulation, l'utilisation de plans spécifiques s'avère impératives.

Formulation d'un mélange

Les propriétés d'un mélange dépendent généralement de sa composition, et il est fréquent que l'on veuille traduire les variations d'une propriété en fonction de la concentration des divers constituants.

Soit un mélange de k constituants en proportion x_1, x_2, \dots, x_k et y , la propriété qui nous intéresse. Le problème se pose souvent en ces termes : quelle composition donnée au mélange pour que y satisfasse une spécification (par exemple, $y > y_{min}$) !

Une première démarche consiste à réaliser différents mélanges, à les tester jusqu'à ce que certains répondent au problème. Il faudra ensuite réaliser d'autres mélanges de compositions voisines pour voir dans quelle mesure nous pouvons faire varier les compositions sans sortir des spécifications.

Une autre démarche plus sûre et dans l'ensemble plus économe en nombre d'essais à faire, revient à traduire les variations de y en fonction de la composition du mélange par une relation

$$Y = f(x_i)$$

Cette relation devra être **validé**, c'est-à-dire traduire fidèlement les variations de y en fonction des x_i , et aussi **simple** que possible car le nombre des mélanges à réaliser croît avec la complexité de la relation. Lorsque nous disposons de cette équation, le tracé des courbes isoréponses donne la région des mélanges conformes à la spécification.

Représentation graphique d'un mélange

Lorsque k constituants sont en mélange, le domaine expérimental se situe dans un espace de dimension $k-1$, à cause de la contrainte sur la somme des constituants. Si on note x_i la proportion du constituant i dans le mélange, on a dans le cas le plus classique les contraintes suivantes :

$$x_i \geq 0 \quad \text{et} \quad \sum x_i = 1$$

Le domaine expérimental généré par ces contraintes est un simplexe régulier de dimension $k-1$.

➤ Représentation sur un segment de droite si $k = 2$

Si $k = 2$, le mélange est binaire. La variation de la composition du mélange est donnée dans la figure 1.

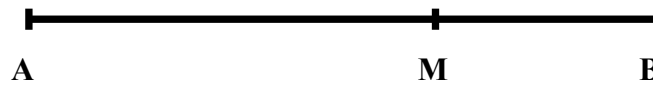


Fig. 1 présentation graphique d'un mélange binaire

Tout point M du segment AB est représentatif d'un mélange binaire :

- en A, le constituant A est seul dans le mélange,
- en B, le constituant B est seul dans le mélange,
- en M, x_1 , la proportion de A, x_2 , la proportion de B, sont telles que :

$$x_1 = \frac{MB}{AB} \quad \text{et} \quad x_2 = \frac{MA}{AB}$$

➤ Représentation à l'intérieur d'un triangle équilatéral si $k = 3$

Si $k = 3$, le mélange est ternaire. La variation de la composition du mélange est donnée par la figure 2

Les propriétés du triangle équilatéral assurent que pour tout point M intérieur au triangle, la somme des longueurs Mx_1 , Mx_2 , Mx_3 est égale à la longueur du côté du triangle.

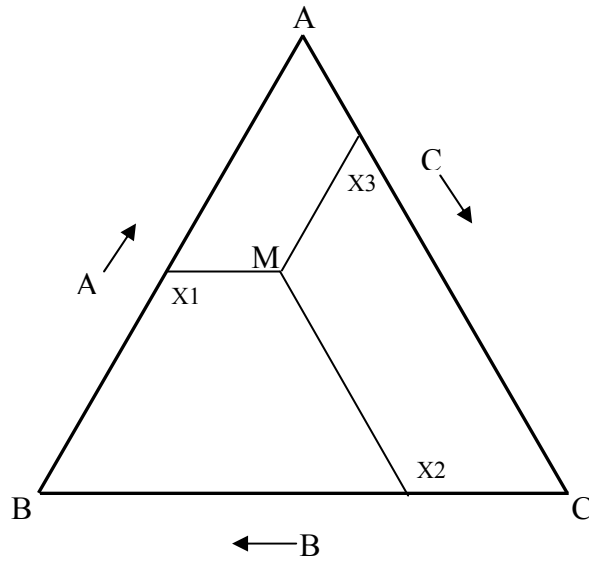


Fig.2 représentation graphique d'un mélange

Tout point du triangle ABC est représentatif d'un mélange ternaire.

- Le constituant pur A sera représenté au sommet A, de même pour les autres constituants.
- Sur le côté BC seront représentés les mélanges ne contenant pas de constituant A.
- Le mélange comportant : x_1 de A, x_2 de B et x_3 de C est représenté au point M.

➤ **Représentation à l'intérieur d'un tétraèdre régulier si $k = 4$**

Si $k=4$, le mélange est quaternaire. Il est représenté par un point dans un tétraèdre régulier dont les sommets sont les substances pures

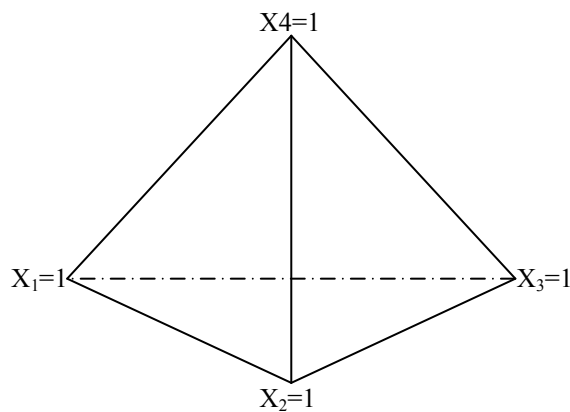


Fig. 3 représentation graphique d'un mélange quaternaire (hyper polyèdre)

Modélisation

Principe

Les facteurs influents x_1, x_2, \dots, x_k étant connus, nous cherchons à représenter par une équation les variations d'une réponse y en fonction de ces facteurs. L'intérêt d'une telle équation est, entre autres, de :

- Permettre de prévoir la réponse dans des conditions opératoires données,
- Servir de point de départ à une étude d'optimisation

Cas dans les mélanges

Lors de la phase de modélisation de la réponse en fonction des effets des constituants, les modèles polynomiaux utilisés en méthodologie de surfaces de réponse doivent être modifiés pour tenir compte des contraintes spécifiques aux mélanges : $\sum x_i = 1$

Scheffé a proposé une forme polynomiale, dite canonique, adaptée aux problèmes de mélanges. Dans le cas d'un mélange de k constituants, les formes canoniques des modèles polynomiaux s'écrivent respectivement :

- **Modèle du 1^{er} degré (modèle linéaire)**

$$Y = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_kx_k$$

- **Modèle du 2^{eme} degré (modèle quadratique)**

$$Y = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_kx_k + \sum_{i>j} a_{ij} x_i x_j$$

- **Modèle du 3^{eme} degré (modèle cubique)**

$$Y = \sum_i a_i x_i + \sum_{i<j} a_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k} a_{ijk} x_i x_j x_k$$

Analyse en composantes principales

Introduction :

La représentation brute de l'information conduit à des vecteurs de caractéristiques de grandes dimensions, ce qui peut poser des problèmes de complexité de calcul et de capacité de stockage. Ainsi, il est parfois préférable de chercher à réduire la dimensionnalité d'un problème de classification pour améliorer ses performances. Le mathématicien Bellman, père de la programmation dynamique, a introduit l'expression «malédiction de la dimensionnalité » (curse of dimensionality), pour signifier que représenter les formes par des vecteurs de taille importante est source de problème.

Il est évident que l'on se trouve d'emblée confronter à un problème de grande dimension. Plusieurs solutions sont préconisées dans la littérature pour réduire la taille de sa dimension. Telle que l'analyse en composantes principales.

Définition de l'analyse de la composante principale

L'ACP est une méthode très efficace pour l'analyse de données quantitatives (continues ou discrètes) se présentant sous la forme de tableaux à M observations / N variables.

Elle permet de :

- visualiser et analyser rapidement les corrélations entre les N variables,
- visualiser et analyser les M observations initialement décrites par N variables sur un graphique à deux ou trois dimensions, construit de manière à ce que la dispersion entre les données soit aussi bien préservée que possible,
- construire un ensemble de P facteurs non corrélés ($P \leq N$) qui peuvent ensuite être réutilisés par d'autres méthodes (la régression par exemple).

Principes de l'analyse en composantes principales

Dans le cadre de cette thèse, nous aborderons l'ACP comme une technique de réduction et de description des échantillons.

La théorie sous-jacente à l'analyse en composantes principales est vaste, nous ne passerons donc en revue que les points les plus importants. Du point de vue géométrique l'ACP consiste à effectuer une certaine rotation du repère des variables autour de leurs valeurs moyennes. Cette rotation transforme les n variables corrélées en l variables non corrélées. Notons que ce sont justement ces variables transformées que l'on a nommées les composantes principales.

Présentation des données

Lorsqu'on recueille des informations sur des *individus* ou *unités statistiques* (un individu, au sens statistiques du terme, peut être une personne physique, une entreprise, un pays ,etc.) , on aboutit à la constitution d'un *tableau individus-variables* du type suivant :

Individus	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	.	.	V _p
I ₁							
I ₂							
I ₃							
.							
.							
I _n							

Pour décrire ces données, si elles sont nombreuses, le statisticien traitera d'abord les variables une par une (*traitements univariés*), puis il s'intéressera aux éventuelles interactions entre deux variables (*traitement bivariés*) voire plus (*traitements multivariés*). Après *l'analyse descriptive* des données (où toutes les variables sont placées sur le même plan), il poursuivra dans certains cas par une *analyse explicative* (il y a alors d'une part la variable expliquée, d'autre part les variables explicatives).

Les données traitées en ACP

Soit X un tableau à n lignes et m colonnes. La ligne i décrit la valeur prise par m *variables quantitatives* pour l'individu i . Avant toutes choses, les données sont centrées et réduites, c'est-à-dire que chaque variable a une moyenne nulle et une variance égale à 1.

On note X_{ij} le vecteur-colonne constitué par les éléments de la colonne j ; x_{ij} désigne l'élément situé à l'intersection de la ligne i et de la colonne j , c'est-à-dire la valeur de la variable x_j pour l'individu i .

Pour observer sous un angle plus favorable les données contenues dans le tableau X , on remplace les anciens axes (donc les anciennes variables x_k) par de nouveaux axes (donc par des variables nouvelles C_k). Ces nouvelles variables C_k sont appelées *composantes principales*; elles s'expriment comme combinaisons linéaires des anciennes variables x_1, \dots, x_m .

$$C_k = a_{k1}x_1 + a_{k2}x_2 + \dots + a_{km}x_m$$

Les nouveaux axes, appelés *axes factoriels*, sont choisis de la façon suivante :

- le 1^{er} axe factoriel, ou *axe principal d'inertie*, est la direction de "plus grand allongement" du nuage (en statistiques on dit : "de plus grande dispersion" ou "de plus grande inertie" du nuage).

Lorsque on projette les points P_i du nuage sur cet axe, leurs projections H_i sont plus dispersées qu'elles ne le seraient sur n'importe quel autre axe. L'axe factoriel F_1 est donc l'axe selon lequel est préservé, par projection, le maximum de la dispersion initiale des points du nuage.

La nouvelle variable C_1 (la *composante principale n°1*) est le caractère selon lequel les individus se différencient le plus. Pourquoi ? Quelle signification peut bien avoir cette variable qui combine avec des poids plus ou moins importants (les coefficients a_i) les variables initiales mesurées sur les individus?

Une étape fondamentale de l'ACP est l'interprétation de cette composante principale, qui se fera par l'examen de sa combinaison avec les variables de départ. On espère toujours pouvoir détecter dans cette nouvelle variable un *caractère complexe*, qui n'est pas directement mesurable par une seule quantité, mais bien réel, comme par exemple la *santé* (pour des individus, pour des entreprises...), l'*industrialisation* (d'une région...), la *qualité du jeu d'attaque* (pour un joueur de football, de tennis...), la *compétence dans les matières quantitatives* (pour un étudiant), etc.

- le 2e axe factoriel est la 2e direction d'allongement du nuage, c'est-à-dire celle qui explique, après le 1^{er} axe, le maximum de l'inertie résiduelle. De plus le 2e axe est choisi orthogonal au 1er, ce qui traduit - comme nous le verrons - le fait que la 2e composante principale est non corrélée à la 1e (les vecteurs directeurs des 2 premiers axes ont un produit scalaire nul. Comme précédemment, on cherchera à donner un sens à cette 2e composante principale, en observant comment elle combine les variables de départ.
- et ainsi de suite, jusqu'à avoir remplacé les m anciens axes par m nouveaux axes (les axes factoriels), portant des parts décroissantes de la dispersion initiale et dont les 2, 3 ou 4 premiers suffisent souvent à donner une image à peine déformée du nuage initial. C'est cette image **réduite donc beaucoup plus accessible à notre observation** que nous examinerons pour décrire et analyser les données du tableau initial.

La démarche d'interprétation d'une ACP

Tenter de donner une signification aux nouveaux axes retenus pour l'analyse (les 2 ou 3 premiers, parfois 4), en les interprétant à partir des variables de départ. Pour ce la, on examine le nuage des points-variables, inscrit dans le cercle des corrélations.

- Les nouvelles variables, associées aux axes factoriels, sont appelées facteurs ou composantes principales. Elles s'expriment comme combinaisons linéaires des anciennes variables.

- Les coefficients de ces combinaisons linéaires sont fournis par le logiciel; c'est eux qui définissent les nouveaux axes :

- ils permettent de calculer les nouvelles coordonnées d'un point-individu à partir des anciennes

ils permettent également de voir le poids d'une ancienne variable dans la définition d'un facteur.

Le cercle des corrélations

Les points-variables

A chaque **point-variable**, on associe un point dont la **coordonnée** sur un axe factoriel est une mesure de la **corrélation** entre cette variable et le facteur. Dans l'espace de dimension p la distance des points-variables à l'origine est égale à 1. Donc par projection sur un plan factoriel les points-variables s'inscrivent dans un cercle de rayon 1 - le cercle des corrélations - et sont **d'autant plus proche du bord du cercle** que le point-variable est bien représenté par le plan factoriel, c'est-à-dire **que la variable est bien corrélée avec les deux facteurs** constituant ce plan.

L'angle entre 2 point-variables, mesuré par son cosinus est égal au coefficient de corrélation linéaire entre les 2 variables: $\cos \alpha = r(X_1, X_2)$

Ainsi :

- si les points sont très proches (α peu différent de 0) : $\cos \alpha = r(X_1, X_2) = 1$ donc

X_1 et X_2 sont très fortement corrélés positivement

- si α est égal à 90° , $\cos \alpha = r(X_1, X_2) = 0$ alors pas de corrélation linéaire entre X_1 et X_2

- si les points sont opposés, α vaut 180° , $\cos \alpha = r(X_1, X_2) = -1$: X_1 et X_2 sont très fortement corrélés négativement

Le cercle des corrélations permet de voir, parmi les anciennes variables, les groupes de variables très corrélées entre elles.

Les points-individus

La qualité de la représentation d'un point M par un axe U dépend de sa distance à l'axe dans le nuage, mesurée par l'angle (OM, U), ou plus exactement par son cosinus ou son \cos^2 . (S'il est proche de 1 le point est bien représenté).

La position d'un point-individu par rapport à un axe factoriel, ainsi que les proximités entre les individus, peuvent être interprétées dès lors que ces points sont bien représentés par le plan factoriel observé. Certains individus seront bien représentés par le plan 1-2 (les "très forts" ou "très faibles" en facteur 1 et 2 surtout), d'autres par le plan 1-3 s'ils sont mieux décrits par l'axe 3, etc