

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



## Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Filière : Biotechnologie

Thème :

*CARACTERISATION DE QUELQUES  
PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES ET  
BIOLOGIQUES DE LA GELEE ROYALE*

Réalisé par :

Melle LAYAZID Ahlam & Melle ASMANI Sarah

Devant le jury :

M <sup>r</sup> AMIR Y.	Professeur à l'UMMTO	Président
M <sup>r</sup> HARGAS H.	Maitre-Assistant (A) à l'UMMTO	Promoteur
M <sup>me</sup> BENAHMEDDJILALI A.	Maitre de conférence (A) à l'UMMTO	Copromotrice
M <sup>me</sup> HELLAL Z.	Maitre-Assistante (A) à l'UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2017/2018

## *Remerciements*

Au terme de ce modeste travail, nous remercions avant tout ALLAH de nous avoir gardés en bonne santé afin de mener à bien ce mémoire de fin d'études.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance.

Nos remerciements les plus sincères vont à notre promoteur Mr HARGAS Hamza Maitre-assistant à l'UMMTO, d'avoir accepté de nous encadrer, et pour sa simplicité, et sa gentillesse à notre égard.

Nos sincères remerciement vont à Mr AMIR Y Professeur à l'UMMTO d'avoir accepté de présider notre jury ainsi que Mme HELLAL Zohra Maitre assistante à l'UMMTO d'avoir bien voulu examiner notre travail.

Nous tenons à remercier spécialement notre Co-promotrice, Melle BENAHMEDDJILALI Adiba Maitre de conférence à l'UMMTO de nous avoir proposer et confier le thème de ce travail, mais aussi pour sa disponibilité et tous ses conseils avisés.

Nous désirions aussi exprimer notre reconnaissance à Mr BENGANA Abdenour et Mr BENGANA Mohamed qui ont participé activement à l'élaboration de notre mémoire en assurant la production et le financement d'une grande partie de nos échantillons.

Nous sommes reconnaissants également à Mr BELMOUNAH, directeur de l'unité de recherche de l'université de Boumerdes d'avoir réaliser l'analyse Rhéologique, Mr TAMIS responsable de l'unité ORGM de Boumerdes d'avoir réaliser l'analyse des minéraux et Mme MONA de Sidal d'Alger d'avoir réaliser l'analyse IR.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous le personnel du laboratoire commun d'analyse physicochimique et le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO de Tizi-Ouzou de nous avoir bien accueillis, pour leur aide et leur conseils.

Enfin nous tenons à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicaces*

*Je tiens à dédier ce mémoire de Master à mes parents A  
Mon frères, A mes sœurs, A mes amis sans exception Et  
à toutes les personnes qui m'ont encouragé à  
poursuivre mes études.*

**AHLAM**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à mes Parents qui ont œuvré pour  
ma réussite, de par leur amour, leur soutien et leurs  
précieux conseils, A mon frère, Et à toutes les personnes  
que j'aime et qui m'aiment, MERCI.*

**SARAH**

# *Table des matières*

# Table des matières

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Résumé**

<b>Introduction générale</b> .....	1
1. Synthèse bibliographique .....	2
1.1. L'apiculture .....	2
1.1.1. Définition.....	2
1.1.2. Situation de l'apiculture dans le monde .....	2
1.1.3. Situation de l'apiculture en ALGERIE.....	2
1.2. L'abeille .....	3
1.2.1. Classification .....	3
1.2.2. L'abeille domestique .....	3
1.2.3. Les Trois Castes.....	4
1.3. Les produits de l'apiculture.....	5
1.4. Gelée royale.....	7
1.4.1. Définition .....	7
1.4.2. Origine.....	7
1.4.3. Composition .....	8
1.4.4. Récolte.....	11
1.4.5. Conservation.....	12
1.4.6. Propriétés de la gelée royale.....	13
1.4.6.1. Propriétés biologiques.....	13
1.4.6.2. Propriétés pharmacologiques.....	13
2. Matériel et méthodes .....	16

2.1. Matériel biologique.....	16
2.1.1. Gelée royale fraiche .....	16
2.1.2. Gelée royale lyophilisée.....	17
2.1.3. Micro-organismes testés .....	17
2.2. Matériel chimique et appareillage (Annexe 2) .....	17
2.3. Méthodes d'analyse .....	17
2.3.1. Analyse phytochimique .....	17
2.3.2. Analyses physico-chimiques de la gelée royale.....	20
2.3.3. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	30
3. Résultats et discussion.....	32
3.1. Résultats d'analyse phytochimique .....	32
3.2. Résultats de l'analyses physicochimiques .....	34
3.2.1. Résultats du pH.....	34
3.2.2. Résultats de l'Humidité.....	35
3.2.3. Résultats des cendres. ....	36
3.2.4. Résultats de l'Acidité.....	37
3.2.5. Résultats de l'Acide ascorbique.....	38
3.2.6. Résultats des sucres.....	39
3.2.7. Résultats des PPT.....	40
3.2.8. Résultats des Flavonoïdes .....	42
3.2.9. Résultats des minéraux .....	43
3.2.10. Résultats de la viscosité .....	44
3.2.11. Résultats de l'analyse des groupements fonctionnels par IR.....	45
3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	48
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>51</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

# Liste des Abréviations

**GR** : Gelée royale

**GR(A)** : Gelée royale d'abeilles nourries de sucre 2017

**GR(N)** : Gelée royale d'abeilles nourries de sucre 2018

**GR(D)** : Gelée royale d'abeilles nourries de sirop de dattes

**GR(Nect)** : Gelée royale d'abeilles nourries de Nectar

**MH** : Mueller Hinton

**EE** : Extrait Éthanoïque de la gelée royale lyophilisée

**EA** : Extrait Aqueux de la gelée royale lyophilisée

**ATCC**: American Type Culture Collection

**MRJP**: Major Royal Jelly Protein

**10-H2DA**: Acide 10-hydroxy-2-décénoïque

**IL-6**: Interleukine-6

**IL-1**: Interleukines-1

**LPS**: Lipopolysaccharides

**TNF- $\alpha$** : Tumor necrosis factor- $\alpha$

**IFN- $\gamma$**  : Murine recombinant interferon- $\gamma$

**Pro RJ**: Protease N treated royal jelly

**ACE**: Angiotensine I-converting enzyme

**VEGF**: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

**DHEA-S**: Dehydroepiandrosterone sulfate

**3 $\beta$ -HSD2**: 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 2

**17 $\beta$ -HSD3** : 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 3

*E. coli* : *Escherichia coli*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

**EtOH** : Ethanol

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**PPT** : polyphénols totaux

**ATB** : Antibiotique

**N30** : Néomycine30

**O30** : Oxytétracycline30

**CTX30**: Céfotaxime30

**AX25**: Amoxicilline25

**S**: Streptomycine

**HPLC**: High pressure liquid chromatography

## Liste des Figures

<b>Figure 01</b> : Larve baignant dans la gelée royale. ....	7
<b>Figure 02</b> : Glandes salivaires et hyopharyngienne de l'abeille ouvrière .....	8
<b>Figure 03</b> : Composition chimique de la gelée royale.....	9
<b>Figure 04</b> : Etapes de récolte de la gelée royale.....	12
<b>Figure 05</b> : Diagramme de dosage des PPT .....	27
<b>Figure 06</b> : Etapes de dosage des flavonoïdes.....	28
<b>Figure 07</b> : Viscotester VT 550.....	29
<b>Figure 08</b> : Aspect des extraits aqueux et éthanoliques de GR lyophilisée. ....	30
<b>Figure 09</b> : pH des quatre gelées royales fraîches.....	34
<b>Figure 10</b> : Humidité des quatre gelées royales fraîches.....	35
<b>Figure 11</b> : Taux de cendres des quatre gelées royales fraîches. ....	36
<b>Figure 12</b> : Valeurs de l'acidité des gelées fraîches analysées.....	37
<b>Figure 13</b> : Valeurs d'acide ascorbique des trois gelées royales fraîches (GR(A), GR(N), GR(Nect)).....	38
<b>Figure 14</b> : Le pourcentage des sucres chez les trois gelées royales fraîches : GR(A), GR(N), GR(Nect). ....	39
<b>Figure 15</b> : Concentrations en PPT des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales fraîches GR(A), GR(N), GR(Nect).....	40
<b>Figure 16</b> : Concentrations en flavonoïdes des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales étudiées. ....	42
<b>Figure 17</b> : Courbes d'évolution de la viscosité et de la contrainte des quatre gelées royales fraîches. ....	44
<b>Figure 18</b> : Spectres d'absorption des trois gelées royales lyophilisées .....	46
<b>Figure 19</b> : Résultat en photos de l'antibiogramme d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 et <i>S. aureus</i> ATCC 43300 vis-à-vis les antibiotiques (N30, O30, CTX30, AX25, S). ....	48

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I:</b> Classification de l'abeille domestique.....	<b>3</b>
<b>Tableau II:</b> Caractéristiques des trois castes.....	<b>4</b>
<b>Tableau III:</b> Les produits de l'apiculture.....	<b>5</b>
<b>Tableau IV :</b> Les informations sur les quatres echantillons de gelées royales fraiches .....	<b>17</b>
<b>Tableau V :</b> Résultats du screening phytochimique de la gelée GR(A) fraiche .....	<b>32</b>
<b>Tableau VI:</b> Teneur en minéraux des trois gelées royales lyophilisées : GR(A), GR(N), GR(Nect).....	<b>43</b>
<b>Tableau VII :</b> Principales bandes d'absorption des groupements fonctionnels présents dans les trois gelées royales (GR(A), GR(N), GR(D)) identifiés par spectroscopie infrarouge.....	<b>47</b>
<b>Tableau VIII:</b> Diamètres des zones d'inhibition des extraits des gelées lyophilisées vis-à-vis de <i>E.coli</i> ATCC 25922 et <i>S.aureus</i> ATCC 43300.....	<b>49</b>
<b>Tableau IX:</b> Diamètres des zones d'inhibition pour l'ensemble des GR fraiches vis-à-vis de <i>E.coli</i> ATCC 25922et <i>S.aureus</i> ATCC 43300. ....	<b>49</b>



# *Résumé*

### Résumé

Le présent travail consiste en l'évaluation de l'effet de la nutrition des abeilles sur la composition de la gelée royale ainsi qu'en la détermination de leur effet antibactérien vis-à-vis de deux souches bactériennes.

L'approche expérimentale comporte une partie physicochimique est faite sur un total de quatre échantillons de gelées royales fraîches qui ont été récoltés dans la commune de NACERIA, et une partie microbiologique qui est basée sur l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces dernières, et de 2 extraits aqueux (DMSO) et éthanolique (Ethanol) de ces quatre gelées royales après lyophilisation.

Les résultats trouvés montrent que les paramètres physicochimiques suivant : pH, l'acidité, le taux de cendres, l'humidité, Acide Ascorbique, la viscosité et les groupements fonctionnels des quatre gelées royales fraîches présentent des similarités importantes. Cependant le teneur en sucres, les quantités en polyphénols et en flavonoïdes et les éléments minéraux trouvés sont différents entre ces mêmes gelées.

Les deux souches testées *S.aureus* et *E.coli* n'ont montré aucune sensibilité vis-à-vis des deux extraits de gelées royales lyophilisées.

En outre, Nous avons constaté que les deux gelées royales fraîches issues d'abeilles nourries en sirop de sucre : GR(A) et GR(N) et en nectar GR(Nect) ont présenté une activité sur la souche *S. aureus* mais pas sur *E. coli* avec des diamètres de zone d'inhibition de 2mm, 7mm et 11mm respectivement, à l'exception de la gelée royale nourrie de sirop de dattes GR(D) qui n'a eu aucun effet sur les souches testées.

À partir de ces résultats, le type de la nutrition des abeilles pourrait influencer sur la composition de la gelée royale.

**Mots clés :** Activité antimicrobienne, gelée royale, nutrition, paramètres physicochimiques.

### Abstract

The present work consists in evaluating the effect of bee nutrition on the composition of royal jelly and in determining their antibacterial effect on two strains.

The experimental approach includes a physicochemical part that is made on a total of four fresh royal jelly samples that were collected in the commune of NACERIA, and a microbiological part that is based on the evaluation of their antibacterial activity, and two extracts (DMSO and Ethanol) of the four royal jellies after lyophilization.

The results found show that the following physicochemical parameters: pH, Acidity, Ash content, moisture, Ascorbic Acid, Viscosity and functional groups of the four fresh royal jellies have important similarities. However, the levels of sugars, the amounts of polyphenols and flavonoids and the mineral elements found are different between these same jellies.

Both strains tested *S. aureus* and *E. coli* showed no sensitivity on the two lyophilized royal jelly extracts.

In addition, we found that the two fresh royal jellies from sugar syrup fed bees: GR (A), GR (N) and Nectar GR (Nect) showed activity on the *S. aureus* strain but not on *E. coli* with inhibition zone diameters of 2mm, 7mm and 11mm respectively, with the exception of royal jelly fed date syrup GR(D) which had no effect on the strains tested.

From these results, the type of bee nutrition could influence the composition of royal jelly.

**Key Word:** antibacterial activity, Nutrition, physicochemical characterization, Royal Jelly.

***Introduction***  
***générale***

### Introduction générale

Parmi tous les insectes qui butinent les fleurs, les abeilles représentent un pourcentage de 90%, ce sont d'ailleurs les principaux insectes récolteurs de pollen que l'homme puisse élever et exploiter à des fins économiques (BIRI, 2002). Elles sont donc essentielles au maintien d'une biodiversité végétale très importante pour l'humanité (PETERSON, 2008).

En effet, l'importance des abeilles ne réside pas seulement dans le fait qu'elles sont des insectes pollinisateurs, mais également, ses produits précieux (miel, gelée royale, pollen, propolis, cire...) connus pour leur action sur la santé et la jeunesse grâce à leur richesse en composés phénoliques (notamment les flavonoïdes), en minéraux, en vitamines ...

La gelée royale est une sécrétion produite par des glandes situées dans la tête des abeilles ouvrières, et particulièrement actives chez les abeilles dites « nourrices » qui ont entre 5 et 14 jours, c'est la nourriture fournie à toutes les jeunes larves, aussi bien d'ouvrières que de faux bourdons pendant les trois premiers jours de leur vie. Puis, ces larves seront nourries d'un autre aliment, tandis que celles qui deviendront des reines continuent à recevoir la gelée royale (BIRI, 2002).

De nombreuses analyses chimiques de la gelée royale ont été publiées au fil des ans. Ce n'est que récemment, cependant, que des technologies très raffinées ont analysées de manière détaillée la composition inhabituelle et la complexité de cette substance quelque peu acide (pH de 3,6 à 4,2). Les principaux constituants de la gelée royale sont l'eau, les protéines, les sucres, les lipides et les sels minéraux (KRELL, 1996).

La nourriture de l'abeille peut être un facteur influençant sur la composition de la gelée royale qui peuvent à leur tour affecter les propriétés biologiques et pharmacologiques de cette dernière, à titre d'exemple l'alimentation artificiel en sucre influence sur la composition de sucre de la gelée royale (SESTA *et al.*, 2006).

A cette effet nous avons fixé pour objectif principal l'étude de l'influence de la nutrition des abeilles sur la composition de la gelée royale. Pour ce faire nous avons procédé à une caractérisation de quelques paramètres physicochimique de quatre échantillons de gelée royale nourries différemment (sucre, nectar, ou sirop de dattes), ainsi qu'une évaluation de leur activité antibactérienne vis-à-vis de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

*Synthèse  
bibliographique*

### **1. Synthèse bibliographique**

#### **1.1. L'apiculture**

##### **1.1.1. Définition**

Activité agricole qui permet d'obtenir, grâce à l'élevage des abeilles, des produits directs (miel, pollen, gelée royale, propolis, cire, venin, etc.) et indirects (accroissement de la production agricole grâce à la pollinisation des fleurs par les abeilles) (BIRI, 2011).

##### **1.1.2. Situation de l'apiculture dans le monde**

Des efforts sont faits dans le monde entier pour encourager l'apiculture à petite échelle, afin d'aider les populations à consolider leurs moyens d'existence et assurer la stabilisation de l'habitat et de la biodiversité (BRADBEAR, 2005).

L'Europe centrale possède de très solides structures dans le domaine de l'apiculture pratique comme dans celui des sciences apidologiques, à l'exemple des professeurs Ernst von Siebold et Rudolf Leuckart (1804-1898) qui ont apporté la confirmation scientifique de la théorie de Johann Dzierzon sur la parthénogénèse des abeilles, et le chimiste suisse Adolf von Planta (1820-1895) qui a donné les premières analyses détaillées du miel et de la gelée royale.

Aux Etats-Unis, dès 1885, c'est le ministre de l'agriculture des Etats Unis qui a nommé un agent spécialisé en apiculture à la division d'entomologie à Beltsville près de Washington. En 1940, les Etats-Unis disposent d'une recherche apicole structurée et de laboratoire dotés de bons moyens matériels et dirigés par des chercheurs de grande valeur.

En Grande-Bretagne, il existe dans la population un intérêt très vif pour les abeilles et leur élevage, c'est en 1949 que la Bee Research Association est devenue plus tard internationale et qui représente à l'heure actuelle dans le monde entier l'organisation la plus efficace en matière de documentation scientifique et technique dans le domaine de l'apiculture et de l'apidologie (LOUVEAUX, 1996).

##### **1.1.3. Situation de l'apiculture en ALGERIE**

L'ALGERIE possède des grandes aptitudes à développer la filière apicole, qui résident dans les potentialités mellifères abondantes et variées notamment au nord, le climat est favorable sans oublier la présence d'une race d'abeille possédant un potentiel génétique intéressant (BERKANI, 2008).

## 1.2. L'abeille

### 1.2.1. Classification

D'après la classification de Linné, les abeilles appartiennent à l'ordre des Hyménoptères (qui comprend au moins 250 000 espèces et inclut presque tous les insectes sociaux sauf les termites), à la superfamille des Apoïdes, et à la famille des Apidés. Ces derniers renferment environ 20 000 espèces d'abeilles dont la majorité sont des espèces solitaires. Les Apidés à leur tour sont divisés en quatre tribus dont celle des Apini qui inclut le genre *Apis*. Ce dernier comprend plusieurs espèces dont l'abeille domestique, *Apis mellifera* (PHILIPPE, 2007).

### 1.2.2. L'abeille domestique

Le nom scientifique de cet insecte a subi quelques modifications. (Linné 1761), change le nom d'espèce d'*Apis mellifera* en *Apis mellifica*. Généralement, le miel étant préparé par les abeilles (melli-fica) plutôt que récolté (melli-fera) (GHARBI, 2011) (Tableau I).

*Apis mellifica* est l'espèce dont les diverses races sont élevées pour produire du miel, du pollen, de la gelée royale, de la propolis, de la cire et, dans certains cas, du venin (RAVAZZI, 2007).

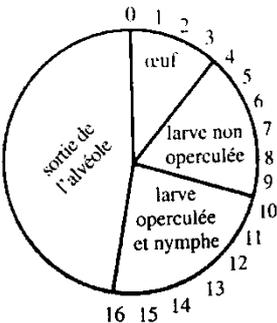
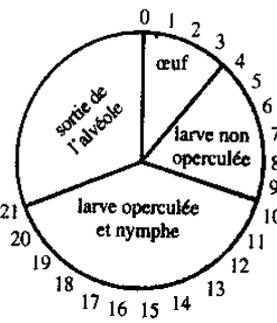
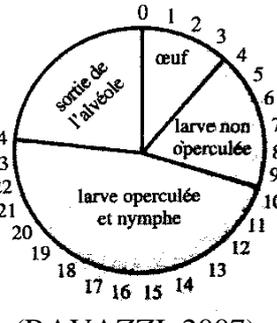
**Tableau I:** Classification de l'abeille domestique (GHARBI, 2011).

<b>Règne</b>	Animal
<b>Embranchement</b>	Arthropode
<b>Classe</b>	Insecte
<b>Ordre</b>	Hyménoptères
<b>Sous-Ordre</b>	Apocrites
<b>Infra-Ordre</b>	Aculéates
<b>Super-famille</b>	Apoïdea
<b>Famille</b>	Apidés
<b>Genre</b>	<i>Apis</i>
<b>Espèce</b>	<i>Apis mellifica</i> , (Linné 1761) = <i>Apis mellifera</i> , (Linné 1758)

1.2.3. Les Trois Castes

Une colonie d'abeille regroupe des individus de trois castes différentes (Tableau II), elle se compose d'une reine, de plusieurs dizaines de milliers d'ouvrières; et de quelques milliers de males (LE CONTE, 2002).

Tableau II: Caractéristiques des trois castes.

Définition	Morphologie	Cycle évolutif
<p>Reine: Seule mère de l'ensemble de la colonie, la reine se différencie par sa taille plus grande : et par la forme de son abdomen, plus allongé. Nourrie à l'état de larve exclusivement avec de la gelée royale, elle peut vivre quatre à cinq ans. Sa principale activité consiste à pondre (CLEMENT, 2009).</p>	 <p>(ANONYME 1)</p>	 <p>(RAVAZZI, 2007)</p>
<p>Les ouvrières : femelles incomplètes, remplissent toutes les tâches domestiques, depuis la plus noble à nos sens, telle la garde des larves, jusqu'à la plus commune, comme le nettoyage de la ruche. Le caractère le plus fascinant est qu'elles se divisent les tâches au sein de la colonie (JEAN-PROST, 2005).</p>	 <p>(ANONYME 1)</p>	 <p>(RAVAZZI, 2007)</p>
<p>Males : sont généralement appelés faux bourdon. Le faux bourdon naît vingt-quatre jours après la ponte d'un œuf non fécondé qui ne donnera naissance qu'à des mâles, qui peuvent vivre près de trois mois (CLEMENT, 2009).</p>	 <p>(ANONYME 1)</p>	 <p>(RAVAZZI, 2007)</p>

1.3. Les produits de l'apiculture

Tableau III: Les produits de l'apiculture.

Les produits de l'Apiculture	Définition	Composition	Propriétés
 <p>Miel</p>	<p>le miel est une substance sucrée et parfumée produite par les abeilles, à partir du nectar des fleurs, qu'elles récoltent dans leur jabot et entreposent dans les alvéoles de la ruche (DUBOIS <i>et al.</i>, 1986).</p>	<p>-Eau 17,2% ;            Sucres (trisaccharides 1,5%, maltose 7,31 %, saccharose 1,31%, glucose 31,28%, fructose 38,19%) ;            -Eléments mineurs 3,1% (minéraux, acides aminés, vitamines....).            (BRUNEAU, 2002).</p>	<p>-Propriétés antibiotiques ;            -Traite les brulures et les plaies ;            -Utilisé en Cosmétique (PETERSON, 2008) ;            -Augmente le teneur du sang en hémoglobine et la vigueur musculaire ;            -Facilite la rétention du calcium (JEAN-PROST, 2005).</p>
 <p>Pollen</p>	<p>Substance finement poudreuse récoltée par les abeilles sur les étamines des fleurs, mise en réserve et utilisée pour nourrir le couvain (PETERSON, 2008).</p>	<p>-Eau 10% ;            -Protides 11 à 35% ;            -Glucides 20 à 40% ;            -Lipides 1 à 20% ;            -Matières minérales 1 à 7% ;            -Vitamines A, B, C, D,            (JEAN-PROST, 2005).</p>	<p>-Excellent complément alimentaire ;            -Accroît les défenses immunitaires ;            -Combat l'hypertension ;            -Action régulatrice des fonctions intestinales ;            -Vertus euphorisantes et antidépressives (RAVAZZI, 2007).</p>
 <p>Propolis</p>	<p>Il s'agit de résines ou de gommes visqueuses et imperméables à l'eau que les butineuses vont récolter sur les bourgerons d'arbres (JEAN-PROST, 2005).</p>	<p>-Résines et baumes 55% ;            -Huiles essentielles 7% ;            -Cire 30% ;            -Pollen 3% ;            -Divers 5%            (BRUNEAU, 2002).</p>	<p>-Bactéricide ;            -Anti-oxydante ;            -Fongicide ;            -Cicatrisante ;            -Lutte contre les affections des voies respiratoires et troubles digestifs (RAVAZZI, 2007).</p>
 <p>Cire</p>	<p>Sécrétion glandulaire utilisée par les abeilles pour fabriquer les rayons dans lesquels elles élèvent le couvain et mettent en réserve le miel et le pollen (PETERSON, 2008).</p>	<p>-Hydrocarbones 14% ;            -Esters 52% ;            -Hydroxymonoesters 4% ;            -Hydroxypolyesters 8% ;            -Esters acides 2% ;            -Polyesters acides 2% ;            -Acides libres 12% ;            -Alcools libres 1%            (BRUNEAU, 2002).</p>	<p>-Bactériostatique, émolliente, antiinflammatoire et cicatrisante (JEAN-PROST, 2005) ;            -Conception de bougies (PETERSON, 2008);</p>

 <p>Venin</p>	<p>Liquide incolore, à réaction acide, de saveur légèrement amère, à l'arôme caractéristique (BIR I, 2002).</p>	<p>-Eau 88% ; -Acides aminés, phospholipides et des glucides 20% ; -Amines 2% ; -Polypeptides 50% (JEAN-PROST, 2005).</p>	<p>-Vasodilatatrices ; -Anticoagulantes ; -Cardiotoniques et révulsives (RAVAZZI, 2007); -Traite les arthrites (PETERSON, 2008).</p>
--	---	---	--

## **1.4. Gelée royale**

### **1.4.1. Définition**

La norme ISO définit la gelée royale comme un mélange de sécrétions de glandes hypopharyngiennes et mandibulaires d'abeilles ouvrières, sans aucun additif, et précisément : Elle constitue la nourriture des reines au stade larvaire et au stade adulte. Il s'agit d'un aliment brut et naturel, non transformé (hormis la filtration) et exempt d'additifs. La couleur, le goût et la composition chimique de la gelée royale sont déterminés par l'absorption et la transformation par les abeilles nourries avec les deux types d'aliments suivants pendant la période de production de gelée royale :

-type 1 : uniquement les aliments naturels de l'abeille (pollen, nectar et miel);

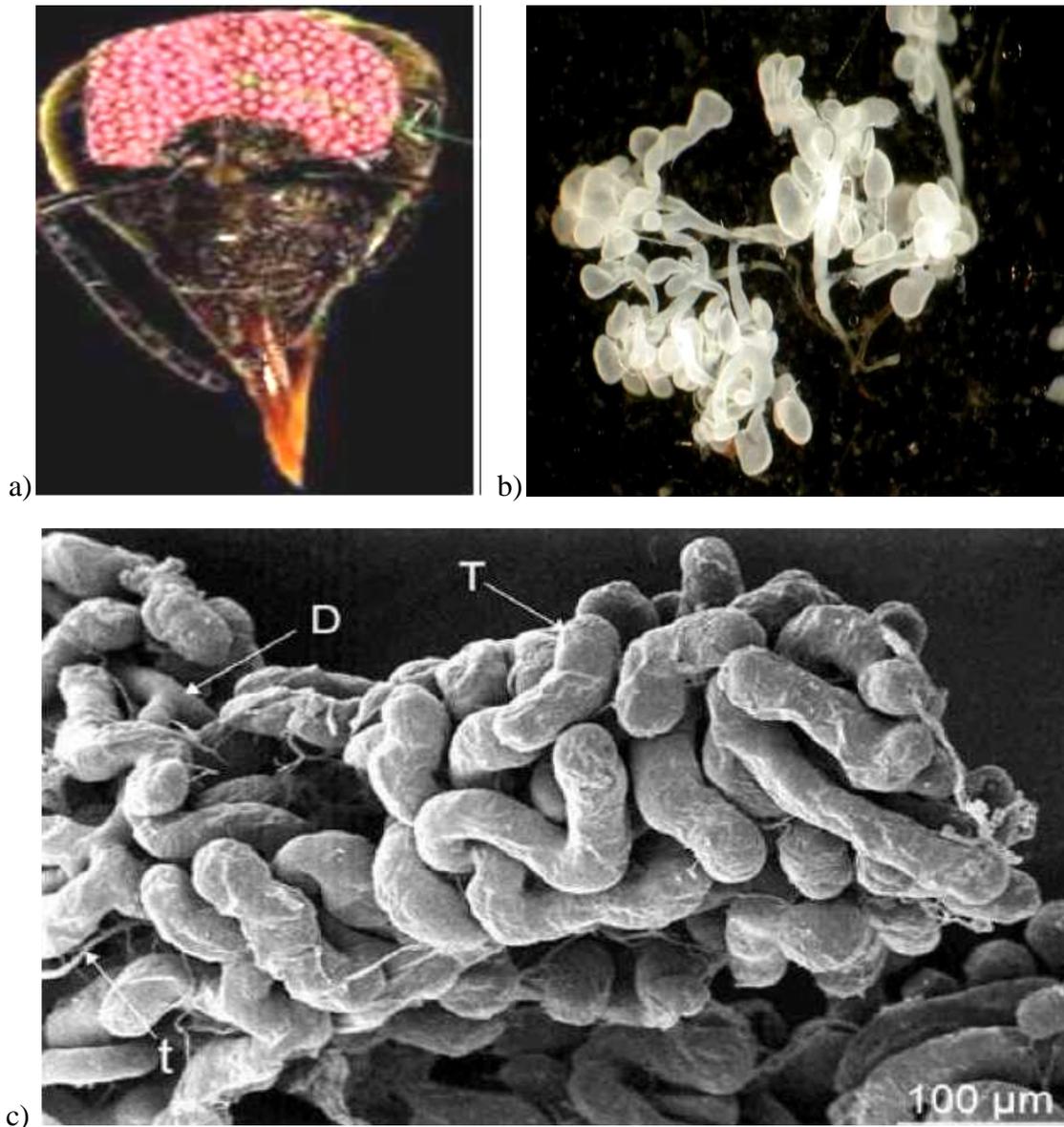
-type 2 : les aliments naturels de l'abeille et d'autres nutriments (protéines, hydrates de carbone, etc.).



**Figure 1** : Larve baignant dans la gelée royale (ANONYME 2).

### **1.4.2. Origine**

La gelée royale (GR) est le produit de la sécrétion des glandes hypopharyngiennes (Figure 2, a) (sécrétion claire) et des glandes mandibulaires (sécrétion blanche) des ouvrières âgées généralement de 5 à 15 jours, lorsqu'elles disposent de pollen, d'eau, de miel et, dans leur ruche, à une température convenable. La sécrétion des glandes labiales céphaliques (Figure 2, b) pourrait participer aussi à la formation de la GR (RAVAZZI, 2007).

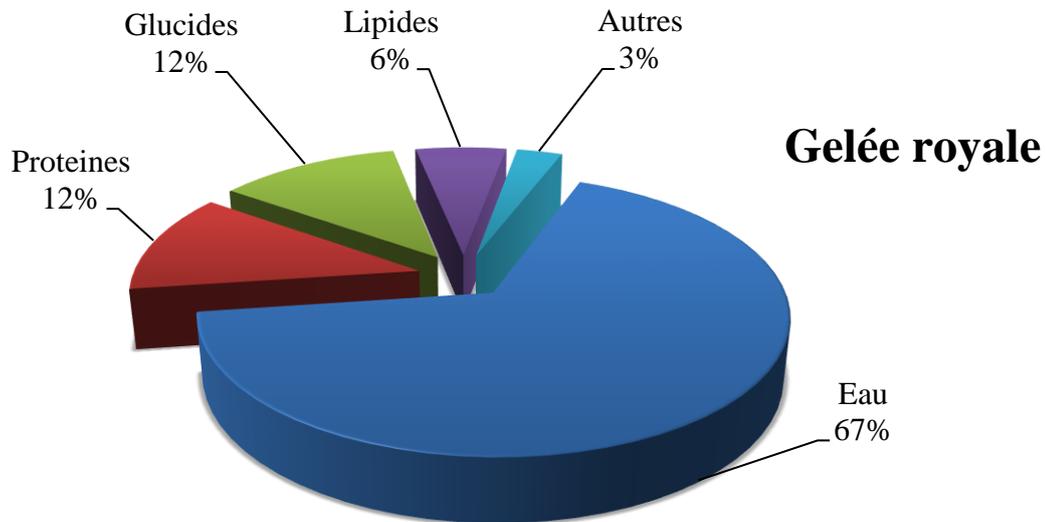


**Figure 2 :** Glandes hyopharyngienne et salivaires (labiales) de l'abeille ouvrière vue au MEB (MATEESCU, 2016 et ANONYME 3)

a) Glande hypopharyngienne b) Glande labiale céphalique c) Glande labiale thoracique

### 1.4.3. Composition

La composition de la gelée royale est différente suivant qu'elle est destinée aux larves d'abeilles ouvrières ou aux larves de reines et dépend également de la race des abeilles la produisant (RIGAL, 2012). La composition de la gelée royale la plus fréquemment citée est la suivante (Figure 3).



**Figure 3 :** Composition chimique de la gelée royale (CLEMENT, 2009).

L'International Honey Commission a publié en 2009 un article concernant la standardisation de la composition de la gelée royale en vue de l'élaboration de normes applicables à l'échelle internationale et en se basant sur des analyses de gelée royale provenant de plusieurs pays (SABATINI *et al.*, 2009) :

- **Teneur en eau**

La teneur en eau est assez uniforme, supérieure à 60%.

- **Glucides**

Les glucides présents dans la GR sont assez constants d'un point de vue qualitatif mais il existe une grande variabilité quantitativement parlant (leur teneur varie entre 9 et 17%) (AMIGOU, 2016). Les principaux glucides sont les monosaccharides fructose et glucose. Ils représentent souvent plus de 90% de la teneur en glucides ; le fructose étant toujours majoritaire. Le saccharose est toujours présent mais souvent à des concentrations très variables. On peut également retrouver des oligosaccharides tels que le tréhalose, le maltose, le gentiobiose, isomaltose, raffinose, erlose, mélézitose (SABATINI *et al.*, 2009).

- **Protéines**

La GR est très riche en protéine, en peptides et en acides aminés qui représentent entre 9 et 18% de la composition totale (SABATINI *et al.*, 2009).

La gelée royale contient un grand nombre de protéines natives et de dérivés protéiniques, dominé par 4 familles de protéines majeures de haut poids moléculaire. Ces protéines majeures de la GR (MRJP, pour Major Royal Jelly Protein) représentent plus de 80 % de la masse totale des protéines. Parmi les protéines majeures de la GR, l'apalbumine (MRJP 1) et MRJP 2 se manifestent au niveau du cerveau (les centres de mémoire) de l'abeille adulte. Un petit peptide l'apisimine au poids moléculaire de 5540,4 Da a été identifié au niveau de cerveau des abeilles nourrices et butineuses (MATEESCU, 2016).

La royalisine est l'une des protéines présentes dans la GR aux cotés des apalbumines précédemment décrites. La seule source connue à ce jour de la royalisine est la gelée royale. La royalisine appartient à la famille des defensines, c'est le groupe de protéines antimicrobiennes le plus important chez les insectes.

D'autres peptides exclusivement retrouvés dans la gelée royale existent, ils appartiennent à la famille des jelleines, on en distingue 4 numérotés de I à IV (Jelleine-I, Jelleine-II, Jelleine-III, Jelleine-IV) (BABIN, 2015).

Les acides aminés présents dans les pourcentages les plus élevés sont : proline, lysine, acide glutamique, alanine, phénylalanine, acide aspartique et sérine (BOSELLI *et al.*, 2003).

- **Lipides**

La fraction lipidique contient environ 80-90% (du poids sec) d'acides gras libres aux structures peu habituelles. Ce sont surtout des hydroxy-acides gras de 8 à 10 atomes de carbones où d'acides dicarboxyliques, contrairement aux acides de 14 à 20 atomes de carbones dans les acides gras trouvés dans les matériaux d'origines animale ou végétale. L'acide principal est l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque, suivi par son équivalent saturé, l'acide 10-hydroxydécanoïque. La fraction lipidique de la GR contient aussi quelques lipides neutres, des stérols (y compris le cholestérol) et une fraction d'hydrocarbures (MATEESCU, 2016).

- **Minéraux**

La gelée royale est riche en substances minérales dont :calcium, fer, potassium, soufre, magnésium, phosphore, sodium, zinc, cuivre, manganèse aluminium, baryum, strontium, bismuth, cadmium, mercure, plomb, antimoine, tellurium, thallium, tungstène, chrome, or, nickel, titanium, vanadium, cobalt, molybdène en infimes quantités.(STOCKER, 2003).

- **Vitamines**

Les concentrations de vitamines dans la gelée royale sont réparties sur un large spectre; vitamines montrant des valeurs assez uniformes sont la riboflavine, la thiamine, la niacine et l'acide folique. De même, la pyridoxine, la biotine, l'acide pantothénique et l'inositol (BOGDANOV, 2016). La concentration des vitamines est très élevée, spécialement pour le groupe de vitamine B (MATEESCU, 2016).

- **Autres**

On peut trouver des hormones et des facteurs de croissance (CLEMENT, 2009), par ailleurs, on peut également trouver certains débris tel que des fragments de larves ou encore de la cire (BABIN, 2015).

### 1.4.4. Récolte

Très peu d'apiculteurs récoltent eux-mêmes la gelée royale. Cette activité nécessite un équipement particulier et du personnel qualifié. Spécialement pour la production de la gelée royale, les colonies rendues partiellement orphelines, doivent élever des larves comme si elles devaient produire une nouvelle reine.

L'apiculteur leur propose donc des barrettes munies de cellules, dans lesquelles il place de jeunes larves prélevées dans un cadre à couvain. On nomme cette opération le greffage. Durant trois jours et demi, les abeilles vont les garnir de gelée royale. Avant que les cellules ne soient operculées, les barrettes sont récupérées, les larves retirées et la gelée royale aspirée (CLEMENT, 2009).

La figure ci-dessous illustre les différentes étapes respectées pour la récolte de la GR :



- a) Greffage des cellules; b) Remplissage de chaque cellule par la GR;
- c) Récupération des larves de toutes les barrettes de cellules royales ;
- d) Aspiration cellule par cellule.

**Figure 4 :** Etapes de récolte de la gelée royale.

**Source :** (CLEMENT, 2009 et ANONYME 4)

#### **1.4.5. Conservation**

La gelée royale est un aliment dont la conservation est difficile; très périssable, il faut la mettre, dès le prélèvement, dans de petits flacons de verre sombre et l'entreposer au réfrigérateur à + 4°C, pour éviter qu'elle ne se dégrade irréversiblement (BIRI, 2011).

### 1.4.6. Propriétés de la gelée royale

#### 1.4.6.1. Propriétés biologiques

##### ❖ Action antibactérienne

La GR a des effets inhibiteurs *in vitro* sur plus de 150 bactéries, plusieurs champignons et virus (MATEESCU, 2016) citant :

<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Leuconostoc mesenteroïdes</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Micrococcus varians</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus lactis ssp.</i>	

Plusieurs substances sont responsables de cette activité antimicrobienne à savoir :

Les flavonoïdes : sont des cofacteurs de l'activité antimicrobienne dans la gelée royale (MATEESCU, 2016). Plus particulièrement, l'Acide 10-hydroxy-2-décénoïque (10-H2DA) a des effets antibactérien et antifongique reconnus. Notamment, il exerce une activité contre *Micrococcus pyogenes* ; il représente  $\frac{1}{4}$  de l'activité de la pénicilline. En outre, il joue un effet inhibiteur contre *Escherichia coli*. L'activité de cet acide n'est que de  $\frac{1}{5}$  de l'activité de la chlorotétracycline (MATEESCU, 2016).

Les peptides : jouent également un rôle important dans le pouvoir antibactérien de la gelée royale, les Jelleines-I et II sont actifs contre certaines espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (FONTANA, 2004).

La royalisine un autre peptide qui présente une action antibactérienne contre les bactéries à Gram-positif. Les tests de diffusion en agar ont montré que la fraction peptidique présente un effet inhibiteur contre l'agent pathogène de l'abeille (*Paeni*) *Bacillus larvae*, l'agent pathogène principal de la loque américaine, ainsi que contre d'autres bactéries Gram positives comme *Bacillus subtilis* et *Sarcina lutea* (MATEESCU, 2016).

##### ❖ Action antifongique

La royalisine a un effet inhibiteur sur la croissance du champignon *Botrytis cinerea* (MATEESCU, 2016).

❖ **Action antivirale**

L'activité antivirale a été supposée lors de l'adjonction de la GR dans le traitement de l'hépatite et de la grippe. Malgré que, la GR possède des vertus et stimulants non spécifiques de système immunitaire, son action directe sur les virus n'a pas encore été démontrée. A forte dose, son action anti virale est plus importante (GHARBI, 2011).

❖ **Action anti-inflammatoire**

Il a été démontré que la GR contribue à la suppression des dommages inflammatoires causés par les cellules micro-gliales BV-2 activées par le LPS (YOU *et al.*, 2018), ces auteurs ont suggéré que la GR serait un aliment fonctionnel pour retarder les progrès inflammatoires dans le futur. KOHNO *et al.*, (2004), ont montré que la GR inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires tels que TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 par les macrophages stimulés par les LPS ou par le LPS et IFN- $\gamma$ .

❖ **Action sur la fertilité**

Dans une étude dirigée par GHANBARI *et al.*, (2015) ont remarqué que le poids des testicules, le nombre de spermatozoïdes, la motilité, la viabilité et les taux sériques de testostérone ont augmenté chez le groupe diabétique traité par la GR. Une diminution significative de la déformation des spermatozoïdes, de l'intégrité de l'ADN, de la qualité de la chromatine a été observée chez les rats diabétiques traités par la GR comparativement au groupe diabétique.

**1.4.6.2. Propriétés pharmacologiques**

❖ **Action antihypertensive**

La protéase ProRJ (Protease N treated royal jelly) et ses peptides: Ile-Tyr (IY), Val-Tyr(VY), Ile-Val-Tyr(IVY) inhibent l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) impliqué dans l'hypertension artérielle (TOKUNAGA, 2004).

❖ **Action anticancéreuse**

La présence de l'acide 10-H2DA confère à la gelée royale une activité antitumorale potentielle (GHARBI, 2011). D'après IZUTA *et al.*, (2009), le 10-HDA exerce un effet inhibiteur sur l'angiogenèse induite par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui joue un rôle dans la croissance des tumeurs.

### ❖ Action antioxydante

Les composés phénoliques et les métabolites secondaires des grains de pollen présents dans la gelée royale sont responsables de l'action antioxydante (BALKANSKA *et al.*, 2017). D'après MORITA *et al.*, (2012), l'ingestion de la GR pendant six mois chez l'homme améliore l'érythropoïèse, la tolérance au glucose et la santé mentale. Ceux-ci peuvent être dûs aux effets secondaires de la testostérone avec une accélération de la conversion du DHEA-S en testostérone par activation de la  $3\beta$ -HSD2 et / ou  $17\beta$ -HSD3 par le biais du potentiel enzymatique antioxydant de la GR.

### ❖ D'autres actions

La gelée royale peut aider à guérir les plaies chez les patients souffrant de malperforant plantaire du au diabète. Elle peut être plus efficace lorsqu'elle est utilisée avec d'autres traitements standards de la maladie (SIVASH *et al.*, 2011).

# *Matériel et Méthodes*

L'objectif de notre travail est de caractériser quatre échantillons de gelée royale de point de vue physicochimique et d'évaluer l'activité antibactérienne de GR fraîches et des extraits aqueux et éthanoliques de GR lyophilisées vis-à-vis de deux souches de références.

Cette étude a été réalisée en partie au niveau du laboratoire physicochimique ainsi qu'au laboratoire de microbiologie à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. La lyophilisation de nos échantillons a été faite au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologie de l'UMMTO.

Le deuxième volet de ce travail comporte la détermination des caractéristiques rhéologiques (Viscosité et Contrainte) et la teneur en minéraux sont réalisés au niveau du laboratoire de Boumerdes.

Ces expériences ont nécessité le recours aux matériels et aux méthodes indiqués ci-après.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel biologique**

#### **2.1.1. Gelée royale fraîche**

Les échantillons de GR fraîches sont déposés dans des petits flacons de 10g (Annexe2) bien fermé et couvert d'un papier aluminium pour assurer l'obscurité, et sont conservés au froid (2-5°C) pour éviter et minimiser leur dégradation. Durant la pratique les petits flacons de GR sont mis dans un réfrigérateur.

#### **2.1.2. Gelée royale lyophilisée**

Les quatre échantillons de Gr fraîches (Tableau IV) ont été lyophilisés dans un lyophilisateur.

La lyophilisation a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie de l'UMMTO.

Les échantillons sur les quatre GR analysées sont illustrés dans le tableau ci-après :

**Tableau IV :** Les informations sur les quatre échantillons de GR fraîches.

Echantillons	Nourriture	Méthode de récolte	Année de récolte	Commune	Poids de la GR
GR(A)	Sirop de Sucre	Greffage	2017	NACERIA	40g
GR(N)	Sirop de Sucre		2018		40g
GR(D)	Sirop de dattes (annexe 3)		2018		20g
GR(Nect)	Nectar		2018		40g

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

### 2.1.3. Micro-organismes testés

L'évaluation de l'activité antibactérienne des échantillons de la gelée royale a été testée sur deux bactéries de référence : *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 43300 qui ont été conservées sur gélose nutritive incubée à 4°C.

Les souches nous ont été fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'UMMTO.

## 2.2. Matériels chimiques et Appareillage (Annexe1).

### 2.3. Méthodes d'analyses

#### 2.3.1. Analyse phytochimique

Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation selon les méthodes standards de screening photochimique (DOHOU *et al.*, 2003 ; KUMAR *et al.*, 2010).

**Remarque :** Dans notre travail, l'analyse phytochimique a été réalisée uniquement sur la gelée royale fraîche GR(A), puisque cette dernière est la GR la plus ancienne parmi nos échantillons.

### **Préparation de l'infusé**

- 5 g de GR(A) fraîche sont mélangés dans 25 ml d'eau distillée ;
- Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes puis on filtre ;
- Le filtrat est ajusté à 25 ml d'eau distillée.

L'infusé ainsi obtenu est utilisé pour le recherche des différents groupes de composés chimiques :

#### **❖ Recherche des anthocyanes**

Introduire dans un erlenmeyer 5ml de l'infusé puis on ajoute quelques gouttes d'HCl

Une coloration rouge traduit la présence des anthocyanes.

#### **❖ Recherche des tanins**

Introduire dans un erlenmeyer 5ml de l'infusé puis on ajoute quelques gouttes de chlorure de fer  $\text{FeCl}_3$  à 5%.

Une coloration bleue noire indique la présence de tanins.

#### **❖ Recherche des tanins galliques**

Le filtrat est saturé par l'acétate de sodium ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), puis quelques gouttes de chlorure de fer  $\text{FeCl}_3$  sont ajoutées à ce dernier.

Une coloration bleue foncée apparait en présence de tanins galliques.

#### **❖ Recherche des saponines**

Dans deux tubes à essai fermés, verser dans l'un 5ml d'HCl, et dans l'autre 5ml de NaOH, puis introduit deux à trois gouttes de l'infusé ensuite agiter les tubes verticalement pendant 30secondes et laisser reposer 15minutes.

Une mousse persistante témoigne de la présence des saponines.

#### **❖ Recherche des flavonoïdes**

Le mélange de 5ml d'HCl, un copeau de Magnésium et 1ml d'alcool iso-butanol sont ajoutés à 5ml de l'infusé.

Une coloration rouge orangé est caractéristique de la présence des flavonoïdes.

### ❖ Recherche des glucosides

Quelques gouttes d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) sont ajoutées à 0,5 g de GR(A) fraîche.

Une coloration rouge brique ensuite violacée indique la présence de glucosides.

### ❖ Recherche des coumarines

1g de la gelée royale GR(A) fraîche est mélangé à 10ml (éthanol /eau distillée). Bouillir le mélange pendant 15 min à reflux puis filtrer et laisser refroidir.

L'identification des coumarines se fait par l'ajout de 10 gouttes de la solution KOH (10%) à 3ou 5 ml de filtrat et quelques gouttes d'HCl à 10% jusqu'à l'obtention d'un milieu fortement acide.

L'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines.

### ❖ Recherche des quinones libres

1 g de GR(A) est mélangé à 1 ml d'HCl (1N) et 10ml de chloroforme. Laisser le mélange pendant 3 heures puis filtrer. Après filtration, ajouter 5 ml d'ammoniaque (1/2).

Une coloration rouge violette témoigne de la présence des quinones libres.

### ❖ Recherche des quinones combinées

2,5 ml d' $H_2SO_4$  (2N) ont été ajoutés à 1g de la GR(A) fraîche, puis le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. Le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre, 10 ml de chloroforme sont ajoutés au filtrat, puis évaporer à sec, reprise par l'ammoniaque.

La réaction est dite positive lorsqu'une coloration rouge se manifeste.

### 2.3.2. Analyses physico-chimiques de la gelée royale

#### 2.3.2.1. Mesure de pH (NF V 05-108,1997)

##### Principe

La détermination du pH par la méthode potentiométrique, a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre.

##### Mode opératoire

- 1g de l'échantillon dans 25ml d'eau distillée chaude ;
- Broyer le mélange et laisser refroidir ;
- Etalonner le pH mètre en utilisant une solution tampon ;
- Prélever un volume V de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode ;
- Noter ensuite la valeur du pH.

##### Remarque

Il faut rincer l'électrode avec l'eau distillée avant chaque mesure puis sécher à l'aide du papier absorbant.

#### 2.3.2.2. Détermination de la teneur en eau

##### Principe

Le séchage a été réalisé dans une étuve avec ventilation d'air de type Mamert à  $105 \pm 03^\circ\text{C}$ .

##### Mode opératoire

La détermination de la teneur en eau se fait de la manière suivante:

- Peser les boîtes de Petri et tarer ;
- Peser dans chaque boîte Petri 2g de l'échantillon, et les placer dans l'étuve ;
- Retirer les de l'étuve, les placer dans un dessiccateur, après refroidissement, on les pèse, l'opération est répétée chaque 15 minutes jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

##### Expression des résultats

La teneur en eau a été déterminée selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{M1-M2}{P} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

Soit :

H(%) : humidité

M<sub>1</sub> : masse de la capsule + la matière fraîche avant séchage en g ;

M<sub>2</sub> : masse de la capsule + la matière après séchage (g) ;

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

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

#### Principe

Chaque échantillon est calciné à 550°C dans un four à moufle jusqu'à obtention des cendres blanchâtres de poids constant.

#### Mode opératoire

- Dans des creusets en porcelaine, peser 1g de l'échantillon ;
- Placer les creusets dans un four à moufle fermé; la température est augmentée progressivement de manière à éviter une calcination violente de produit ce qui entrainerait des pertes maintenues à une température de 550°±15°C jusqu'à obtention d'une couleur blanchâtre de poids constant ;
- Retirer les creusets du four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

#### Expression des résultats

La teneur en cendres est calculée par la formule suivante :

$$MO\% = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

Soit :

MO : matière organique en (g) ;

M<sub>1</sub> : masse de creuset + la prise d'essai en (g) ;

M<sub>2</sub> : masse de creuset après incinération en (g) ;

P : masse de la prise d'essai (g).

$$Tc\% = 100 - MO\% \dots\dots\dots(3)$$

Soit :

Tc : Taux de cendres.

#### **2.3.2.4. Détermination des éléments minéraux**

##### **Principe**

La minéralisation est la mise en solution des éléments suivants (Na, K, Mn, Fe, Zn, Cu, Cr, Ni, Cd, Mg, Pb).

Le but de la minéralisation est la reprise de cendres obtenues précédemment sous forme liquide (Audigie, 1978).

##### **Mode opératoire**

- Après calcination de 3g de matière sèche (La gelée royale) récupérer les cendres obtenues ;
- Humecter lentement les cendres par 3 ml d'eau bi distillée et 3 ml d'acide chlorhydrique concentré pour assurer une franche réaction acide ;
- Chauffer sur une plaque chauffante douce sans dépasser 250°C jusqu'à apparition des premières vapeurs ;
- Laisser reposer quelques minutes ;
- Ajouter 1 ml d'eau bi distillée puis filtrer sur un papier filtre sans cendres dans une fiole jaugée de 100 ml, rincer 3 à 4 fois à l'eau bi distillée de 30 à 40°C ;
- Incinérer le papier filtre et son contenu pendant une demi-heure à 550°C au maximum dans le four à moufle ;
- Ressortir après refroidissement les capsules ;
- Humecter une deuxième fois par 5 ml d'acide chlorhydrique 37% ;
- Mettre les capsules une deuxième fois sur la plaque chauffante jusqu'à apparition des premières vapeurs ;
- Ajouter 1ml HCl ;
- Ajouter 1 ml d'eau bi distillée puis filtrer sur un papier filtre sans cendres dans la même fiole jaugée 100 ml et laver avec de l'eau tiède ;
- Amener à 100 ml, complétant au trait de jauge après refroidissement avec l'eau bi distillée ;
- Mettre 20 ml de cette solution dans des tubes à essai.
- Réaliser l'atomisation à l'aide d'un atomiseur à flamme, la concentration de chaque élément est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalon.

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

**Principe**

Le principe de cette méthode consiste en un titrage de l'acidité avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (0,1N) en présence de phénophtaléine comme indicateur de couleur.

**Mode opératoire**

- Peser 1g de l'échantillon ;
- Placer l'échantillon dans une fiole conique, puis ajouter 7ml d'eau distillée récrément bouillie et refroidie, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène ;
- Chauffer le contenu au bain marie pendant 30mn ;
- Refroidir, transvaser quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 10ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée, bien mélanger puis filtrer.
- Prélever 1ml du filtrat dans 1ml d'eau distillée ;
- Ajouter trois gouttes de phénolphtaléine et tout en agitant, titrer avec de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistants pendant 30 secondes.

**Expression des résultats**

L'acidité titrable est calculée par la formule suivante :

$$A = \left[ v \times \frac{0,1}{m} \right] \times 100 \dots\dots\dots(4)$$

Soit :

- m: masse prélevée en gramme ;
- V: volume en ml de la solution NaOH à 0,1N.

**2.3.2.6. Dosage des sucres**

Dans ce dosage, trois catégories de sucres sont mis en évidence à savoir : les sucres totaux, les sucres réducteurs et le saccharose.

Avant le dosage, préparer les solutions de Fehling A et B et les deux filtrats (1) et (2) de compositions suivantes :

➤ **Filtrat(1)**

- Peser 4g de l'échantillon dans un bécher de 40ml ;
- Ajouter 1ml d'acétate de plomb,
- Remplir jusqu'au 2/3 du volume de bécher avec l'eau distillée ;
- Agiter à plusieurs reprises et laisser reposer pendant 15min ;
- Ajuster avec d'eau distillée à 40ml ;
- Homogénéiser et filtrer sur un papier filtre et récupérer le filtrat.

➤ **Filtrat (2)**

- Prélever 10ml du filtrat(1) et ajouter 1ml d'HCl concentré ;
- Chauffer le mélange au bain marine à 70°C pendant 5 min ;
- Neutraliser avec NaOH (10N) en présence de phénolphtaléine à 1%.

**2.3.2.6.1. Dosage des sucres totaux**

**Mode opératoire**

- Prélever 1ml de la solution Fehling A et 1ml de la solution Fehling B;
- Ajuster jusqu'à 20ml avec l'eau de robinet;
- Chauffer le contenu jusqu'à ébullition durant 2mn ;
- Titrer par le filtrat(2) obtenu jusqu'à la disparition de la couleur bleue ;
- Ajouter 2 gouttes de bleue de méthylène jusqu'à ce que la coloration bleue soit remplacée par une coloration marron cuivrée ;
- Noter le volume de filtrat(2)  $V_2$ .

**Expression des résultats**

Quantité des sucres totaux dans la prise d'essai est donnée par la formule suivante :

$$S_T = \frac{500}{V \times (V_2 - 0,05)} \times 10 \dots\dots\dots(5)$$

Soit :

$S_T$  : quantité des sucres totaux (g/100ml) ;

$V$  : volume de la prise d'essai ;

$V_2$  : volume du filtrat(2) utilisé au titrage.

### 2.3.2.6.2. Dosage des sucres réducteurs

#### Mode opératoire

- Introduire 1ml de la solution Fehling A et 1ml de la solution Fehling B dans un bécher de 40ml ;
- Ajuster jusqu'à 20ml avec l'eau de robinet ;
- Chauffer le contenu jusqu'à l'ébullition durant 2mn ;
- Titrer par le filtrat(1) jusqu'à ce que la teinte bleue disparaisse ;
- Ajouter 2 gouttes de bleu de méthylène et continuer le titrage jusqu'à ce que la coloration bleue devienne rouge brique;
- Arrêter le titrage et noter le volume du filtrat(1) dépensé  $V_1$ .

#### Expression des résultats

La quantité de sucres réducteurs dans la prise d'essai est donnée par la formule suivante :

$$S_R = \frac{240}{V \times (V_1 - 0.05)} \dots\dots\dots (6)$$

Soit :

$S_R$  : quantité des sucres réducteurs (g/100ml) ;

$V$  : volume de la prise d'essai (ml) ;

$V_1$  : volume du filtrat(1) utilisé au titrage.

### 2.3.2.6.3. Taux de saccharose

La quantité de saccharose est calculée selon la formule suivante :

$$S = (S_T - S_R) \times 0,95 \dots\dots\dots (7)$$

Soit

$S$  : quantité de saccharose en g/l ;

$S_T$  : quantité des sucres totaux en g/l ;

$S_R$  : quantité des sucres réducteurs en g/l.

### 2.3.2.7. Dosage de l'acide ascorbique

Le dosage direct par méthode iodométrique a été adopté.

#### Principe

Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'iode en milieu acide.

#### Mode opératoire

- Prendre 10ml de filtrat ;
- Ajouter 0,6ml de l'acide sulfurique( $H_2SO_4$ ) à 0,1N et quelques gouttes d'amidon à 0,5% comme indicateur coloré ;

#### Expression des résultats

Titrer le mélange par une solution d'iode à 0,05% jusqu'à l'apparition de la couleur bleue ;

La quantité d'acide ascorbique que contient le filtrat est donnée par la formule suivante :

$$Y = N \times 20 \times 4.4 \text{ d'acide ascorbique par litre.} \dots\dots\dots(8)$$

Soit :

N : nombre de ml d'iode versé ;

Y : la quantité de la vitamine C dans l'échantillon (mg/l).

### 2.3.2.8. Dosage des PPT

#### Principe

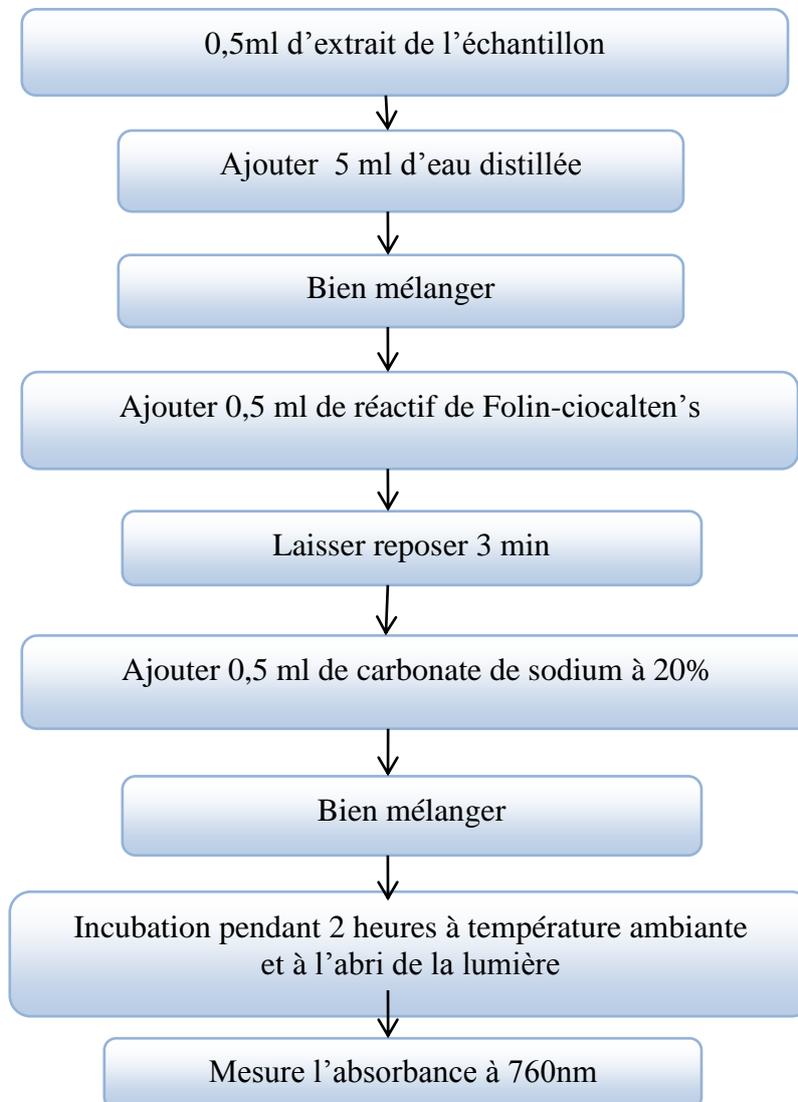
Les polyphénols ont été déterminés par spectrométrie selon la méthode de Folin-ciocalteu (SINGLETON *et al.*1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3 PW_{12} O_{40}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3 PMo O_{40}$ ).

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-ciocalteu en un complexe ayant une couleur constituée d'oxyde de tungstène ( $W_8 O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8 O_{23}$ ), l'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (BIOZOT et CHARPENTIER ,2006).

### Mode opératoire

La GR fraîche (2g) est soumise à une extraction par macération dans deux solvants, l'eau distillée et l'éthanol (20 ml) pendant 72 h puis les extraits sont filtrés.

Le dosage des polyphénols dans chaque extrait est adopté selon le diagramme suivant :



**Figure 05 :** Diagramme de dosage des PPT (SINGLETON *et al.*,1999).

### Courbe d'étalonnage

La concentration en composés phénoliques totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage (Annexe 5).

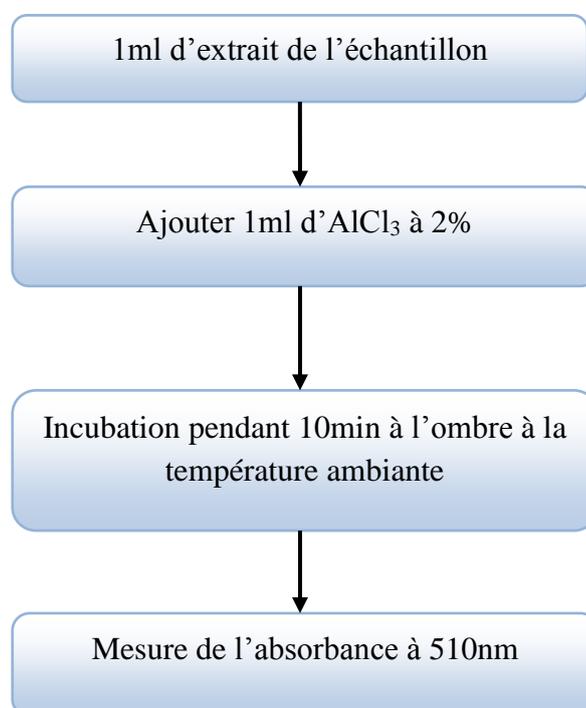
### Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche de plante (mg EAG /g MF).

#### 2.3.2.9. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  (KOSALEC *et al.*, 2004) a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits obtenus.

Le diagramme ci-dessous montre les différentes étapes respectées pour doser les flavonoïdes :



**Figure06** : Etapes de dosage des flavonoïdes (KOSALEC *et al.*, 2004).

### Courbe d'étalonnage

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée en utilisant la quercétine comme un flavonoïde standard (Annexe 5).

### Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de GR fraîche.

### **2.3.2.10. Mesure de la viscosité**

Le viscosimètre utilisé est de type couette, le Viscotester VT550. Il est utilisé pour caractériser des fluides en mode de rotation déterminant leur propriétés rhéologiques à savoir la viscosité, la contrainte seuil et la thixotropie. Il consiste à imposer une vitesse de cisaillement et calculer la contrainte de cisaillement et la viscosité apparente. Un régulateur de température de type HAAKE DC 30 a pour but de maintenir la température voulue (CHALAH, 2012). Pour notre cas la température est de 15°C.



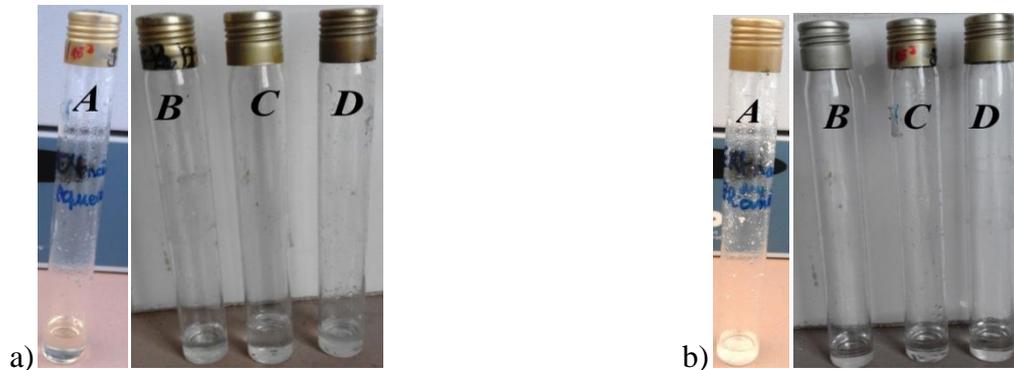
**Figure07** : Viscotester VT 550.

### **2.3.2.11. Analyse des groupements fonctionnels par IR :**

Les échantillons de gelées royales (GR(A), GR(N) et GR(D)) ont été analysés par spectroscopie IR de marque (BRUCKER) dans le but est de monter l'absorption des différents groupements fonctionnels et la présence de nouvelles substances.

### 2.3.3. Détermination de l'activité antibactérienne

La détermination de l'activité antibactérienne a été faite sur 4 GR fraîches et sur les extraits à base de DMSO et Ethanol de 4 GR lyophilisées.



**Figure 08 :** Aspect des extraits de GR lyophilisées.

a) Extraits à base de DMSO, b) Extraits à base d'Ethanol

A: GR (Nect), B: GR (A), C: GR (N), D: GR (D)

GR(A) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos extraits et des GR fraîches a été faite en utilisant des souches bactériennes de références ATCC (American Type Culture Collections) pour *E.coli* et *S.aureus*.

- **Préparation du milieu de culture :**

Dans notre travail nous avons utilisé le milieu Mueller Hinton (MH).

- **Préparation des disques :**

Les disques ont été préparés à partir de papier Wattman à un diamètre de 6mm, ensuite ont été posés dans un tube bien fermé. Le tube a été stérilisé dans un autoclave et conservé avant utilisation.

- **Préparation des prés cultures :**

Les deux souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes Pétri contenant du milieu MH et incubé pendant 20 à 24 heures à 37°C.

- **Standardisation des souches bactérienne**

A l'aide d'une anse à boucle, nous avons fait suspendre quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques dans 10ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 625nm et doit être comprise entre 0,08 et 0,1 germes /ml (BENHAMOU *et al.*, 2008).

- **Evaluation de l'activité antibactérienne**

La méthode de diffusion à partir des disques a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne (BENDJELALI *et al.*, 1986).

La gélose Muller Hinton est coulée dans des boîtes Pétri stériles de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laissée refroidir.

Les boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sontensemencées par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile, par des stries bien serrées pour assurer une distribution homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, déposer les disques de papier Wattman et d'antibiotique (Témoin+) à la surface de la gélose. Ensuite, 10µl de chaque extrait/GR fraîche et Témoin (-) (DMSO ou Ethanol) sont pipetées par une micropipette et déposées sur le disque correspondant. Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

L'évaluation de l'activité antibactérienne est basée sur la mesure des diamètres en (mm) des halos d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle décimale et peut être symbolisée par des signes de sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait (PONCE *et al.*, 2003).

- Souche non sensible (-) ou résistante :  $D < 8\text{mm}$
- Souche sensible (+) :  $9\text{mm} < D < 14\text{mm}$
- Souche très sensible (++) :  $15\text{mm} < D < 19\text{mm}$
- Souche extrêmement sensible (+++) :  $D > 20\text{mm}$

## *Résultats et discussion*

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Résultats d'analyse phytochimique

Les résultats du screening phytochimique sont montrés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau V** : Résultats du screening phytochimique de la gelée royale.

Metabolites secondaires	Quantité	Résultats
<b>Anthacyanes</b>	-	
<b>Tanins</b>	-	
<b>Tanins galliques</b>	-	
<b>Saponines</b>	-	1er tube  2éme tube 
<b>Flavonoïdes</b>	++	
<b>Glucosides</b>	+++	
<b>Coumarines</b>	+	
<b>Quinones libres</b>	-	
<b>Quinones combinées</b>	-	

(+++): Abondance; (++) : Moyenne; (+): Faible; (-): Absence

Les résultats du tableau (V) révèlent que les flavonoïdes sont présents en quantité moyenne, les glucosides sont abondants et les coumarines sont présents en faible quantité. Cependant, les anthocyanes, les tanins, les tanins galliques, les saponines, les quinones libres et combinés sont absents.

Les résultats trouvés sont en accord avec ceux de NABAS *et al.* (2014) qui ont signalé la présence des flavonoïdes et des glucides dans la gelée royale.

Il y a lieu de signaler que les glucosides sont des sucres constituant la gelée royale selon les recherches réalisées par VON PLANTA (1888-1889) (MATEESCU, 2016). D'après NABAS *et al.* (2014), les glucides constituent 14,07% de la gelée royale. Généralement, le fructose et le glucose représentent 90% des sucres totaux. En outre, le saccharose est toujours présent mais souvent à des concentrations très variables.

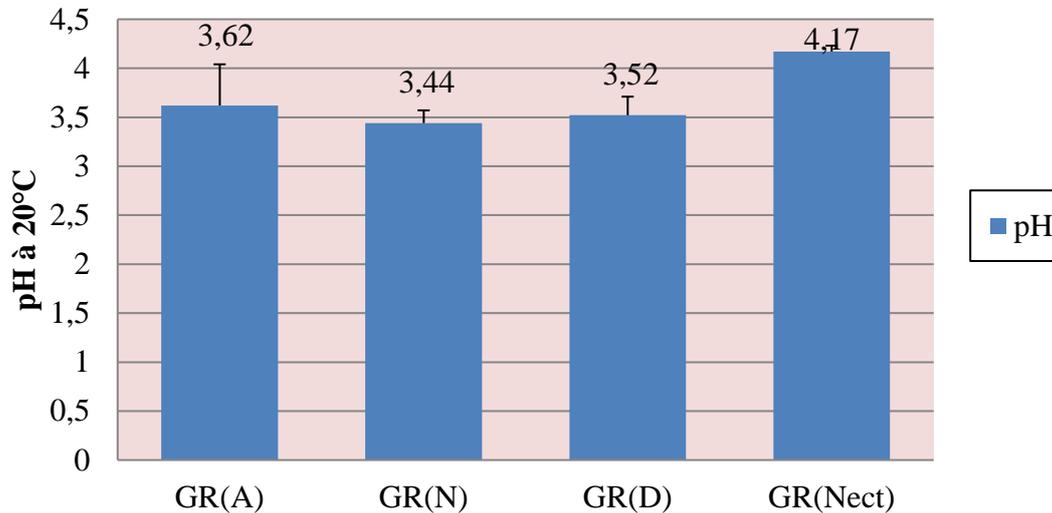
La présence des coumarines peut être liée à la présence des résidus du pollen dans la gelée royale. Ce résultat coïncide avec ceux signalés par VIUDA *et al.* (2008).

En effet, les principaux groupes de composés phénoliques présents dans les plantes, se trouvent soit sous forme libre ou sous forme de glucosides qui sont des dérivés de l'acide cinnamique, des coumarines et des flavonoïdes.

### 3.2. Résultats d'analyses physicochimiques

#### 3.2.1. Résultats du pH

La figure ci-dessous illustre les résultats du pH des quatre gelées royales analysées.



**Figure 09** : pH des quatre gelées royales fraîches.

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

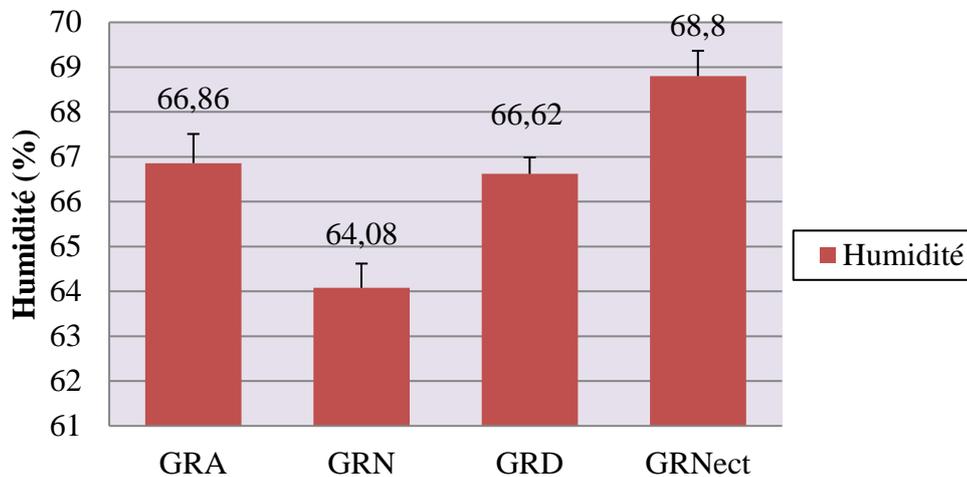
Les résultats du pH révèlent que les différentes gelées présentent un pH acide et les valeurs trouvées sont relativement proches. Ceci nous mène à dire que la nature de l'alimentation n'influence pas sur la valeur du pH.

Ces résultats concordent avec les résultats de BALKANSKA *et al.*, (2013) qui ont rapporté de faibles variations de pH des différentes gelées royales analysées. Les valeurs de pH varient de 3,65-4,18 et de 3,76-4,19 pour les échantillons de gelées royales provenant des colonies d'abeilles alimentées en sucre et en miel respectivement.

D'autres auteurs ont signalé des valeurs similaires de pH de la GR fraîche de l'ordre de 3,4-4,5 (SABATINI *et al.*, 2009),  $3,42 \pm 0,02$  (NABAS *et al.*, 2014), 3,4-4,5 (BOGDANOV, 2016, KRELL, 1996) Cependant, OLIMPIA *et al.*, (2008) ont enregistré des valeurs légèrement élevées variant de 4 à 5.

### 3.2.2. Résultats de l'Humidité

Les teneurs en eau des quatre gelées royales sont montrées dans la figure ci-dessous :



**Figure 10 :** Humidité des quatre gelées royales fraîches.

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

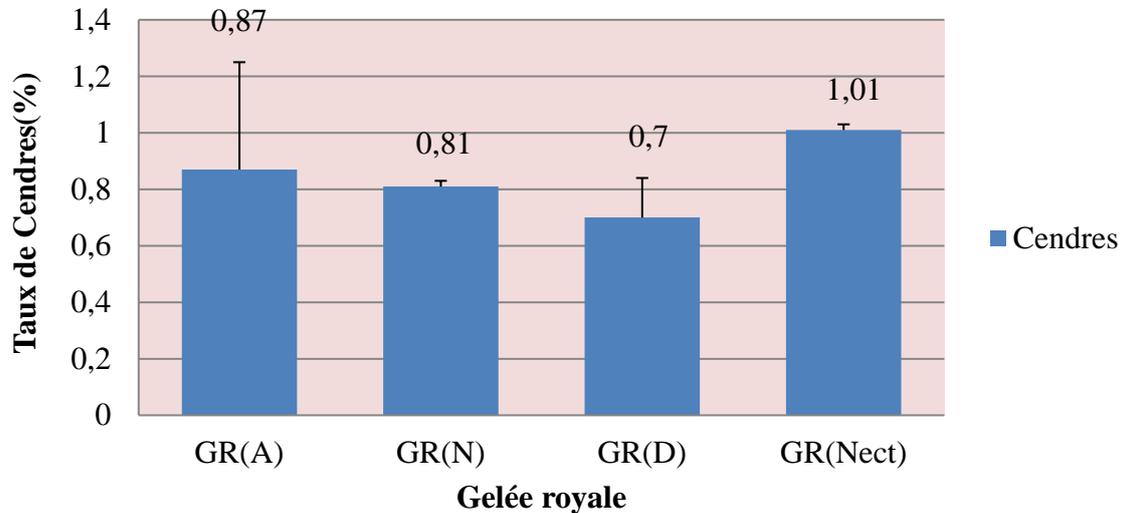
Les résultats de l'humidité (Figure 10) montrent que les gelées analysées présentent des teneurs très importantes. Nous remarquons que la gelée issue des abeilles alimentées par le nectar présente la valeur la plus élevée en humidité suivie de celle issue de l'alimentation des abeilles par le sucre (2017) et par le sirop de dattes. Par contre, la gelée royale issue de sucre (2018) présente la plus faible valeur qui est de  $64,08 \pm 0,54\%$ .

Ces résultats corrélerent avec ceux rapportés par d'autres auteurs analysant différentes gelées royales qui présentent une humidité de 60-70% (BOGDANOV *et al.*, 2016, SABATINI *et al.*, 2009, BALKANSCA *et al.*, 2013, OLIMPIA *et al.*, 2008) et de 57-70% (LERCKER *et al.*, 1992). La non-solubilité de certains composés explique la variation dans la teneur en eau (SABATINI *et al.*, 2009).

Il y a lieu de signaler qu'une forte activité en eau augmente le risque d'altération et limite la durée de stockage de la gelée royale. Selon OLIMPIA *et al.*, (2008), la teneur en eau de la gelée royale est un critère de qualité important et sa détermination fait toujours partie du contrôle de la qualité de la gelée royale pure.

### 3.2.3. Résultats des cendres

Les taux de cendres sont représentés dans la figure(11) :



**Figure 11** : Taux de cendres des quatre gelées royales fraîches.

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

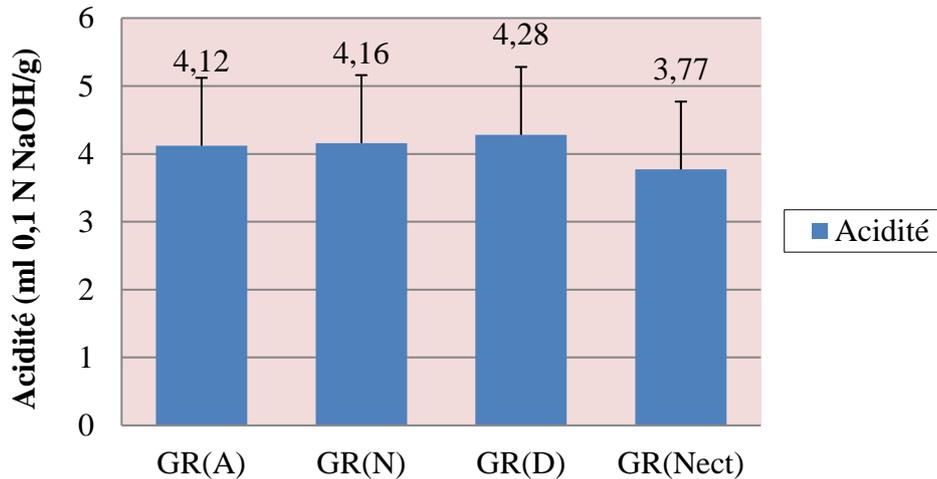
Les taux de cendres des échantillons des GR sont de  $1.01 \pm 0.02\%$  pour la GR(Nect),  $0.87 \pm 0.38\%$  pour la GR(A),  $0.81 \pm 0.02\%$  pour la GR(N) et enfin la GR(D) avec  $0.7 \pm 0.14\%$ , la teneur en cendres de la GR(Nect) est comparable à celle de la GR de Jordanie avec  $1.10\%$  et celle du Thaïlande avec  $1.14\%$  (NABAS *et al.*, 2014), ces teneurs sont par contre quelque peu supérieures comparées à ceux des trois autres GR.

Par ailleurs, il a été signalé que la teneur en cendres de la GR fraîche peut atteindre  $0,8-3\%$  (WONGCHAI *et al.*, 2002, GARCIA-AMOEDO. et ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

Dans une étude de WONGCHAI *et al.*, (2002) sur la composition physicochimique de la GR du Thaïlande, ils ont rapporté que la teneur en cendres était constante durant toute l'année.

### 3.2.4. Résultats de l'Acidité

Les résultats d'analyse de l'acidité (Figure 12) révèlent que les quatre gelées présentent des valeurs en acidité qui sont proches. Ceci nous mène à dire que les quatre nourritures influencent de même manière sur l'acidité.



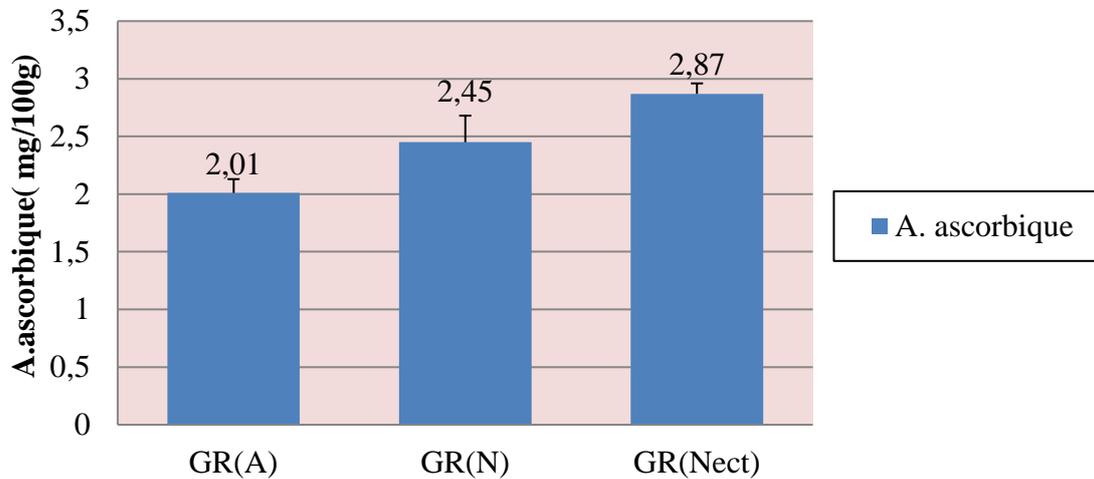
**Figure 12 :** Valeurs de l'acidité des gelées faïches analysées.

GR(A) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

Des résultats similaires ont été rapportés par BALKANSKA *et al.*, (2013) qui il n'y a pas de variation dans l'acidité des différentes gelées royales issues d'une nourriture à base de sucre et de miel. Nos valeurs trouvées sont en accord avec ceux signalées par d'autres auteurs qui ont déclaré une valeur de l'acidité totale =4.08 (mL 0.1N NaOH/g) (DINKOV *et al.*, (2016) et un taux d'acidité entre 3,0 – 6,0 ml 0,1N NaOH/g rapporté par SABATINI *et al.*, (2009).

### 3.2.5. Résultats de l'Acide ascorbique

La figure(13) illustre les valeurs de l'acide ascorbique des trois gelées royales: GR(A), GR(N), GR(Nect) (la GR(D) n'a pas été analysée par manque de matière).



**Figure 13 :** Valeurs d'acide ascorbique des trois gelées royales fraîches (GR(A), GR(N), GR(Nect)).

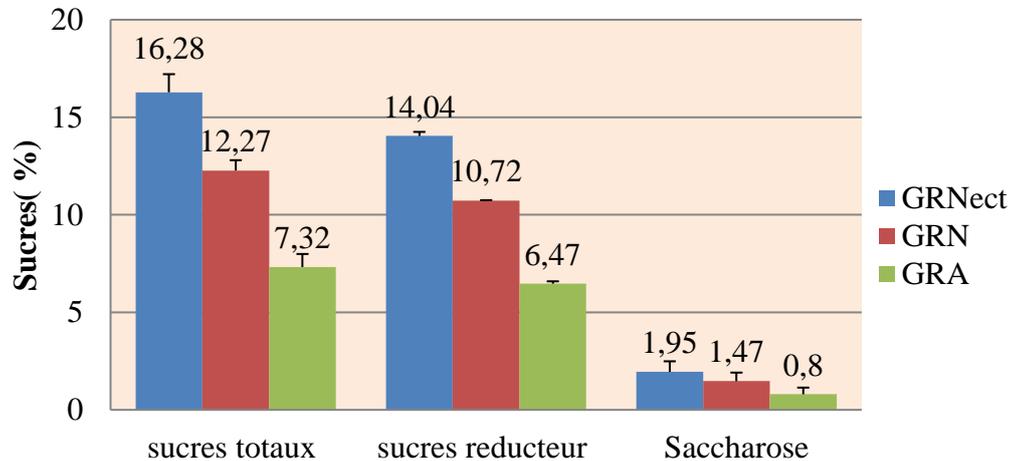
GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

D'après cette figure nous remarquons une légère variation dans les valeurs de l'acide ascorbique enregistrées.

Nos résultats confirment ceux rapportés par BANUTIU *et al.*, (2011) qui ont signalé un taux de Vitamine C de l'ordre de 2,00 mg /100g. Nous pouvons conclure que les trois nourritures n'ont pas un effet sur la concentration de l'acide ascorbique des différentes GR analysées.

### 3.2.6. Résultats des sucres

La figure ci-dessous représente le pourcentage des sucres caractérisant les trois gelées royales GR(A), GR(N), GR(Nec) (GR(D) n'a pas été analysée par manque de matière).



**Figure 14 :** Le pourcentage des sucres chez les trois gelées royales fraîches : GR(A), GR(N), GR(Nect).

GR(A) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

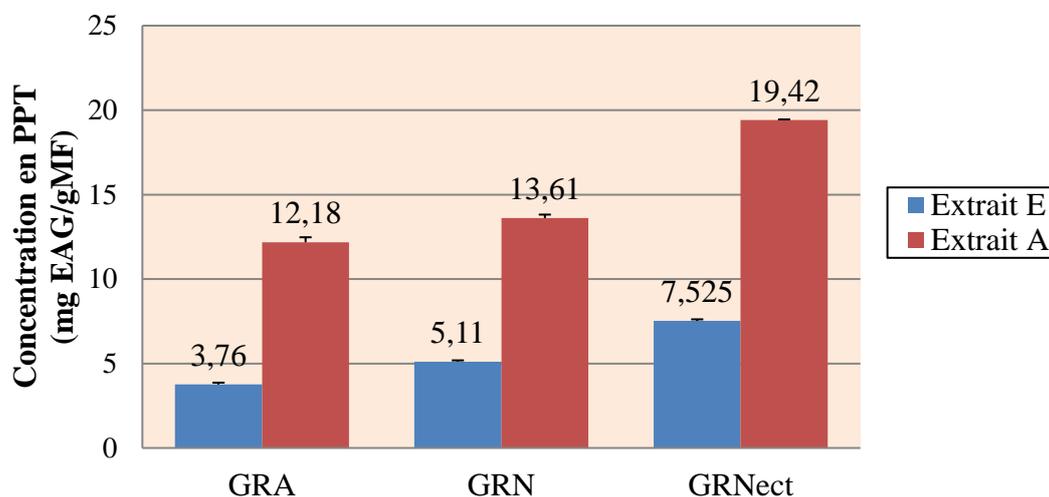
Nous remarquons des différences dans les concentrations des sucres qui caractérisent les trois gelées analysées. Nous classons la gelée issue de la nourriture des abeilles de nectar en premier lieu, celle-ci représente les meilleures valeurs des sucres analysés puis elle vient la GR(N) et en dernier lieu la GR(A).

Ces valeurs sont cohérentes avec celles trouvées par SABATINI *et al.*, (2009) et SESTA, (2006).

Nous remarquons aussi que les sucres réducteurs des trois GR sont plus abondants que les sucres non réducteurs (saccharose). SABATINI *et al.*, (2009) ont mentionné effectivement que les monosaccharides fructose et glucose (sucres réducteurs) sont les deux principaux sucres constituant de la GR, ils représentent souvent plus de 90% des sucres totaux. Le saccharose présente une quantité moindre (MATEESCU, 2016).

### 3.2.7. Résultats des PPT

Les concentrations en PPT des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales sont présentées dans la Figure (15), la GR(D) n'a pas été analysée par manque de matière).



**Figure 15 :** Concentrations en PPT des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales fraîches GR(A), GR(N), GR(Nect).

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

L'analyse quantitative des composés phénoliques montre que, les extraits aqueux de l'ensemble des gelées analysées présentent des teneurs plus élevées en ces composés en comparaison avec les extraits éthanoliques. Nous constatons aussi que la gelée royale de nectar présente le meilleur taux d'extraction en polyphénols.

Nos résultats montrent que la concentration en PPT dans les extraits aqueux est supérieure à celle dans les extraits éthanoliques pour les trois GR analysées, les valeurs sont comprises entre 3,76-7,52mgEAG/g de GR et entre 12,18-19,42mgEAG/g de GR pour les extraits éthanoliques et aqueux respectivement.

La concentration la plus élevée est représenté par la GR (Nect) que ce soit dans l'extrait aqueux ou éthanolique (19,42 pour l'extrait A et 7,525 pour l'extrait E), suivie par la GR(N) qui a un taux de 13,61 pour l'extrait A et 5,11 pour l'extrait E, et enfin la GR(A) avec une concentration de 12,18 pour l'extrait A et 3,76 pour l'extrait E.

Nos résultats des extraits aqueux sont en accord avec les valeurs retrouvées par BALKANSKA *et al.*, (2017) avec un intervalle entre 11.66 – 36.73 mg EAG/g de GR pour une moyenne de 19.54 mg EAG/g de GR par contre ces valeurs sont hautement supérieures à celles retrouvées dans les extraits éthanoliques.

A l'exception des autres GR uniquement la concentration trouvée dans l'extrait aqueux de la GR(Nect) est en accord avec les résultats obtenus par PAVEL *et al.*, (2014) avec une limite de 14.56 - 39.90mgEAG/g de GR ,mais qui est très loin de la moyenne  $23.49 \pm 6.36$  mg EAG/g de GR.

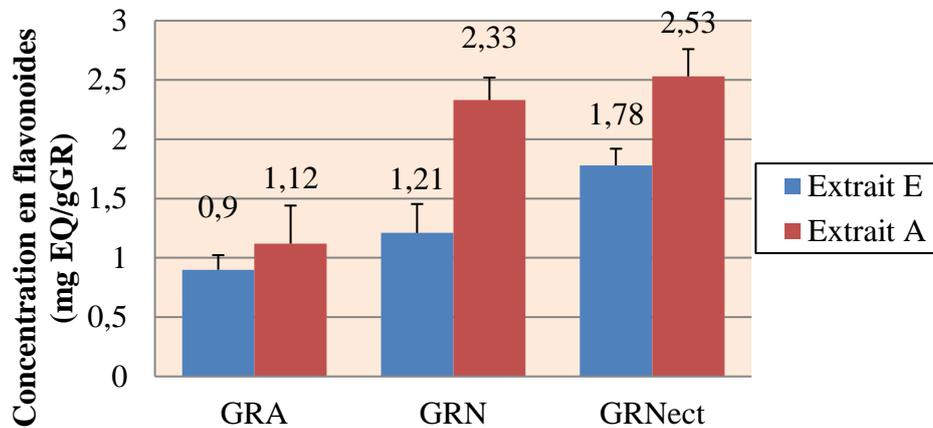
Jusqu'à présent, peu de travaux sont disponibles analysant les composés phénoliques de la gelée royale. NAGAI. et INOUE, (2004) ont détecté des valeurs de 21,2 à 22,8 mg / g de GR lyophilisée à partir d'extraits aqueux et alcalins. Quoiqu'il en soit, ces valeurs ne sont pas comparables aux nôtres car elles ne peuvent pas être facilement converties en mg par g de GR fraîche. LIU *et al.*, (2008) ont rapporté un contenu phénolique total compris entre 150 et 219  $\mu\text{g}$  / g de GR pour différents échantillons de GR .Cependant ces résultats sont énormément inférieurs à nos valeurs. Un autre groupe a signalé une valeur moyenne de 5,8 mg / g de GR lyophilisée (GAO *et al.*, 2011).

La variation du contenu phénolique total est attribuée à plusieurs facteurs tels que le climat et la source florale. Les composés phénoliques de la gelée royale pourraient provenir de plantes qui sont largement distribués dans la nature (BRAVO, 1998; WONGCHAI. et RATANAVALACHAI, 2002; LIU *et al.*, 2008).

Les composés phénoliques présents dans la gelée royale sont connus pour posséder des propriétés antioxydantes et ces propriétés peuvent jouer un rôle clé dans les activités pharmacologiques de la GR (BALKANSKA *et al.*, 2017).

### 3.2.8. Résultats des Flavonoïdes

La figure (16) représente les concentrations en flavonoïdes des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales étudiées.



**Figure 16 :** Concentrations en flavonoïdes des extraits (aqueux et éthanoliques) des trois gelées royales fraîches étudiées.

GR(A) : Gelée royal issue d’abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d’abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(Nect) : Gelée royale issue d’abeille nourrie de nectar.

Nous constatons d’après cette figure que les extraits aqueux préparés à base les trois gelées présentent des teneurs élevées en flavonoïdes en comparaison avec les extraits éthanoliques. Les gelées GR(N) et GR(Nect) présentent presque des taux similaires en flavonoïdes en comparaison avec la gelée GR(A).

Peu d’études ont été réalisées sur la teneur totale en flavonoïdes. NABAS *et al.*, (2014) ont trouvé une teneur moyenne en flavonoïdes totaux de  $1.28 \pm 0.09 \mu\text{g}$  rutin/mg de GR à partir d’extrait aqueux. Cette moyenne est en accord avec notre concentration trouvée dans l’extrait aqueux de la GR(A), mais inférieur à celle détecté dans l’extrait A des GR (Nect) et GR(N). Les concentrations dans les extraits éthanoliques ne peuvent être comparé à cette concentration puisqu’elle concerne des extraits aqueux.

Dans la gelée royale, la plupart des composés phénoliques se présentent sous la forme de flavonoïdes dont la concentration dépend de divers facteurs, notamment des espèces végétales utilisées par les abeilles, le bon état de la plante, la saison, etc. (KUCUK *et al.*, 2007).

3.2.9. Résultats des minéraux

La composition chimique des trois gelées royales est représentée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VI:** Teneur en minéraux des trois gelées royales lyophilisées : GR(A), GR(N) et GR(Nect).

Minéraux (mg/kg MS)	GR(A)	GR(N)	GR( Nect)
Ni	0	0	0
Cr	abs	18,812	32,504
Pb	30,72	24,35	0
Zn	473,6296	72,1286	81,3725
Mn	0	0	0
Cd	0	1,764	1,057
K	0	1475,980	1263,359
Na	3550,623	741,7532	589,0841
Cu	662,145	1,767	3,795
Ca	2977,084	3179,542	3213 ,517
Mg	1454,841	1559,542	1386,072
Fe	5167,540	0	0

GR(A) : Gelée royal issue d’abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d’abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(Nect) : Gelée royale issue d’abeille nourrie de nectar.

La gelée royale est riche en minéraux et cela a été démontré par plusieurs auteurs. SABATINI *et al.*, (2009) a rapporté que les minéraux et autres éléments représentent environ 4% à 8% de la matière sèche de GR.D’après GARCIA-AMOEDO et ALMEIDA-MURADIAN, (2007) la teneur en cendres représente 0,8-3% de GR.

Nous remarquons de ce tableau que les trois gelées analysées sont riches en minéraux, les éléments plus abondants sont le Zn, le Na, le Cu, le Ca et le Mg, En comparant les trois gelées, nous pouvons classer la gelée GR(A) comme meilleure gelée de point de vue composition minérale. Elle constitue des teneurs élevées en Na, Cu, et en Fe suivie par la gelée GR(N) qui est riche en K, Ca et Mg et la gelée GR(Nect) riche beaucoup plus en Ca. Les éléments toxiques (Cd, Pb et Cr) se trouvent à des concentrations variables et négligeables dans les trois types de gelées. Par ailleurs, nous constatons une absence totale de Ni dans les trois gelées analysées.

En effet, la présence de minéraux et leur variabilité sont liées à la source de l'alimentation, la période de production, l'environnement et les facteurs biologiques des abeilles (GARCIA-AMOEDO et ALMEIDAMURADIAN, 2007; SABATINI *et al.*, 2009).

Les éléments Mg et Ca sont relativement proches et constants et cela peut être dû aux ajustements homéostatiques de quelques éléments principaux et des oligo-éléments qui correspondent aux besoins des larves d'abeilles (STOKER, 2005)

### 3.2.10. Résultats de la viscosité

Les résultats de la viscosité et de la contrainte des quatre GR sont représentés dans les courbes de la figure ci-après :

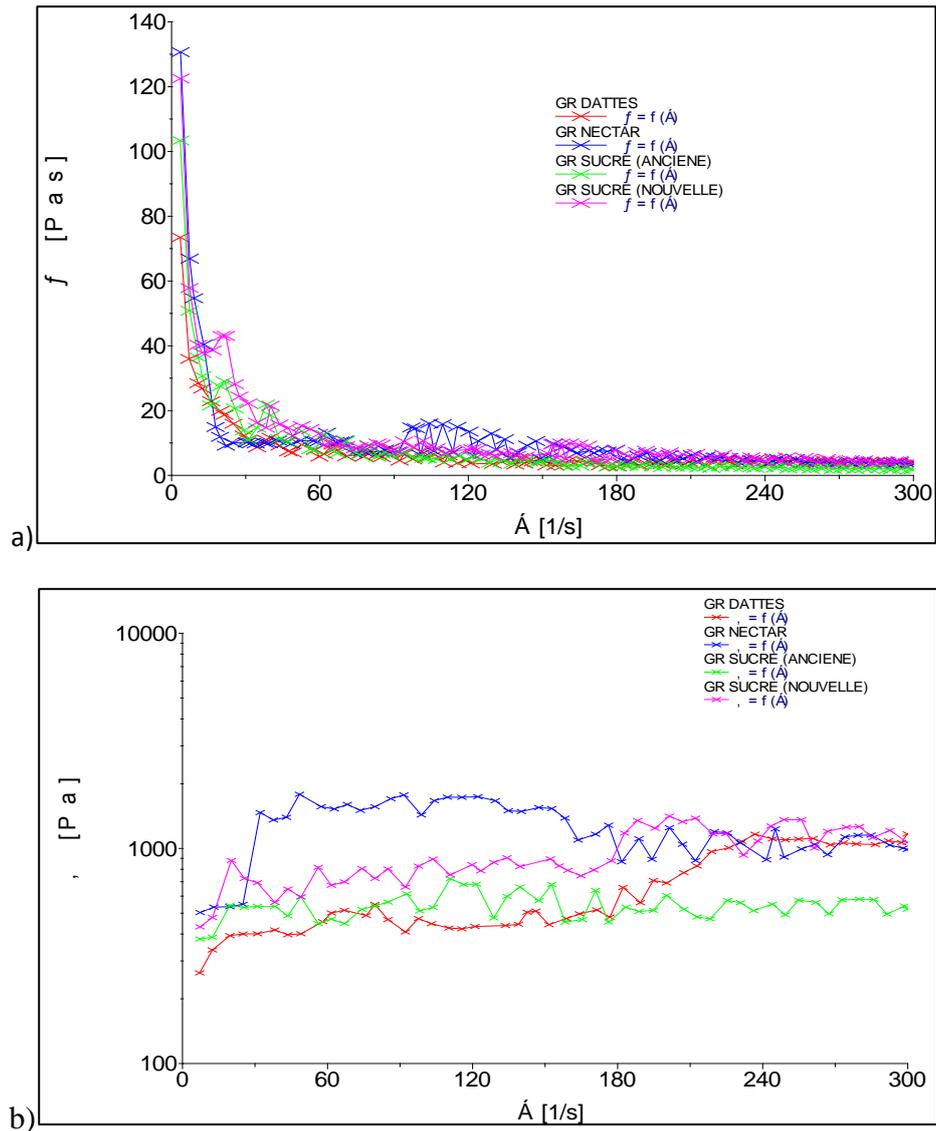


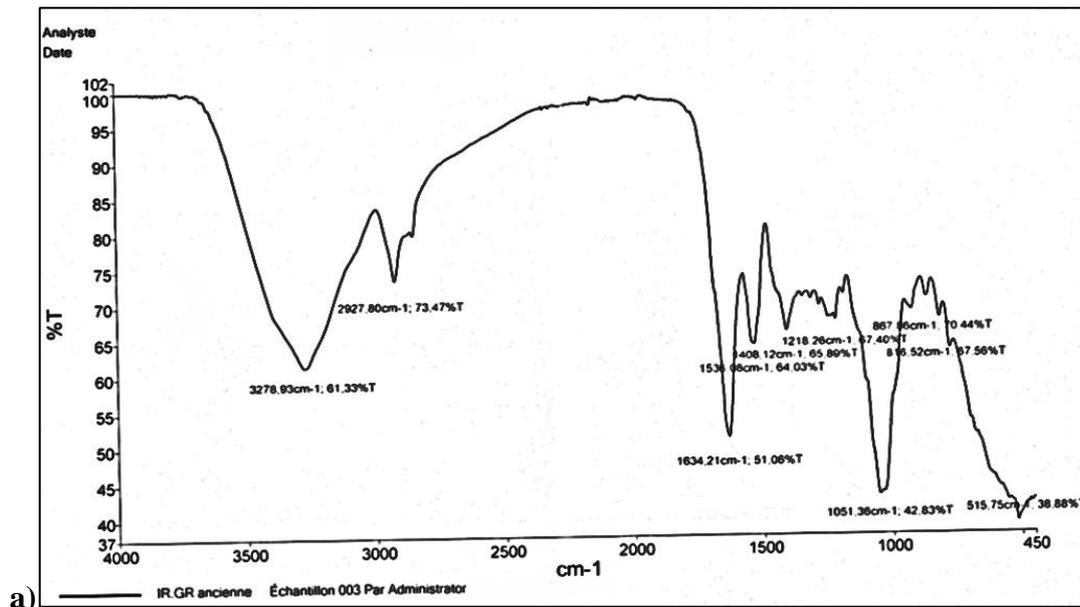
Figure17 : Courbes d'évolution de la viscosité et de la contrainte des gelées royales.

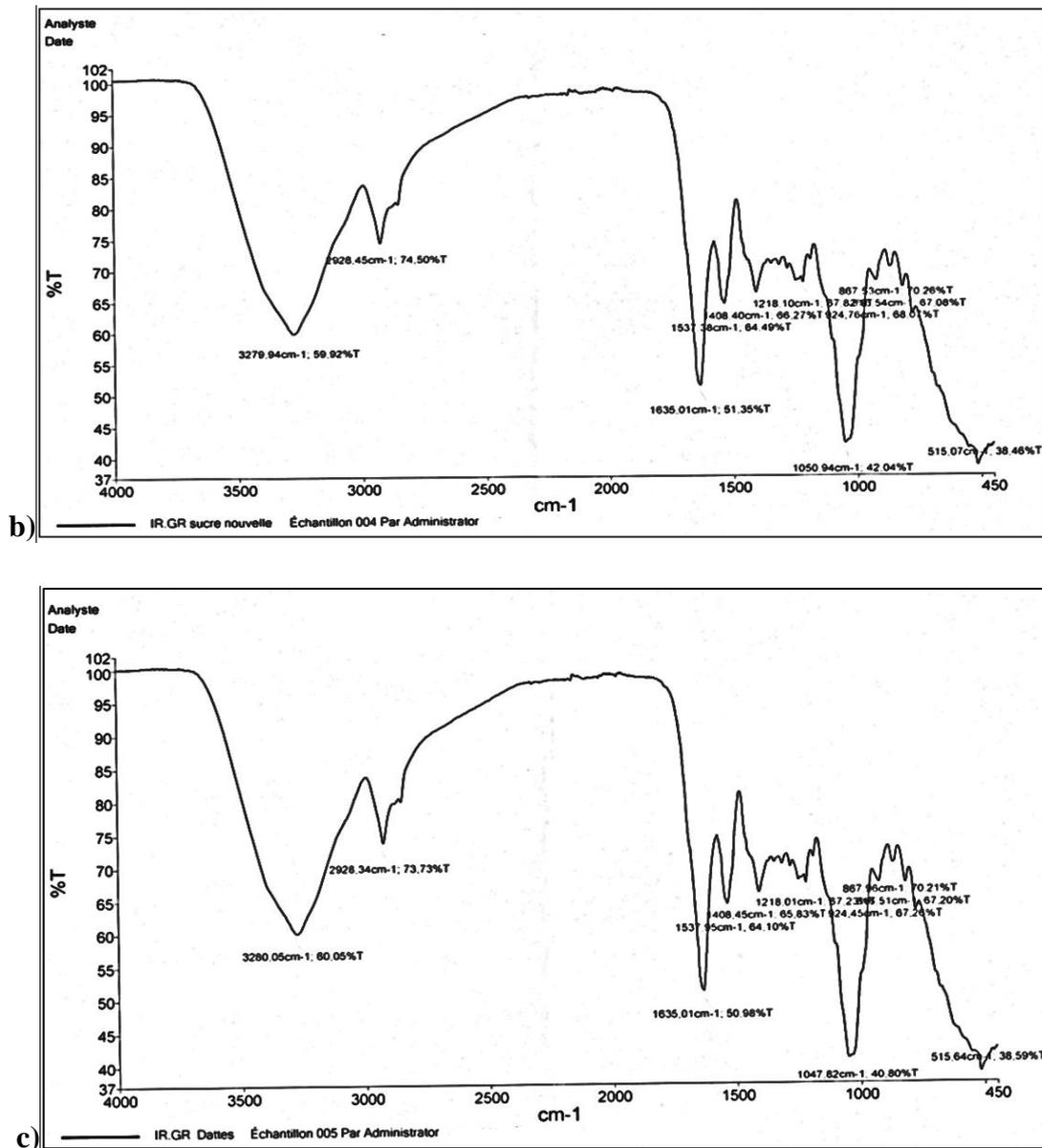
a) : Viscosité ; b) : Contrainte.

La figure (17) indique que les quatre gelées étudiées sont du type dit "rhéofluidifiant" car leur viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente, ce qui veut dire qu'elles possèdent les propriétés visqueuses d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. C'est le cas des bonnes gelées qui sont fluides à l'étalement mais plus visqueuses au toucher. Cependant, ces gelées sont dites à seuil. Par définition, un seuil d'écoulement décrit la contrainte requise pour produire l'écoulement d'une substance plastique (DRIDI, 2005). Nous pouvons conclure, que les gelées produites peuvent être considérées comme des fluides plastiques, ce qui signifie qu'elles s'écoulent à partir d'une certaine valeur de contrainte ( $\tau$ ). Les résultats obtenus sont conformes à certaines pommades cosmétiques, la nature des pommades est du type « fluide non newtonien pseudoplastique » (BENAHMEDDJILALI *et al.*, 2017).

### 3.2.11. Résultat de l'analyse des groupements fonctionnels par IR

L'analyse IR d'un échantillon d'origine biologique est une méthode qualitative rapide qui permet de révéler la présence de certains groupements fonctionnels caractéristiques (BENAHMED-DJILALI, 2012). La figure 18 présente l'empreinte infrarouge de la gelée royale GR(A) (Figure 18(a)), la GR(N) (Figure 18(b)) et celle de la GR(D) (Figure 18(c)) :





**Figure 18** : Spectres d'absorption des trois gelées royales lyophilisées: a)GR(A); b) GR(b) ; c)GR(D).

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes.

L'analyse IR ne montre aucune différence significative dans la position et l'intensité des pics des trois GR, cela révèle que la nature de la nutrition n'a pas d'effet sur la composition chimique de GR issues d'abeilles nourries différemment.

Les résultats d'analyse IR des GR (GR(A), GR(N), GR(D)) révèlent plusieurs types d'absorption figure (18). Le spectre d'absorption montre la présence de 3 pics d'intensité forte

(Tableau VII). Une bande se situe entre 1150-1020  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond la vibration d'élongation de la liaison C-O des groupements Ethers.

Nos trois GR referment également des groupements amides caractéristique à 1452-1650  $\text{cm}^{-1}$  approximativement.

L'analyse IR révèle l'apparition d'une autre bande d'absorption forte et large enregistrée entre 3200 et 3400  $\text{cm}^{-1}$  pour les trois GR correspond à la vibration d'élongation de la liaison O-H liée des groupements alcools et phénols.

**Tableau VII :** Principales bandes d'absorption des groupements fonctionnels présents dans les trois gelées royales (GR(A), GR(N), GR(D)) identifiés par spectroscopie infrarouge.

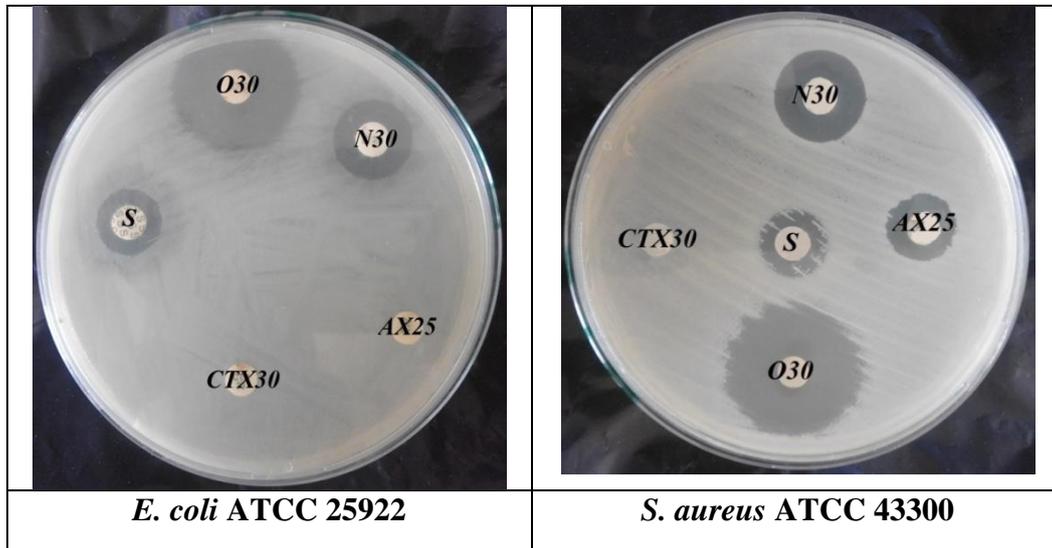
	Nombre d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )	Type de liaison (v Vibration d'élongation)
GR(A)	3278,93	v(O-H liée) groupements alcools et phénols
GR(N)	3267,94	
GR(D)	3280,05	
GR(A)	1634,21	v(C-N et C-H) groupements amides
GR(N)	1635,01	
GR(D)		
GR(A)	1051,36	v(C-O) groupements Ethers
GR(N)	1050,94	
GR(D)	1047,82	

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes.

### 3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 3.3.1. Résultat de l'antibiogramme

La figure ci-dessous illustre les résultats de l'antibiogramme d'*E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 43300 vis-à-vis les antibiotiques (N30, O30, CTX30, AX25, S).



**Figure 19 :** Résultat en photos de l'antibiogramme d'*E.coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 43300 vis-à-vis des antibiotiques (N30, O30, CTX30, AX25, S).

La figure 19 montre que les deux souches sont sensibles vis-à-vis des antibiotiques : N30, O30, S et résistant à CTX30, l'ATB AX25 a inhibé la souche *S.aureus* et non pas *E.coli*.

#### 3.3.2. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes (Voir Annexe 6)

Les tableaux VIII et IX présentent les diamètres des zones d'inhibition des gélées royales lyophilisées et fraîches vis-à-vis des souches *E.coli* ATCC 25922 et *S.aureus* ATCC 43300 respectivement.

Les diamètres en photos des GR fraîches et des extraits de GR lyophilisées sont dans l'Annexe 6.

**Tableau VIII:** Diamètres des zones d'inhibition des extraits des gélées lyophilisées vis-à-vis de *E.coli* ATCC 25922 et *S.aureus* ATCC 43300.

	Gelée royal lyophilisé							
	GR(A)		GR(D)		GR(N)		GR(Nect)	
	Diamètre d'inhibition (mm)							
	Extrait A	Extrait E	Extrait A	Extrait E	Extrait A	Extrait E	Extrait A	Extrait E
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-	-	-

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

**Tableau IX:** Diamètres des zones d'inhibition pour l'ensemble des GR fraîches vis-à-vis de *E.coli* ATCC 25922 et *S.aureus* ATCC 43300.

	Gelée royal fraîche			
	GR(A)	GR(D)	GR(N)	GR(Nect)
	Diamètre d'inhibition (mm)			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	2	-	7	11

GR(A) : Gelée royal issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2017; GR(N) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de sucre 2018; GR(D) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de sirop de dattes; GR(Nect) : Gelée royale issue d'abeille nourrie de nectar.

Les résultats de l'activité antimicrobienne montrent d'une part que les deux extraits des différentes GR lyophilisées préparés en utilisant le DMSO et l'éthanol n'exercent aucun effet inhibiteur contre les deux souches testées. Ces résultats révèlent que ces souches ont une résistance très importante vis-à-vis les deux extraits des 4 GR lyophilisées, et cela peut être due à la faible quantité de lyophilisat (0,1g de GR lyophilisé dans 5ml de DMSO/Ethanol) présent dans les extraits.

Concernant les trois GR (GR(A), GR(N),et GR(Nect)) fraîches présentent un effet bactéricide uniquement sur *S.aureus* ATCC 43300 et non pas *E.coli* ATCC 25922, à l'exception de la GR(D) qui n'a eu aucun effet sur les deux souches testées. Ceci nous mène à dire que la nutrition peut avoir un effet sur l'activité antimicrobienne de la GR.

Plusieurs études démontrent l'efficacité de la GR dans l'activité antibactérienne. Nos résultats sont en accord avec plusieurs auteurs. Des auteurs justifient l'efficacité de la GR dans l'activité antibactérienne à la période de collecte (ATTALLA, 2007). En effet, la GR (Nect) qui a été collectée en 2018 présente une zone d'inhibition plus importante que celle à base de sucre nouvelle (2018) et de sucre ancienne(2017).

ABD-ALLA *et al.*, (1995) ont indiqué que la GR de 3<sup>ème</sup> jour de greffage a donné la plus haute activité par rapport à d'autres collections, ils ont constaté que l'organisme le plus sensible était *S.aureus* suivi par *B.subtilis* et *E.coli*.

D'après les résultats de COUTINHO *et al.*, (2018), la GR a montré des effets inhibiteurs clairs contre une variété de bactéries et à des concentrations similaires. Ces auteurs ont démontré des effets inhibiteurs différents sur différentes souches. Les effets inhibiteurs sur *Porphyromonasgingivali* et *Prevotellaintermédia* à différentes concentrations ont démontré une similitude simultanée, alors que des concentrations plus élevées étaient nécessaires pour inhiber la croissance d'*Aggregatibacter* et *Fusobacteriumnucleatum*.

De plus, la diminution de l'activité antibactérienne dépend de la température de stockage conformément aux résultats d'une étude antérieure. La gelée royale a été stockée à +5°C, +37°C et -40°C pour des tests antibiotiques avec *B .subtilis* et *S .aureus* et une activité décroissante a été observée à +5°C (YATSUNAMI et ECHIGO, 1985).

## ***Conclusion générale***

### Conclusion générale

La gelée royale est une substance naturelle considérée comme une des produits les plus importants des abeilles mellifères avec des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et biologiques élevées.

Les résultats d'analyse phytochimique ont montré que la gelée royale est riche en sucres en flavonoïdes avec des quantités faibles en coumarines.

Les résultats d'analyses physico-chimiques indiquent que la nutrition n'a pas un effet sur les paramètres (pH, humidité, taux de cendres, acidité, acide ascorbique et viscosité) des quatre gelées analysées. Cependant, les paramètres (sucres totaux, sucres réducteurs, saccharose, polyphénols totaux, concentration en flavonoïdes, minéraux) sont présents à des teneurs variables influencées par le type de nutrition, mais aussi par d'autres facteurs externes tels que l'environnement, les différentes origines botaniques et géologiques et, dans une certains cas, des facteurs internes tels que les facteurs biologiques liés aux abeilles.

Les résultats de l'activité antimicrobienne montrent que les deux extraits des différentes GR lyophilisées préparés en utilisant le DMSO et l'éthanol n'exercent aucun effet inhibiteur contre les deux souches testées *S.aureus* ATCC 43300 et *E.coli* ATCC 25922. Concernant les trois GR (GR(A), GR(N), et GR(Nect)) fraîches présentent un effet bactéricide uniquement sur *S.aureus* ATCC 43300 et non pas *E.coli* ATCC 25922, à l'exception de la GR(D) qui n'a eu aucun effet sur les deux souches testées. Ceci nous mène à dire que la nutrition peut avoir un effet sur l'activité antimicrobienne de la GR, mais aussi peut être attribuée à d'autres facteurs (la période de collecte, climat, la méthode de stockage ...).

Comme perspectives, il est intéressant d'utiliser des méthodes plus performantes pour mieux caractériser la gelée royale (HPLC) et d'autres facteurs peuvent être étudiés pour voir leur effet sur la composition physico-chimique de cette dernière.

*Références  
bibliographiques*

### Références bibliographiques

**ABD-ALLA M-S., MISHREF A. et GHAZI I-M. (1995).** Antimicrobial potency of royal jelly collected from queen cells at different larval ages. *Annals of Agric Sci*, 40(2): 597-608.

**AMIGOU M. (2016).** Les résidus de médicaments vétérinaires et de pesticides dans les produits apicoles alimentaires (Miel, Pollen, Gelée royale et Propolis). Thèse de doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort, Paris.

**ATTALLA K-M., OWAYSS A-A. et MOHANNY K-M. (2007).** Antibacterial activities of bee venom, propolis, and royal jelly produced by three honey bee *Apis mellifera* L. hybrids reared in the same environmental conditions. *Annals of Agric Sci*, 45(2):895-902.

**BABIN M. (2015).** La gelée royale de son origine à sa valorisation pharmaceutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de médecine, Angers.

**BALKANSKA R., MARGHITAS L-A. et PAVEL C-I. (2017).** Antioxidant activity and total polyphenol content of royal jelly from Bulgaria. *IJCMAS*, 6: 578-585.

**BALKANSKA R., ZHELYAZKOVA I., IGNATOVA M. et KASHAMOV B. (2013).** Effect of supplementary honey and artificial sugar feeding of bees on the composition of royal jelly. *JAST*, 5: 335-343.

**BARNUTIU L.I., AL. MARGHITAS L., DEZMIREAN D.S., MIHAI C.M. et BOBIS O. (2011).** Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly – Review. *J Anim Sci Biotechnol*, 44: 67–72.

**BENAHMED-DJILALI A. (2012).** Analyse des aptitudes technologiques de poudre de dattes (*Phoenix-dactylifera.l*) améliorées par la spiruline. Etude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactérienne. Thèse de doctorat en génie des procédés. Université M'hamed Bougara, Boumerdes.

**BENAHMED-DJILALI A., CHEMOUL T., KAL S., NABIEV M. et BESOMBES C. (2017).** Propriétés d'une pommade antibactérienne formulée à base de saponines extraites des feuilles de noyer. *Phytothérapie*, 1-9.

**BERKANI M-L. (2008).** Etude des paramètres de développement de l'apiculture algérienne. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Institut National Agronomique, Alger.

**BIRI M. (2002).** Le grand livre des abeilles : cours d'apiculture moderne, Edition De Vecchi. 256p.

## Références bibliographiques

---

- BIRI M. (2011).** Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. Edition De Vecchi. 295p.
- BOSELLI E., CABONI M., SABATINI A., MARCAZZAN G. et LERCKER G. (2003).** Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*, 34: 129-137.
- BRADBEAR N. (2005).** Apiculture et moyens d'existence durable. 55p.
- BRAVO L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56: 317-333.
- BRUNEAU E. (2002).** Chapitre IX : Les produits de la ruche., *In* : Clément H. Traite rustica de l'apiculture. Editions Rustica, Paris, p 274-388.
- CHALAH K. (2012).** Influence de l'ajout des polymères (PAC, HEC) et de la température sur le comportement rhéologique et les propriétés électrocinétiques des fluides des forages à base d'eau. Mémoire de magistère en sciences et génie des matériaux. Université de M'hamed Bougara, Boumerdes.
- CLEMENT H. (2009).** Créer son rucher. Editions Rustica. Paris. 111p.
- COUTINHO D., KARIBASAPPA S-N. et MEHTA S-D. (2018).** Royal jelly antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *J Interdiscip Dentistry*, 8:18-22
- DINKOV D., STRATEV D., BALKANSKA R., SERGELIDIS D. ET VASHIN I. (2016).** Reduction effect of royal jelly and rape honey alone and in combination against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) strains. *J Bacteriol Virol*, 46(1): 36-43.
- DRIDI F. (2005).** Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin. Formulation d'une pommade décongestionnante. Mémoire de fin d'étude. Université M'hamed Bougherra, Boumerdes.
- DUBOIS C., BALLE F., BENOIT M. et al. (1986).** Petit Larousse en couleurs. Editions Larousse, 1665p.
- FONTANA R., MENDES M-A., DE SOUZA B-M., KONNO K., CÉSAR L-M., MALASPINA O. et PALMA M-S. (2004).** Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25: 919-928,
- GAO H., CHENG N., JIA Q., WANG B-N., DENG J-J. et CAO W. (2011).** In vitro antioxidant activity of lyophilized rape RJ. *Food Science*, 32: 52-55.

## Références bibliographiques

---

- GARCIA-AMOEDO L-H. et ALMEIDA-MURADIAN L-B. (2007).** Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Quím. Nova*, 30: 257-259.
- GHANBARI E., VAHID N., GHOLAMREZA N., MOZAFAR K., et BABAEI M. (2015).** Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Fertil Steril*, 9: 113-120.
- GHARBI M. (2011).** Les produits de la ruche : Origines-Fonctions naturelles-Composition-Propriétés thérapeutiques-Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire. Université Claude-Bernard, Lyon.
- IZUTA H., CHIKARAISHI Y., SHIMAZAWA M., MISHIMA S. et HARA H. (2009).** 10-hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *eCAM*, 6: 489-494.
- JEAN-PROST P. (2005).** Apiculture : connaître l'abeille, conduire le rucher. 7<sup>ème</sup> Edition LAVOISIER. Paris. 689p.
- KOHNO K., OKAMOTO K., SANO O., ARAI N., IWAKI K., IKEDA M. et KURIMOTO M. (2004).** Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 68(1): 138-145.
- KRELL R. (1996).** Royal jelly. In Value-added products from bee keeping. Rome. p 195-219.
- KUCUK M., KOLAYLI S., KARAOGLU S., ULUSOY E., BALTACI C. et CANDAN F. (2007).** Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*, 100 : 526-534.
- LE CONTE Y. (2002).** Chapitre I : Mieux connaître l'abeille. In Clément H. *Traite rustica de l'apiculture*. Editions Rustica, Paris, p 12-51.
- LERCKER G., CABONI M-F., VECCHI M-A., SABATINI A-G. et NANETTI A. (1992).** Characterization of the main constituents of royal jelly. *Apicoltura*, 8: 27-37.
- LIU J-R., YANG Y-C., SHI L-S. et PENG C-C. (2008).** Antioxidant properties of royal Jelly associates with larval age and time of harvest. *J. Agric.FoodChem*, 56(23) : 11447-11452.
- LOUVEAUX J. (1996).** Les abeilles et l'apiculture: Chronique historique de la Zoologie agricole française. Edition Quae, 95p.

## Références bibliographiques

---

**MORITA H., IKEDA T., KAJITA K., FUJIOKA K., MORI I., OKADA H., UNO Y. et ISHIZUKA T. (2012).** Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers. *Nutr J*, 11:1-7.

**NABAS Z., HADDADIN M., HADDADIN J. et NAZER I-K. (2014).** Chemical composition of royal jelly and effects of synbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activitie. *Polish. J. FoodNutr. Sci*, 64: 171-180.

**NAGAI T. et INOUE R. (2004).** Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem*, 84(2) : 181-186.

**OLIMPIA P., MĂRGHITAS L-A., DEZMIREAN D-S., MURESAN O-L., LASLO L. (2008).** A characterization about physical-chemical composition of royal jelly. *bull univ agric sci vet med cluj napoca*, 65(1-2): 244-248.

**PAVEL C-I., MĂRGHITAȘ L-A., DEZMIREAN D-S., TOMOȘ L-I., BONTA V., ȘAPCALIU A. et BUTTSTEDT A.(2014).** Comparison between local and commercial royal jelly: use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *J.Apic. Res*, 53(1): 116-123.

**PETERSON P-D. (2008).** L'apiculture. Edition Quae, 149p.

**PHILIPPE J-M. (2007).** Le guide de l'apiculteur. Edition Edisud, 319p

**RAVAZZI G. (2007).** Abeilles et apiculture. Edition de Vecchi, 159p.

**RIGAL M-L. (2012).** Miel et gelée royale : utilisation thérapeutique dans le domaine cutanée et application en cosmétologie. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges-Faculté de pharmacie, Limoges.

**SABATINI A-G., MARCAZZAN G-L., CABONI M-F., BOGDANOV S., ALMEIDA-MURADIAN L-B. (2009).** Quality and standardisation of Royal Jelly. *JAAS*, 1(1): 1-6.

**SESTA G. (2006).**Determination of sugars in royal jelly by HPLC. *Apidologie*, 37: 84-90.

**SESTA G., PERSANO-ODDO L., NISI F. et RICCI L. (2006).** Effect of artificial sugar feeding on sugar composition of royal jelly. *Apiacta*, 41: 60-70.

**SIAVASH M., SHOKRI S., HAGHIGHI M., MOHAMMADI M., SHAHTALEBI M-L. et FARAJZADEHGAN Z. (2011).** The efficacy of topical royal Jelly on diabetic foot ulcers healing: A case series. *Int J Res Med Sci*, 16: 904-909.

**STOCKER A. (2003).** Isolation and characterization of substances from Royal Jelly. Thèse de docteur-ingénieur en Biophysique moléculaire. Université d'Orléans, Orléans.

## Références bibliographiques

---

**TOKUNAGA K-H., YOSHIDA C., SUZUKI K-M., MARUYAMA H., FUTAMURA Y., ARAKI Y. et MISHIMA S. (2004).** Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*, 27: 189-192.

**VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERANDEZ-LOPEZ J. et PEREZ-ALVARES J-A. (2008).** Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J.Food sci*, 73(9):117-124.

**WONGCHAI V. et RATANAVALACHAI T. (2002).** Seasonal variation of seasonal composition of royal jelly produced in Thailand. *TIJSAT*, 7: 1-8.

**YATSUNAMI K. et ECHIGO T. (1985).** Antibacterial action of royal jelly. *Bull Fac Agr*, 25: 13-22.

### Webographie:

**BOGDANOV S. (2016).** Royal jelly and brood: harvest, composition, quality, [en ligne]. (2016) Adresse URL: <https://www.researchgate.net/publication/304012318> (consultée le 16/6/2016).

**BOGDANOV S. (2016).** Royal jelly and bee brood: harvest, composition, quality I, [en ligne]. (2016) Adresse URL: <https://www.researchgate.net/publication/304012235> (consultée le 16/6/2016).

**MATEESCU C. (2016).** Les produits de sécrétion et leurs rôles dans la colonie d'abeilles, [en ligne]. Adresse URL: <https://www.researchgate.net/publication/237480596> (consultée le 25/2/2016).

<http://www.ikonet.com/> : Castes. **ANONYME1.**

<https://www.aux-delices-du-miel.fr/> : Larve baignant dans la gelée royale. **ANONYME2.**

<http://www.encyclopedie-universelle.net/> : Les glandes salivaires. **ANONYME3.**

<http://www.cheze-lles-gelee-royale-france.com/> : La Récolte de la gelée royale. **ANONYME4.**

# *Annexes*

**Annexe 1 :** tableaux de tous les appareillages verrerie solvant, etc. utilisés dans les parties physicochimique et microbiologique.

**Tableau I :** Appareillage, verrerie, solvants et réactifs chimiques utilisées dans la partie physicochimique.

Appareillage	Agitateur magnétique (DENVER INSTRUMENT) Balance de précision 0,001g (KERN 770) Bain-marie (SELECTA) Etuve (Memmert) Four à moufle 30-3000°C (Nabertherm) pH mètre (inoLab) Plaque chauffante(SELECTA) Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU, Japon) Réfrigérateur (ENIEM) Viscosimètre VT 550 Spectroscope infrarouge (BRUCKER) Réfractomètre (Brix 0-90%) (Annexe 3)
Solvants et réactifs chimiques	Eau distillée, Chloroforme, Ammoniac, HCl, Eau bi-distillée, Amidon Iode, Ethanol, KOH, Ether, Eau de robinet, Bleu de méthylène Chlorure de fer FeCl <sub>3</sub> Acétate de sodium (CH <sub>3</sub> COONa) Copeau de Mg Alcool iso-butanol Hydroxyde de sodium NaOH Réactif de Dragendroff Acide chlorhydrique Phénolphtaléine Sulfate de sodium anhydre (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O) Deux Solution tampon (pH=7et pH=4) Acétate de plomb Fehling A, Fehling B Acide sulfurique H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Réactif de Folin-ciocalteu Carbonate de sodium Trichlorure d'aluminium AlCl <sub>3</sub>
Verrerie	Béchers, Erlenmeyers, Entonnoir, Burettes, Eprouvettes, Passoires Fiоле conique, Fiоле jaugée Tubes à essai fermés Creusets en porcelaine Verres de montres Papier filtre, Spatules, Cuves

**Tableau II** : Appareillages, matériel, solution et milieux de cultures utilisées dans la partie microbiologique.

Appareillages	Bain marie Etuves bactériologiques
Matériel	Anse de platine Bec bunsen Boîtes de Pétri Disques stériles (papier wattmann) Ecouillons Embouts en plastiques stériles Micro filtres stériles Micropipettes Pince Pipette pasteur Portoirs pour tubes Tubes à essai fermés
Solution	DMSO Eau distillé Eau physiologique Ethanol
Milieux de cultures	Milieu MH

## Annexe 2



**Figure 01** : Flacon de GR (10g).

**Annexe 3 :** Tableau expliquant les étapes de préparation du sirop de dattes variété «*Mech Degla*» utilisé pour l'alimentation des abeilles pour la production de la GR(D).

**Tableau I :** Etapes de Préparation de sirop de dattes.

Etapes de préparation	Photographie
Rincer les dattes de variétés « <i>Mech Degla</i> » à eau abondante.	
Découper les dattes en petits morceaux	
Dans un erlenmeyer on ajoute une quantité d'eau pour deux quantités de dattes coupées	
Faire chauffer le contenu de l'erlenmeyer au bain marie à 65°-70°C jusqu'à obtenir un sirop riche (27% Brix)	
Filtrer le sirop en utilisant une passoire.	
Le sirop est conservé au réfrigérateur dans des bouteilles en verres fermées.	

GR(D) : Gelée royale issues d'abeilles nourries en sirop de dattes

**Annexe 4 :** Figure de l'appareil "Réfractomètre" utilisé pour la mesure en degrés Brix de la fraction de saccharose dans un liquide, c'est-à-dire le pourcentage de matière sèche soluble.



**Figure 1 :** Réfractomètre (Brix 0-90%) à  $T^{\circ}=20^{\circ}\text{C}$

Annexe 5 : Figures des courbes étalon pour le dosage des flavonoïdes et des PPT.

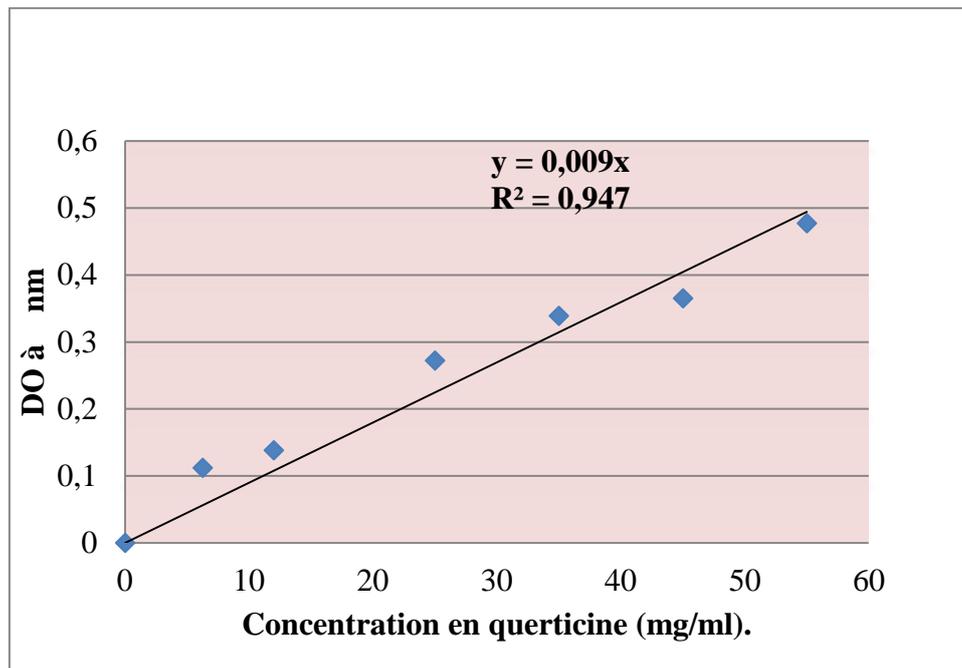


Figure 1 : Courbe étalon pour le dosage des Flavonoïdes.

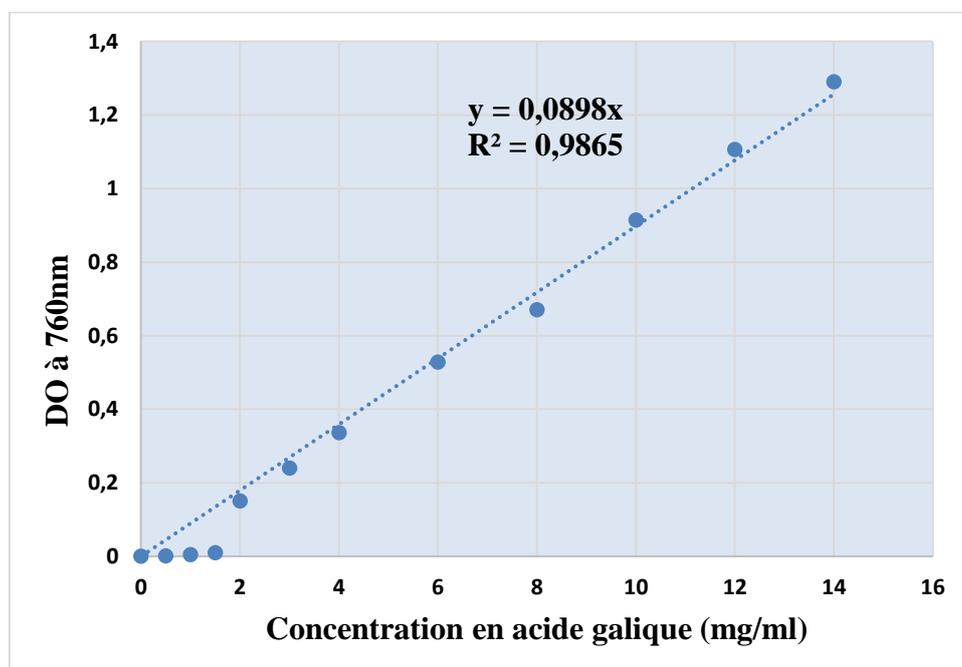
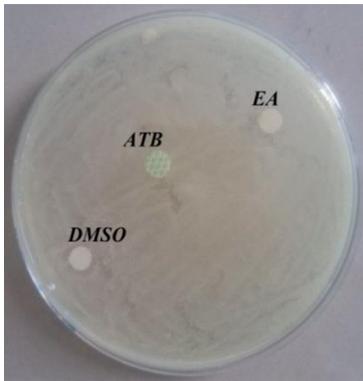
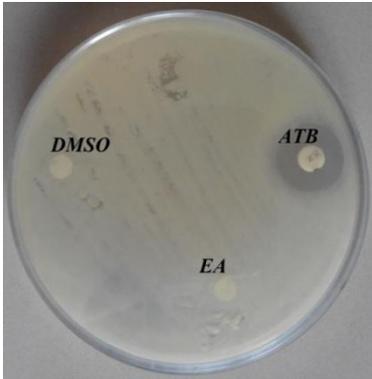
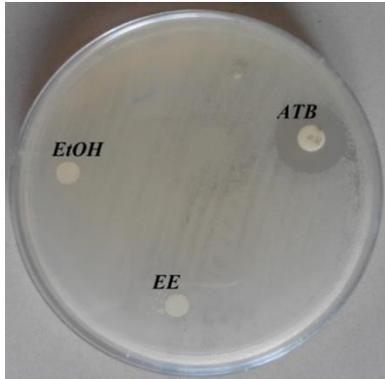


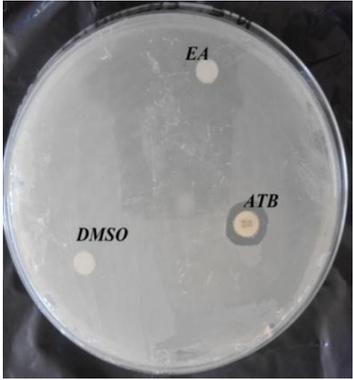
Figure 2 : Courbe étalon pour le dosage des PPT.

**Annexe 6 :** Les tableaux de I à IV et la figure 1 représentent des résultats des tests de sensibilité des souches *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 43300 vis-à-vis les différents extraits des gelées royales lyophilisées et des GR fraîches respectivement.

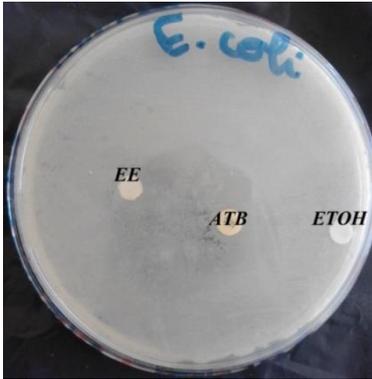
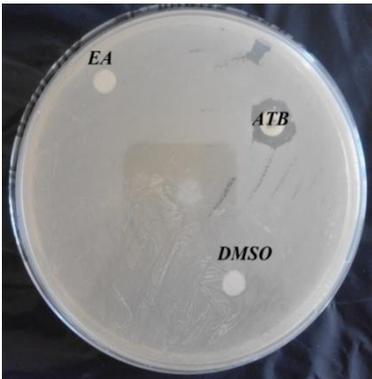
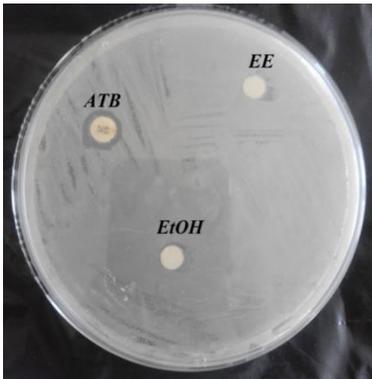
**Tableau I:** Résultats du test de sensibilité en photos des souches *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis extraits de GR sucre ancienne lyophilisée.

		Souches	Extrait aqueux	Extrait éthanolique
GR issue de la nourriture en Sucre récoltée en 2017	<i>E.coli</i> ATCC 25922			
	<i>S.aureus</i> ATCC 43300			

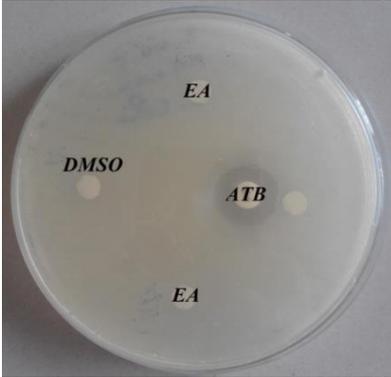
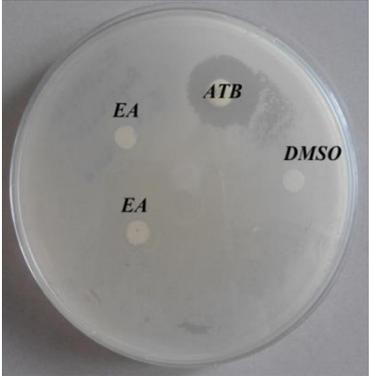
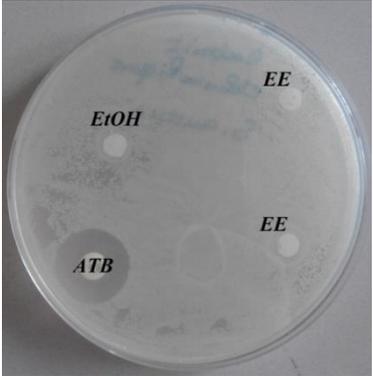
**Tableau II :** Résultats du test de sensibilité en photos des souches *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis extraits de GR sucre nouvelle lyophilisée.

	Souches	Extrait aqueux	Extrait éthanolique
GR issue de la nutrition en sucre Récoltée en 2018	<i>E. coli</i> ATCC 25922		
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300		

**Tableau III** : Résultats du test de sensibilité en photos des souches *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis extraits de GR Dattes lyophilisée.

	Souches	Extrait aqueux	Extrait éthanoLique
GR issue de la nutrition par le sirop de Dattes	<i>E. coli</i> ATCC 25922		
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300		

**Tableau IV** : Résultats du test de sensibilité en photos des souches *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis extraits de GR Nectar lyophilisée.

		Souches	Extrait aqueux	Extrait Ethanolique
GR issue de la nutrition par le Nectar	<i>E. coli</i> ATCC 25922			
	<i>S. aureus</i> ATCC 43300			

**Figure 1** : Résultats du test de sensibilité en photos des souches *E. coli* et *S. aureus* vis-à-vis des quatre GR fraîches.

