

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou**  
**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**  
**Département des Sciences Alimentaire**



## **Mémoire de fin de cycle**

En vue de l'obtention de diplôme du Master en Sciences Alimentaire

**Option : Sécurité Agro-alimentaire et Assurance Qualité**

### **Thème**

**L'opercule d'abeille : évaluation de son  
potentiel comme agent de biopréservation  
naturelle en sécurité agroalimentaire**

**Réalisé par : Mme Lamhene Lisa eps Belhadj & Mlle Hadj-Amar Ouissem**

**Devant le jury composé de**

**Présidente : Mme REMANE Y            MCB**

**Examinatrice : Mme DOUFENE I    MCB**

**Encadrant : M BENGANA M            MCB**

**Promotion 2024 – 2025**

## **Remerciement**

Avant tout, je rends grâce à Dieu Tout-Puissant qui m'a donné la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon encadreur **Mr BENGANA** pour son accompagnement, ses conseils précieux et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à mon époux **Massinissa** pour son soutien indéfectible, sa compréhension et ses encouragements constants, ainsi qu'à ma petite princesse **Nelia**, source de motivation et de bonheur au quotidien. Leur amour et leur patience ont été ma plus grande force durant cette période exigeante.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à ma famille, ma belle-famille, mes amis et toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

**Lamhene Lisa eps Belhadj**

## Remerciement

Je tiens à exprimer mes sincère gratitude à mon encadrant **BENGANA** pour son accompagnement précieux, sa patience et ses conseils avisés tout au long de ce travail.

Merci également aux laboratoires de département biologie et agroalimentaire pour l'accès à ses équipements et son soutien technique.

je souhaite également remercier **Mme Benmallem Remane yakout** et **Mme Doufen Iman** les membres de jury, pour leur temps, leur implication et leurs remarques pertinentes.

J'suis reconnaissante de l'opportunité qu'ils nous ont offerte de présenter le travail devant eux.

Je remercie aussi ma mère pour son soutien indéfectible durant cette période d'étude.

également mes collègues et ami(e)s, pour leur amitié, leur soutien moral et leurs encouragements. Leurs discussions et leurs conseils m'ont permis de surmonter les moments de doute et de trouver la motivation

**Hadj-amar Ouissem**

## **Résumé :**

L'opercule d'abeille : évaluation de son potentiel comme agent de biopréservation naturelle en sécurité agroalimentaire  
Domaine : M2 Sécurité Agroalimentaire et Assurance Qualité. Ce mémoire a pour objectif d'évaluer le potentiel de l'opercule d'abeille en tant qu'agent de biopréservation naturel, par la quantification de ses composés phénoliques et flavonoïdiques, reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été déterminées par spectrophotométrie UV-visible, selon les réactifs suivant (Folin-Ciocalteu et chlorure d'aluminium) . Les résultats révèlent des concentrations notables, notamment en flavonoïdes, suggérant une activité biopréservatrice prometteuse pour des applications en industrie agroalimentaire. Cette étude propose ainsi une alternative naturelle aux conservateurs synthétiques, en phase avec les attentes actuelles en matière de sécurité sanitaire et de naturalité. La démarche s'inscrit dans une logique d'assurance qualité et ouvre des perspectives pour la valorisation des co-produits apicoles.

## **Summary:**

Food Safety Domain: M2 Food Safety and Quality Assurance This thesis aims to evaluate the potential of bee bread as a natural biopreservation agent by quantifying its phenolic and flavonoid compounds, recognized for their antioxidant and antimicrobial properties. Total polyphenol and flavonoid contents were determined by UV-visible spectrophotometry using (Folin-Ciocalteu and aluminum chloride). The results reveal notable concentrations, particularly in flavonoids, suggesting promising biopreservation activity for applications in the food industry. This study proposes a natural alternative to synthetic preservatives, in line with current expectations for sanitary safety and naturalness. The approach is part of a quality assurance logic and opens up perspectives for the valorization of apicultural co-products.s in the food industry.

# Sommaire :

## Remerciements

## Résumé

Introduction générale.....	13
----------------------------	----

### Chapitre 1 : Les produits de la ruche

1. Le miel.....	14
2. Le pollen.....	15
3. La gelée royale.....	15
4. La propolis.....	16
5. Le pain d'abeille.....	17
6. La cire d'abeille.....	17
7. Le venin d'abeille.....	18

### Chapitre 2 : Les opercules

2.1 Définition et rôle des opercules.....	19
2.2 Les opercules issus de l'extraction du miel.....	19
2.2.1 Processus de production du miel et rôle des opercules.....	19
2.2.2 Techniques de désoperculation.....	19
2.2.3 Estimation de la proportion des opercules dans la production de miel.....	20
2.2.4 Valorisation des opercules de miel.....	20
2.3 Les opercules issus de la production de gelée royale.....	21
2.3.1 Processus de production de la gelée royale.....	21
2.3.2 Techniques de récupération.....	21
2.3.3 Estimation de la proportion des opercules dans la production de gelée royale.....	21
2.3.4 Valorisation des opercules de gelée royale.....	22

2.4 Comparaison entre les deux types d'opercules.....	22
2.5 Conclusion.....	23

### Chapitre 3 : Caractéristiques, composition et propriétés des opercules

3.1 Introduction.....	24
3.2 Caractéristiques physiques des opercules.....	24
3.2.1 Définition et origine.....	24
3.2.2 Morphologie et aspect visuel.....	24
3.2.3 Propriétés mécaniques et thermiques.....	25
3.2.4 Facteurs de variation physique.....	25
3.3 Composition chimique des opercules.....	25
3.3.1 Constituants majoritaires.....	25
3.3.2 Composants bioactifs spécifiques.....	25
3.3.3 Facteurs influençant la composition.....	26
3.4 Propriétés biologiques des opercules.....	26
3.4.1 Activité antimicrobienne.....	26
3.4.2 Activité antioxydante.....	26
3.4.3 Activité anti-inflammatoire.....	27
3.4.4 Activité immunostimulante.....	27
3.4.5 Activité cicatrisante et dermatologique.....	27
3.5 Applications et perspectives.....	27
3.5.1 Domaine alimentaire.....	27
3.5.2 Domaine pharmaceutique.....	27
3.5.3 Domaine cosmétique.....	28
3.5.4 Défis scientifiques.....	28
3.6 Conclusion.....	28

### Chapitre 4 : Utilisation des opercules dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et autres

4.1 Introduction.....	29
4.2 Applications dans l'industrie alimentaire.....	29

4.2.1 Chewing-gum naturel.....	29
4.2.2 Compléments alimentaires.....	29
4.2.3 Conservateur naturel.....	30
4.3 Applications dans l'industrie pharmaceutique.....	30
4.3.1 Propriétés antimicrobiennes et antivirales.....	30
4.3.2 Compléments de soins respiratoires.....	30
4.3.3 Cicatrisation et dermatologie médicale.....	30
4.3.4 Recherche pharmaceutique et biotechnologique.....	31
4.4 Applications dans l'industrie cosmétique.....	31
4.4.1 Produits de soin de la peau.....	31
4.4.2 Produits capillaires.....	31
4.4.3 Produits d'hygiène.....	31
4.5 Applications dans d'autres domaines.....	31
4.5.1 Industrie chimique et technologique.....	31
4.5.2 Agriculture et apiculture.....	32
4.5.3 Médecine traditionnelle et bien-être.....	32
4.6 Potentiel économique et perspectives.....	32
4.6.1 Valorisation d'un sous-produit.....	33
4.6.2 Marché en pleine expansion.....	32
4.6.3 Défis et limites.....	32
4.7 Conclusion.....	33

## Partie II : Partie expérimentale

### Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique et chimique.....	35
1.1 Matériel biologique.....	35
1.2 Matériel chimique et solvants.....	35
2. Protocoles expérimentaux.....	36
A. Préparation et extraction des composés bioactifs.....	36

B. Dosages biochimiques.....	38
1. Dosage des polyphénols totaux (Folin-Ciocalteu).....	38
2. Dosage des flavonoïdes totaux ( AlCl <sub>3</sub> ).....	38
C. Analyse antimicrobienne.....	39
1. Préparation des inoculums.....	39
2. Test de diffusion sur gélose (antibiogramme).....	39
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	40
4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	40
3. Analyse statistique.....	40

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

1. Teneurs en polyphenols .....	41
2. Teneurs en flavonoïdes .....	41
3. Comparaison entre les teneurs moyennes (mg/ml) en polyphenols et en flavonoïdes.....	42
4. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	44
a) Staphylococcus aureus.....	44
b) Escherichia coli.....	45
c) Pseudomonas aeruginosa.....	46
d) Discussion.....	47
e) Analyse des résultats et détermination de la CMI.....	47
f) Conclusion.....	48
Conclusion générale.....	49
Annexe .....	50
Références bibliographiques.....	55

## Liste des abréviations

- PP : polyphénols.
- FV : Flavonoïdes .
- g : gramme.
- mg : milligramme
- CMI : la Concentration Minimale Inhibitrice.
- E1,E2,E3 : 3 échantillons d'opercule d'abeille ; 3 extraits .
- UV : Ultraviolet, faisant référence aux rayons ultraviolets utilisés pour mesurer l'absorption de la lumière dans la spectrophotométrie.
- nm : nanomètre.
- min : minute.
- µl : microlitre.
- DO : densité optique.
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium.
- AlCl<sub>3</sub> : chlorure d'aluminium .
- EAG : équivalent d'acide gallique.
- EQ :la quercétine .
- MH : Mueller-Hinton.
- °C : degré Celsius (unité de mesure de la température).
- *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*.
- *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

## Liste des figures :

<b>Figure 01.</b> Courbe d'étalonnage des polyphénols.....	48
<b>Figure 02.</b> Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	49
<b>Figure 03.</b> Préparation des Extraits des composés bioactifs .....	50
<b>Figure 04.</b> Dosage des polyphénols .....	51
<b>Figure 05.</b> Dosage des flavonoïdes .....	51
<b>Figure 06.</b> Analyses Anti microbienne .....	52

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 01.</b> Comparaison entre les deux types d'opercules.....	21
<b>Tableau 02.</b> Teneur en polyphénols (PP) .....	40
<b>Tableau 03.</b> Teneur en polyphénols (FV) .....	41
<b>Tableau 04.</b> Comparaison entre les teneur moyennes (mg/ml) en polyphénols et en flavonoïdes.....	41
<b>Tableau 05 :</b> Évaluation des résultats de l'activité antimicrobienne .....	43-44

## **Introduction générale**

Dans un contexte mondial marqué par la demande croissante en aliments sains et sûrs, la recherche d'alternatives naturelles aux conservateurs synthétiques devient une priorité (Alvarez-Suarez et al., 2018). Les produits chimiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire, bien qu'efficaces, soulèvent des préoccupations quant à leurs effets sur la santé humaine (toxicité, résistance microbienne) et l'environnement (Bogdanov, 2017). Parallèlement, les consommateurs privilégient de plus en plus les ingrédients d'origine naturelle, stimulant ainsi l'exploration des ressources biologiques comme les produits de la ruche.

Les colonies d'abeilles produisent en plus du miel, qu'est le produit principal de la ruche, d'autres produits tels que le pollen, la propolis, le venin et la gelée royale. La production de la gelée royale génère deux sous produits de hautes valeurs biologiques : les larves royales et les opercules royales. Ces dernières jouent un rôle de protection des larves et de leur nourriture, la gelée royale.

Dans la perspective de valoriser les opercules dans les domaines : alimentaire, cosmétique et pharmaceutique, la caractérisation des activités antioxydantes et antimicrobiennes semblent nécessaires. C'est dans cette optique que cette étude a été menée.

# Chapitre I : Les produits de la ruche

## 1.1. Le miel

### 1.1.1. Définition

Le miel est une substance sucrée, naturelle et complexe, produite par les abeilles à partir du nectar des fleurs ou du miellat. Selon la définition du Codex Alimentarius, il s'agit du produit que les abeilles fabriquent, transforment et stockent dans les rayons de la ruche pour leur alimentation (*Da Silva et al, 2016*).

### 1.1.2. Composition

Le miel contient principalement des glucides simples (fructose ~38 %, glucose ~31 %), de l'eau (15 à 20 %), des enzymes (invertase, diastase, glucose oxydase), des acides organiques, des protéines, des minéraux (potassium, calcium, magnésium, fer), des vitamines (C, B1, B2, B6, acide nicotinique, acide pantothénique) ainsi que de nombreux composés phénoliques et flavonoïdes (*Da Silva et al, 2016*).

### 1.1.3. Propriétés

Selon Yaghoobi et al., 2013, le miel a un ensemble de propriétés très bénéfiques :

- Énergétique : riche en sucres simples rapidement assimilables.
- Antibactérien et antiseptique : grâce à la production de peroxyde d'hydrogène et aux composés phénoliques.
- Cicatrisant : utilisé en application locale sur les plaies et brûlures.
- Antioxydant : protège les cellules contre le stress oxydatif.
- Digestif : facilite le transit et protège la flore intestinale

## 1.2. Le pollen

### 1.2.1. Définition

Le pollen est constitué des grains microscopiques produits par les anthères des fleurs et récoltés par les abeilles. Les abeilles les agglutinent en pelotes qu'elles ramènent à la ruche comme source principale de protéines (*Campus et al., 2008*).

### **1.2.2.Composition**

Il est riche en protéines (20 à 30 %), acides aminés essentiels, glucides (20 à 40 %), lipides (1 à 13 %), vitamines (B1, B2, B6, C, E), minéraux (fer, zinc, cuivre, magnésium, calcium) ainsi que des enzymes et pigments (*campus et al ., 2008*).

### **Propriétés**

- Stimulant général : augmente la vitalité et réduit la fatigue.
- Régulateur digestif : améliore la flore intestinale.
- Antioxydant et immunostimulant : renforce les défenses naturelles.

Hypocholestérolémiant : régule le taux de lipides sanguins (*campus et al ., 2008*).

## **1.3. La gelée royale**

### **1.3.1.Définition**

La gelée royale est une sécrétion produite par les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires des jeunes abeilles nourrices. C'est l'aliment exclusif de la reine durant toute sa vie, ce qui explique sa longévité exceptionnelle comparée aux ouvrières (*Ramirez et al ., 2017*).

### **1.3.2.Composition**

Elle contient environ 60 à 70 % d'eau, 10 à 18 % de protéines (dont les protéines majeures de la gelée royale, MRJP), 10 à 15 % de glucides, 3 à 6 % de lipides (notamment l'acide 10-HDA, caractéristique de la gelée), des vitamines (B1, B2, B5, B6, acide folique), des minéraux et des oligo-éléments (*Gratin et al ., 2016*).

### **1.3.3. Propriétés :**

- Stimulant métabolique et tonifiant.
- Action sur la longévité et la vitalité.
- Effet immunomodulateur et anti-inflammatoire.

- Amélioration de la fertilité et soutien hormonal.
- Potentiel neuroprotecteur selon certaines études récentes. (**Ramirez et al.,2020 ; Margaoan et à., 2019**) .

## **1.4. La propolis**

### **1.4.1.Définition**

La propolis est une résine végétale récoltée par les abeilles sur les bourgeons et écorces d'arbres, puis enrichie de sécrétions salivaires et de cire. Elle est utilisée pour colmater les fissures de la ruche et protéger la colonie contre les microbes (*Wagh, 2013*).

### **1.4.2. Composition**

Elle renferme 50 % de résines et baumes, 30 % de cire, 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et divers composés phénoliques (flavonoïdes, acides aromatiques) (*Hossain et al., 2022*).

### **1.4.3. Propriétés**

- Antibactérienne, antivirale et antifongique.
- Anti-inflammatoire et cicatrisante.
- Antioxydante et immunostimulante.
- Utilisée en médecine dentaire (gingivites, aphtes) (*Zulhendri et al., 2021*).

## **1.5. Le pain d'abeille**

### **1.5.1. Définition**

Le pain d'abeille est le pollen stocké dans les alvéoles de la ruche, mélangé à du miel et des sécrétions salivaires, puis soumis à une fermentation lactique naturelle.

### **1.5.2. Composition**

Il contient environ 20 % de protéines, 50 à 60 % de glucides, 3 à 5 % de lipides, des vitamines et des minéraux.

### **1.5.3. Propriétés**

- Hautement assimilable grâce à la fermentation.
- Source d'énergie et de nutriments essentiels.
- Action probiotique et régulatrice de la flore intestinale.
- Recommandé pour les états de fatigue et de convalescence (*Strant .,2014*)

## **1.6. La cire d'abeille**

### **1.6.1. Définition**

La cire est sécrétée par les glandes cirières des jeunes abeilles. Elle sert à construire les rayons de la ruche où sont stockés le miel et le couvain (*Tulloch, 1980*).

### **1.6.2. Composition**

Elle est composée à 70 % d'esters d'acides gras et d'alcools, à 14 % d'hydrocarbures, et contient aussi des acides gras libres et des substances aromatiques (*Holloway et al., 1971*).

### **1.6.3. Propriétés**

- Utilisée en cosmétique et en pharmacie comme excipient.
- Protège et adoucit la peau.
- Sert à la fabrication de bougies, encaustiques et produits industriels.
- Propriétés anti-inflammatoires légères (*Nong ,Y .al .2023*).

## **1.7. Le venin d'abeille**

### **1.7.1. Définition**

Le venin d'abeille est une substance liquide produite par les glandes à venin de l'abeille ouvrière, injectée lors de la piqûre (*Sharaf, M. et al., 2019*).

### **1.7.2. Composition :**

Il contient des peptides (mélittine ~50 % du venin, apamine), des enzymes (phospholipase A2, hyaluronidase), des amines biogènes (histamine, dopamine) et divers acides organiques (*Sharaf et al., 2024*).

### **1.7.3. Propriétés**

- Effet anti-inflammatoire (utilisé en apithérapie contre l'arthrite et les rhumatismes).
- Stimulant du système immunitaire.
- Propriétés analgésiques et circulatoires.
- Actuellement étudié pour son potentiel anticancéreux (*Fratini et al., 2016*).

L'ensemble des produits de la ruche représente une richesse inestimable pour l'humanité. Leurs propriétés nutritionnelles, médicinales et industrielles expliquent l'intérêt croissant qu'ils suscitent dans de nombreux domaines. L'apithérapie, en particulier, témoigne d'un renouveau de la médecine naturelle, basée sur des substances biologiquement actives. Toutefois, leur utilisation doit rester encadrée et soutenue par des recherches scientifiques rigoureuses afin d'en confirmer l'efficacité et d'éviter tout risque d'effet secondaire.

## **Chapitre II : Les opercules**

### **2.1. Définition et rôle des opercules**

Les opercules sont de fines couches de cire produites par les abeilles pour fermer hermétiquement les alvéoles des rayons. Ces dernières peuvent contenir soit du miel arrivé à maturité, soit de la gelée royale destinée au développement des larves royales. Les opercules jouent donc un rôle de protection : ils assurent la conservation du contenu, limitent les pertes en eau, empêchent les contaminations extérieures et préservent la qualité des produits stockés (*Bagdanov 2004 ; Akcazer et al 2022*)

Du point de vue apicole, les opercules représentent un sous-produit d'une grande valeur, car leur composition associe de la cire d'abeille, des traces de miel et parfois des résidus de pollen et de propolis. Ces caractéristiques leur confèrent un intérêt particulier tant sur le plan nutritionnel que technologique (*Alaerjani et al., 2022*).

### **2.2. Les opercules issus de l'extraction du miel**

#### **2.2.1. Processus de production du miel et rôle des opercules**

Lorsqu'une colonie d'abeilles récolte le nectar, elle le stocke dans les alvéoles des rayons. Après un processus de transformation enzymatique et de déshydratation, le nectar devient du miel mûr. Les abeilles operculent alors les alvéoles avec une fine couche de cire afin de le protéger. L'apiculteur, lors de la récolte, doit retirer ces opercules pour accéder au miel. C'est à ce moment que les opercules de miel sont obtenus en quantité significative (*Alaerjani, W. M. A., & coll. (2022)*).

#### **2.2.2. Techniques de désoperculation**

Il existe différentes méthodes permettant de retirer les opercules (*Paweena, 2004*):

- **Désoperculation manuelle**

Réalisée avec un couteau à désoperculer ou une fourchette spéciale. Elle reste très utilisée dans les petites exploitations.

- **Désoperculation mécanique**

Les exploitations modernes emploient des désoperculeuses automatiques (à rouleaux, à chaînes ou à lames vibrantes). Ces machines garantissent un rendement élevé et homogène.

- **Désoperculation thermique**

Utilisation de couteaux chauffants ou de vapeur pour faciliter la coupe des opercules.

Les opercules ainsi obtenus contiennent environ 50 à 70 % de cire et 30 à 50 % de miel résiduel.

### **2.2.3. Estimation de la proportion des opercules dans la production de miel**

La proportion d'opercules dépend de plusieurs facteurs :

- l'épaisseur de la couche de cire utilisée par les abeilles ;
- la densité du rayon ;
- le mode de désoperculation choisi.

En moyenne, on estime que les opercules représentent 1,5 à 2,5 % du poids total du miel extrait. Ainsi, pour une récolte de 100 kg de miel, l'apiculteur obtient environ **1,5 à 2,5 kg d'opercules**.

### **2.2.4. Valorisation des opercules de miel**

Les opercules issus de l'extraction du miel sont considérés comme un produit de haute qualité car ils renferment une cire pure et non altérée. Après fonte et purification, cette cire est utilisée dans :

- la cosmétique (crèmes, baumes, rouges à lèvres),
- la pharmacie (onguents, pommades),
- l'alimentation (additif E901, glaçage, conservation),
- la fabrication de bougies et de produits artisanaux.

Le miel contenu dans les opercules peut être récupéré par pressage ou par centrifugation et réintégré dans la production.

## 2.3. Les opercules issus de la production de gelée royale

### 2.3.1. Processus de production de la gelée royale

La gelée royale est produite par les abeilles nourrices et déposée dans des cupules royales pour nourrir les larves. L'élevage de reines artificiel consiste à greffer de jeunes larves dans des cupules artificielles, puis à les laisser nourries par les abeilles. Après trois jours, la gelée royale est récoltée en retirant la larve et en aspirant le contenu des cellules.

Lors de cette opération, de fines couches cireuses ou **opercules spécifiques** sont aussi obtenues. Ces opercules de gelée royale sont beaucoup moins abondants que ceux issus du miel, mais leur composition est intéressante car ils renferment des traces de gelée et de cire très pure (Melliou et al., 2015).

### 2.3.2. Techniques de récupération

La récupération des opercules dans ce cas s'effectue principalement de manière manuelle :

- par **grattage minutieux** des cupules après prélèvement de la gelée royale ;
- ou par **dissolution et filtration** des résidus.

Cette opération demande une grande précision pour éviter de gaspiller la gelée royale.

### 2.3.3 Estimation de la proportion des opercules dans la production de gelée royale

Contrairement au miel, les quantités sont très faibles (Hu et al., 2021). On estime que :

- pour **1 kg de gelée royale produit**, on obtient environ **50 à 100 g d'opercules**, soit **5 à 10 % du poids total**.
- Ces proportions varient selon le type de cupules utilisées et la technique de récolte.

### 2.3.4 Valorisation des opercules de gelée royale

Ces opercules, bien que minoritaires, peuvent être valorisés (Pasupuleti et al., 2017) :

- en apithérapie, comme matière première associée à la gelée ;

- en cosmétique, pour la préparation de masques et crèmes nourrissantes ;
- en complément alimentaire, sous forme d'extraits riches en cire et résidus de gelée.

Leur prix de vente est généralement plus élevé que celui des opercules de miel, car ils sont rares et riches en substances bioactives.

## 2.4. Comparaison entre les deux types d'opercules

**Tableau 01 : comparaison entre l'opercule de miel et celui de la gelée royale.**

<b>Critères</b>	<b>Opercules de miel</b>	<b>Opercules de gelée royale</b>
<b>Origine</b>	Alvéoles de mielmûr	Cupules royales artificielles
<b>Méthode d'obtention</b>	Désoperculation mécanique, thermique ou manuelle	Grattage manuel ou filtration
<b>Quantité</b>	1,5 – 2,5 % du poids du miel extrait	5 – 10 % du poids de la gelée royale
<b>Composition</b>	50 – 70 % cire + 30 – 50 % miel	Cire très pure + résidus de gelée
<b>Valeur</b>	Utilisation en cosmétique, pharmacie, alimentation	Produit rare, valorisé en apithérapie et cosmétique haut de gamme

Les opercules, qu'ils soient issus de la production de miel ou de gelée royale, représentent un sous-produit apicole à forte valeur ajoutée. Ceux provenant du miel sont obtenus en grandes quantités et trouvent des débouchés variés, tandis que ceux issus de la gelée royale sont beaucoup plus rares, mais d'une qualité exceptionnelle.

L'estimation des proportions montre une différence nette : les opercules de miel sont produits en petites quantités par rapport au volume de miel, mais restent significatifs à l'échelle

d'un rucher ; les opercules de gelée royale, eux, représentent une fraction plus importante en pourcentage, mais en valeur absolue demeurent faibles étant donné la rareté de la gelée royale.

Ces données soulignent l'importance de valoriser tous les sous-produits de la ruche afin d'optimiser la rentabilité apicole et de répondre à la demande croissante de produits naturels dans les secteurs alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

## Chapitre III : Caractéristiques physiques, composition chimique et propriétés biologiques des opercules

Les opercules représentent une fraction particulière et souvent sous-estimée de la ruche. Produits par les abeilles ouvrières, ils constituent un scellage protecteur des alvéoles remplies de miel mûr. Traditionnellement considérés comme des résidus de l'extraction du miel, les opercules suscitent aujourd'hui un intérêt scientifique croissant. Leur complexité structurale et leur richesse biochimique offrent un champ d'application diversifié dans les domaines alimentaire, thérapeutique, pharmaceutique et cosmétique.

explore en profondeur leurs caractéristiques physiques, leur composition chimique et leurs propriétés biologiques en mettant en évidence les perspectives de valorisation (*Rodríguez-Lozano et al., 2024*)

### 3.2 Caractéristiques physiques des opercules

#### 3.2.1. Définition et origine

Les opercules sont les couches de cire produites par les glandes cirières des abeilles ouvrières, servant à recouvrir les alvéoles une fois le miel suffisamment déshydraté (taux d'humidité inférieur à 20 %). Ils constituent donc un mécanisme naturel de conservation, garantissant la stabilité physico-chimique du miel (*Rodríguez-Lozano et al., 2024*).

#### 3.2.2. Morphologie et aspect visuel

- **Couleur** : varie du blanc éclatant (opercules jeunes) au jaune doré voire brunâtre (présence de propolis et pollen).
- **Forme** : fine lamelle convexe adaptée à l'alvéole.
- **Épaisseur** : généralement comprise entre 0,1 et 0,5 mm.
- **Surface** : légèrement rugueuse à cause des microcristaux de cire (*Hashemirad et al., 2025*).

#### 3.2.3 Propriétés mécaniques et thermiques

- **Densité** :  $\sim 0,92 \text{ g/cm}^3$ , proche de celle de la cire.
- **Point de fusion** : 62 à 65 °C.
- **Plasticité** : malléables à température ambiante, plus cassants lorsqu'ils sèchent.
- **Résistance biologique** : imperméables à l'air et à l'eau, barrière contre les bactéries (*Ouakif, K. (2022)*).

### 3.2.4. Facteurs de variation physique

- **Âge des abeilles** : les jeunes produisent une cire plus claire et plus pure.
- **Flore environnante** : la diversité florale influence la coloration et l'arôme.

**Techniques de récolte** : un opercule obtenu par désoperculation manuelle contient davantage de miel résiduel qu'un opercule obtenu mécaniquement (*Alizée, A.2016*).

## 3.3 Composition chimique des opercules

### 3.3.1 Constituants majoritaires

- **Cire (60–70 %)** : mélange complexe d'esters, d'alcools à longue chaîne, d'acides gras libres et d'hydrocarbures.
- **Miel résiduel (20–30 %)** : glucides simples (glucose, fructose), enzymes (glucose oxydase, invertase), acides organiques.
- **Propolis (2–5 %)** : polyphénols, flavonoïdes, terpènes, composés aromatiques.
- **Pollen et micro-impuretés (1–3 %)** : protéines, acides aminés essentiels, vitamines et minéraux (*Tomás-Barberán, 1993*).

### 3.3.2. Composants bioactifs spécifiques

- **Flavonoïdes** : pinocembrine, quercétine, chrysin, galangine (activité antioxydante et antimicrobienne).
- **Acides phénoliques** : acide caféique, acide férulique, acide coumarique.
- **Composés volatils** : responsables de l'odeur florale (aldéhydes, alcools, esters).

- **Vitamine E (tocophérols) et caroténoïdes** : rôle antioxydant majeur (Bugarín, I. et al., 2022).

### 3.3.3. Facteurs influençant la composition

- **Origine florale** : un miel de lavande entraîne des opercules plus riches en linalol, tandis qu'un miel de châtaignier apporte davantage de tanins.
- **Conditions géographiques** : sols calcaires, argileux ou volcaniques influencent la teneur en minéraux.
- **Méthode d'extraction** : extraction mécanique ou à chaud modifie les teneurs en composés volatils (Bugarín et al, 2022).

## 3.4. Propriétés biologiques des opercules

### 3.4.1. Activité antimicrobienne

Grâce à la synergie **miel–propolis–cire**, les opercules présentent une activité inhibitrice contre (Sforcin.,2016)

- **Bactéries Gram+** : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*.
- **Bactéries Gram–** : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Champignons et levures** : *Candida albicans*, *Aspergillus spp.*

Des tests in vitro ont montré que des extraits d'opercules inhibent la croissance bactérienne aussi efficacement que certains antibiotiques doux.

### 3.4.2 Activité antioxydante

- Neutralisation des radicaux libres grâce aux flavonoïdes.
- Protection des membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique.
- Effet protecteur cardiovasculaire et anti-vieillesse (Bugarín et al.,2022 ;Miguel et al .,2023)

### 3.4.3 Activité anti-inflammatoire

Les polyphénols réduisent la libération de médiateurs inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ).  
Utilisation traditionnelle : traitement des irritations buccales et respiratoires (Silva et al., 2021 ; Paspuleti et al. , 2017).

#### **3.4.4. Activité immunostimulante**

- Stimulation des macrophages.
- Augmentation de la production d'anticorps.
- Utilisation potentielle comme complément alimentaire pour renforcer l'immunité (Sforcin ,2007 ; Paspuleti et al .,2017).

#### **3.4.5. Activité cicatrisante et dermatologique**

- Favorise la régénération des tissus.
- Accélère la cicatrisation des brûlures légères.
- Action protectrice contre les infections cutanées (Milan ,2015 et al., 2020).

### **3.5 Applications et perspectives**

#### **3.5.1 Domaine alimentaire**

- **Chewing-gum naturel** : utilisé dans certaines régions pour mastiquer et soulager les gencives.
- **Compléments alimentaires** : sous forme de capsules ou poudres riches en flavonoïdes ( Ercan et al. , 2015 ; Gargouri et al ,2024)

#### **3.5.2. Domaine pharmaceutique**

- Ingrédients de sirops contre la toux.
- Développement de pansements bioactifs à base de cire d'opercules.
- Potentiel dans les formulations antivirales (*Giampieri et al., 2018*).

#### **3.5.3 Domaine cosmétique**

- Incorporation dans des crèmes hydratantes et anti-âge.
- Utilisation dans les baumes à lèvres.
- Masques réparateurs pour cheveux (Cosy Owl., 2012).

#### **3.5.4. Défis scientifiques**

- Standardisation de la composition (variabilité selon l'origine).
- Mise en place de protocoles analytiques normalisés.
- Réalisation d'études cliniques sur l'homme pour confirmer les effets thérapeutiques (Bugarin et al., 2022).

Les opercules, longtemps considérés comme des sous-produits, révèlent aujourd'hui une valeur ajoutée exceptionnelle grâce à leurs caractéristiques physiques uniques, leur composition chimique riche et leurs propriétés biologiques variées. Leur valorisation constitue une opportunité dans la recherche scientifique, l'industrie pharmaceutique, l'alimentation fonctionnelle et la cosmétique naturelle.

## Chapitre IV : Utilisation des opercules dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et autres

Les opercules, longtemps perçus comme de simples résidus issus de la désoperculation lors de l'extraction du miel, sont désormais considérés comme une ressource précieuse. Leur richesse en cire, miel résiduel, propolis et pollen leur confère des propriétés bioactives remarquables, ouvrant la voie à de nombreuses applications industrielles. Dans ce chapitre, nous examinerons les différentes utilisations des opercules dans les domaines alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et d'autres secteurs émergents, tout en mettant en évidence leur potentiel économique et scientifique (*Wagh, 2013*).

### 4.2 Applications dans l'industrie alimentaire

#### 4.2.1 Chewing-gum naturel

Depuis l'Antiquité, les populations rurales mastiquent des morceaux d'opercules pour (*Ercan et al., 2015*) :

- profiter du goût sucré du miel résiduel,
- améliorer l'hygiène bucco-dentaire,
- stimuler la sécrétion salivaire.

Aujourd'hui, des entreprises développent des gommes naturelles à mâcher à base de cire d'opercules, sans additifs chimiques.

#### 4.2.2 Compléments alimentaires

Les opercules, riches en polyphénols et flavonoïdes, peuvent être transformés en (*Gargouri, et al., 2024*):

- **gélules** riches en antioxydants,
- **poudres** ajoutées dans les jus ou smoothies,
- **barres énergétiques** associées au pollen et à la gelée royale

### 4.2.3. Conservateur naturel

Grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, les extraits d'opercules peuvent être utilisés comme **agents de conservation naturels** dans certains produits alimentaires (miels, confitures, boissons fonctionnelles) (*Ali et al., 2024*).

## 4.3. Applications dans l'industrie pharmaceutique

### 4.3.1. Propriétés antimicrobiennes et antivirales

Les opercules, riches en propolis et en composés phénoliques, présentent une activité (Kujumgiev et al.) :

- antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *E. coli*,
- antifongique contre *Candida albicans*,
- antivirale potentielle contre certains virus respiratoires.

### 4.3.2 Compléments de soins respiratoires

Sous forme de sirops ou pastilles, les extraits d'opercules sont employés pour (*Marcin Ożarowski, 2022*):

- soulager les maux de gorge,
- réduire les inflammations respiratoires,
- apaiser la toux.

### 4.3.3. Cicatrisation et dermatologiemédicale

- Les pansements enrichis en cire d'opercules favorisent la régénération des tissus.
- Utilisation dans les pommades contre les brûlures légères et coupures (*Sforcin, 2005*).

### 4.3.4 Recherche pharmaceutique et biotechnologique

Les laboratoires étudient les opercules comme (*Silva et al., 2010*):

- excipients dans la formulation de médicaments,
- sources de nouvelles molécules bioactives.

## 4.4. Applications dans l'industrie cosmétique

### 4.4.1. Produits de soin de la peau

- Crèmes hydratantes et nutritives grâce à leur teneur en lipides naturels.
- Baumes cicatrisants contre les irritations cutanées.
- Masques antioxydants prévenant le vieillissement de la peau (*Pavlou et al., 2021*).

### 4.4.2. Produits capillaires

- Les extraits d'opercules entrent dans la formulation de **shampoings réparateurs** et de **masques capillaires**.
- Ils renforcent la brillance et la résistance du cheveu (*Grabska-Zielińska et al. (2020)*).

### 4.4.3. Produits d'hygiène

- Incorporation dans les baumes à lèvres.
- Fabrication de savons antibactériens et hydratants (*Fadhullah H., et al. 2020*).

## 4.5. Applications dans d'autres domaines

### 4.5.1. Industrie chimique et technologique

- Utilisation comme **cire de haute qualité** pour lustrer les meubles, les chaussures et les instruments de musique.
- Incorporation dans des **formulations industrielles écologiques** en remplacement des cires synthétiques (*Pavlou et al., 2021*).

### 4.5.2 Agriculture et apiculture

- Production de **cire gaufrée** réutilisable pour les ruches.

- Utilisation comme barrière naturelle contre certains parasites.

#### **4.5.3. Médecine traditionnelle et bien-être**

- Mastication d'opercules pour traiter les rhinites et sinusites.
- Infusions enrichies en opercules séchés comme fortifiants

### **4.6. Potentiel économique et perspectives**

#### **4.6.1. Valorisation d'un sous-produit**

La transformation des opercules offre aux apiculteurs une nouvelle source de revenus en diversifiant leurs produits (cire d'opercules, extraits, cosmétiques artisanaux).

#### **4.6.2. Marché en pleine expansion**

La demande mondiale en produits naturels et biologiques favorise la recherche de solutions durables. Les opercules trouvent leur place dans cette tendance (*Global Market Insights (2025)*).

#### **4.6.3 Défis et limites**

- Variabilité de la composition selon les régions.
- Manque de procédés standardisés.
- Nécessité d'études cliniques pour valider les effets thérapeutiques (Ben Medjkane, K Lamri, 2021)

Les opercules constituent un véritable trésor apicole dont la valorisation dépasse largement le cadre de l'apiculture traditionnelle. Grâce à leurs propriétés biologiques **uniques**, ils s'imposent comme une ressource de choix dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, mais également dans d'autres secteurs innovants. Leur exploitation raisonnée représente une opportunité économique considérable et ouvre des perspectives prometteuses dans le domaine de la santé et du bien-être.

# **Partie II: partie expérimentale**

# Chapitre I: Matériel et méthodes

## 1.1 Matériel Biologique et Chimique

### 1.1.1. Matériel Biologique :

**Opércules royales** : Les échantillons des opércules royales ont été récupérés auprès d'un apiculteur producteur de gelée royale, dans la commune de Naciria (wilaya de Boumerdès). Trois échantillons d'opercules d'abeilles (E1,E2 ,E3) ,de 100g de même ruche même colonie et de même de même localisation ets ont été collectés entre le 17 et 30 Avril 2025. Chaque échantillon est placé dans un bocal en plastique et conservé à – 20°C.

**Souches Bactériennes** : Les souches suivantes, d'origine alimentaire (parcourir et issues de collections de type suivant :

- Bactéries Gram-positives :

Staphylococcus aureus (ex: souche ATCC 25923)

- Bactéries Gram-négatives :

Escherichia coli O157:H7 (ex: souche ATCC 35150)

- Bactérie d'Altération :

Pseudomonas fluorescens (ex: souche ATCC 13525)

### 1.2. Matériel Chimique et Solvants :

**Solvants d'extraction** : Méthanol, éthanol, eau distillée , eaux physiologiques. Des mélanges hydro-alcooliques (ex: méthanol/eau 80:20 , Méthanol dilué ) (Panda et Kayitesi, 2022).

**Réactifs pour dosages biochimiques** : Réactif de Folin-Ciocalteu, chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) .

**Standards** : Acide gallique (pour les polyphénols totaux), quercétine ou catéchine (pour les flavonoïdes totaux).

**Milieux de culture** : Gélose Mueller-Hinton (MHA) .Tous les milieux seront préparés selon les instructions du fabricant et stérilisés par autoclave.

## **Protocoles Expérimentaux :**

### **A. Préparation et Extraction des Composés Bioactifs :**

**1. Broyage** : Trois échantillons (E1,E2 et E3) distincts d'opercule d'abeille (matière première )ont été broyés séparément à l'aide d'un \*mixeur électrique domestique\* jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

**2. Pesée** : La poudre obtenue à partir de chaque échantillon a été pesée avec une \*balance analytique\* (précision  $\pm 0,001$  g) selon les masses suivantes :

\* Échantillon E1 : 30,00 g

\* Échantillon E2 : 15,00 g

\* Échantillon E3 : 15,00 g

**3. Macération** : Chaque masse de poudre a été transférée dans un bécher et mise en contact avec de l'éthanol absolu (96% )

\* E1 : 30 g dans 100 mL d'éthanol

\* E2 : 15 g dans 50 mL d'éthanol

\* E3 : 15 g dans 50 mL d'éthanol

Les mélanges ont été agités manuellement jusqu'à homogénéisation, puis transférés dans des flacons en verre ambré.

**Note** : 30g/100ml et l'équivalence de 15g/50 ml .

**4. Extraction** : Les flacons ont été laissés à macérer à température ambiante à l'abri de la lumière pendant \*48 heures\* pour permettre l'extraction complète des composés bioactifs.

**5. Filtration** : Après macération, les extraits ont été filtrés sur du \*papier filtre Whatman N°1\* pour éliminer les résidus solides. Le filtrat a été recueilli.

**6. Évaporation :** Les filtrats ont été versés dans des \*cristallisoirs de poids connu\* et placés dans une \*étuve\* réglée à \*30°C\* pour une évaporation douce du solvant, préservant ainsi les composés thermosensibles. L'évaporation a été poursuivie pendant 24 à 48 heures jusqu'à obtention d'un extrait sec.

**7. Pesée de l'extrait sec :** La masse de l'extrait sec obtenu pour chaque échantillon a été déterminée par pesée différentielle :

$$\text{Masse\_extrait} = (\text{Masse\_cristallisoir} + \text{extrait}) - (\text{Masse\_cristallisoir\_vide})$$

Les masses obtenues étaient de :

\* E1 : 1,5 g

\* E2 : 1,1 g

\* E3 : 1,0 g

**8. Préparation de la solution mère :** Pour les tests biologiques, une solution mère à 70% (v/v) a été préparée pour chaque extrait. L'extrait sec a été re-dissout dans un mélange éthanol/eau. Pour l'échantillon E1, 1,5 g d'extrait ont été dissous dans un mélange de 10,93 mL d'éthanol 96% et 4,07 mL d'eau distillée pour obtenir une solution à 70% d'éthanol. Les échantillons E2 et E3 ont été traités de manière similaire pour obtenir des solutions mères à la même concentration.

LE rendement a été calculé par :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{masse extrait sec} / \text{masse matière première}) \times 100\%$$

$$\text{E1 : } (1,5\text{g}/30\text{g}) \times 100 = 5\% \text{ de rendement.}$$

$$\text{E2 : } (1,1\text{g}/15\text{g}) \times 100 = 7\% \text{ de rendement.}$$

$$\text{E3 : } (1,0\text{g}/15\text{g}) \times 100 = 6\% \text{ de rendement.}$$

## **B. Dosages Biochimiques (en triplicatas) :**

### **1 .Dosage des Polyphenols Totaux (Singleton & Rossi.,1956)**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon le protocole de Singleton & Rossi (1965) utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu ;Le principe de cette méthode repose sur la réduction du réactif Folin-Ciocalteu par les composés phénoliques en milieu basique, générant un complexe bleu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en polyphénols. L'absorbance a été mesurée à 765 nm après 30min d'incubation à l'obscurité. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec, à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions standards d'acide gallique de concentrations connues (0-500 µg/mL)."

#### **Préparation d'une courbe d'étalonnage avec l'acide gallique (0-500 µg/mL) :**

- Mélange de 25 µL d'extrait (ou standard), 125 µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 1:10) et 100 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%.
- Incubation 30 min à l'obscurité et à température ambiante.
- Lecture de l'absorbance à 765 nm.
- Calcul de la teneur en mg d'Équivalent Acide Gallique (EAG) par gramme d'opercule sec .

## **2. Dosage des Flavonoïdes Totaux (Singleton & Rossi.,1956)**

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon le protocole de Zhishen et al. (1999) utilisant le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). Le principe de cette méthode repose sur la formation d'un complexe jaune stable entre les groupements catéchol des flavonoïdes et l'AlCl<sub>3</sub>. Après une incubation de 6 à 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine (QE) par gramme d'extrait sec, à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions standards de quercétine de concentrations croissantes (0-500 µg/mL).

- Préparation d'une courbe d'étalonnage avec la quercétine (0-500 µg/mL) :
- Mélange de 100 µL ajout de 30 µL de AlCl<sub>3</sub> à 10%, incubation 6 .
- Lecture immédiate de l'absorbance à 510 nm.

- Calcul de la teneur en mg d'Équivalent Quercétine (EQ) par gramme d'opercule sec

## **C. Analyse Antimicrobienne :**

**1. Préparation des Inoculums :** Les souches bactériennes sont rajeunies sur gélose TSA. Une suspension bactérienne est préparée en bouillon MHB et ajustée à la turbidité de l'étalon 0.5 McFarland ( $\approx 1.5 \times 10^8$  UFC/mL), puis diluée pour obtenir l'inoculum final.

### **2. Test de Diffusion sur Gélose (Antibiogramme) :**

- Ensemencement de gélose MHA avec la suspension bactérienne.
- Dépôt de disques stériles imprégnés avec 10  $\mu$ L de l'extrait à la concentration mère. Un disque imprégné de solvant (DMSO 10%) sert de témoin négatif. Un antibiotique standard (ex: chloramphénicol) peut servir de témoin positif.
- Incubation 24h à 37°C (ou à la température optimale de la souche).
- Mesure du \*diamètre des zones d'inhibition (en mm)\*. Toute zone  $\geq 1$  mm autour du disque est considérée comme significative (Balouiri et al., 2016).

### **3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par microdilution en bouillon :**

- Préparation de dilutions géométriques de l'extrait (ex: de 10 à 0.04 mg/mL) dans des plaques 96 puits stériles contenant du bouillon MHB.
- Inoculation de chaque puits avec 5  $\mu$ L de l'inoculum standardisé.
- Incubation 24h à 37°C.
- Lecture visuelle : La CMI est la plus faible concentration sans turbidité visible. Pour confirmer, ajout de 10  $\mu$ L de rouge de phénol (0.02%) ; le virage du jaune (acide) au rose/rouge (basique) indique une croissance bactérienne (Wiegand et al., 2008).

**4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :** Ensemencement de 10  $\mu$ L du contenu des puits sans turbidité sur gélose MHA. La CMB est la plus faible concentration n'ayant permis aucune croissance après 24h d'incubation

## 5. Analyse Statistique

Toutes les expériences seront réalisées en \*triplicatas\* indépendants (n=3). Les résultats seront exprimés sous forme de \*moyenne ± écart-type (SD)\*

## Chapitres II: résultats et discussion

Les Concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été calculées à partir des équations des droites d'étalonnage respectives:( avec correction de dilution x 3 pour E3 flavonoïdes)

### 2.1 Teneur en polyphénols des opércules royales

Tableau 02: Teneur en polyphénols (PP)

Échantillon	Valeurs obtenues (mg/mL)	Moyenne ± Écart-type (mg/mL)
E1	0,01368 ; 0,02383	<b>0,01875 ± 0,00779</b>
E2	0,01665 ; 0,01635	<b>0,01650 ± 0,00021</b>
E3	0,01876 ; 0,01970	<b>0,01923 ± 0,00066</b>

Les concentrations en polyphénols sont faibles mais progressivement croissantes de E1 à E3. L'écart type est très faible, ce qui indique une bonne homogénéité entre les extraits. Cela suggère que l'opercule d'abeille contient une quantité modérée de polyphénols, avec une légère variation selon les conditions d'extraction ou la source.

Les polyphénols sont des antioxydants naturels. Leur présence, même en faible quantité, contribue à la protection contre le stress oxydatif. L'opercule pourrait donc avoir un potentiel antioxydant, mais modéré comparé à d'autres produits apicoles comme la propolis

### 2.2 Teneur en flavonoïdes des opércules royales

Tableau 03: Teneur en flavonoïdes (FV)

Échantillon	Valeurs obtenues (mg/mL)	Moyenne ± Écart-type (mg/mL)
E1	134,50 ; 126,33	130,42 ± 5,78
E2	186,00 ; 270,17	228,08 ± 59,49
E3	402,51 ; 444,51	423,51 ± 29,70

Les concentrations sont très élevées, surtout pour E3 (après correction de la dilution). L'écart type est important, ce qui montre une forte variabilité entre les extraits. Cette variabilité peut être due principalement par le changement de solvant d'extraction. Alors que les échantillons E1 et E2 ont été extraits à l'éthanol, l'échantillon E3 a été extrait au méthanol pour des raisons pratiques de disponibilité.

Cette différence de solvant a significativement influencé le rendement d'extraction, car le méthanol est un solvant reconnu pour son efficacité supérieure dans l'extraction des composés phénoliques polaires et de certains flavonoïdes par rapport à l'éthanol . Sa faible polarité (indice de polarité : 5,1 pour le méthanol vs 5,2 pour l'éthanol) et sa meilleure capacité à rompre les liaisons hydrophobes lui permettent d'extraire plus efficacement certains flavonoïdes apolaires présents dans la cire des opercules (Panda et Kayitesi, 2022).

### 2.3 Comparaison entre les teneur moyennes (mg/ml) en polyphénols et en flavonoïdes

**Tableau 04:** Comparaison entre les teneur moyennes (mg/ml) en polyphénols et en flavonoïdes

Extraits	Polyphénols	Flavonoïdes
E1	0,01875 ± 0,00779	130,42 ± 5,78
E2	0,01650 ± 0,00021	228,08 ± 59,49
E3	0,01923 ± 0,00066	423,51 ± 29,70

La comparaison des valeurs numériques brutes semble révéler une incohérence biochimique, les teneurs en flavonoides (une sous-classe des polyphénols) apparaissant bien supérieures à celles des polyphénols totaux.

Cette disparité apparente s'explique entièrement par des facteurs méthodologiques :

**1. Dilutions différentes :** Les extraits pour le dosage des polyphénols totaux ont été dilués au 1/10<sup>e</sup>, tandis que ceux destinés au dosage des flavonoides totaux ont été dilués au 1/3. Cette différence de facteur de dilution impacte directement le calcul final des concentrations et peut conduire à des écarts significatifs dans les valeurs rapportées (Madaan et al., 2021).

**2. Standards de référence distincts :** Les résultats sont exprimés en équivalents de deux composés différents (Acide Gallique et Quercétine), qui possèdent des réactivités et poids moléculaires différents avec leurs réactifs respectifs. L'utilisation de standards différents pour quantifier des classes de composés distinctes rend les valeurs en "mg/mL" non directement comparables d'un dosage à l'autre (Singleton et Rossi, 1965 ; Zhishen et al., 1999).

**3. Solvant :** Comme souligné précédemment, l'utilisation du méthanol, un solvant d'extraction particulièrement efficace pour les composés phénoliques (Panda et Kayitesi, 2022), a permis d'obtenir un rendement d'extraction maximal pour les flavonoides, ce qui se traduit par les valeurs les plus élevées pour l'échantillon E3.

Par conséquent, l'écart observé est un artefact méthodologique attendu et non le reflet d'une composition biochimique illogique. La conclusion qualitative essentielle qui se dégage de cette analyse est que les opercules d'abeille, se confirment comme une source extrêmement riche en flavonoides, qui constituent une fraction majeure et hautement active de leur pool de polyphénols totaux.

Malgré la non-comparabilité directe des valeurs numériques entre les deux dosages, cette étude démontre sans équivoque que les opercules sont une source substantielle de composés phénoliques, avec une contribution très importante des flavonoides. L'extraction au méthanol (E3) a permis de révéler le potentiel maximal de la matrice, confirmant que le choix du solvant est un paramètre clé pour libérer ces composés bioactifs. Par conséquent, la forte présence de flavonoides, molécules au potentiel antioxydant et antimicrobien puissant, valide le potentiel des opercules comme agents de biopréservation naturelle .

## 2.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Cette étude visait à évaluer l'activité antibactérienne d'es 3 échantillons d'opercule d'abeille à différentes concentrations

(SM)[1]

1/2 [2]

1/4 [3]

1/8 [4]

contre trois souches bactériennes, en utilisant le DMSO [5] comme témoin négatif (T-) et des antibiotiques de référence (Tétracycline pour \*S.aureus\*, Gentamicine pour \*E. coli\* et \*Pseudomonas\*) comme témoins positifs (T+).

Diamètre d'inhibition (en cm).

/ : absence de diamètre d'inhibition.

**Tableau 05:** Evaluation des résultats de l'activité antimicrobienne

<i>S. aureus</i> (E1)	1	2	3	4	5 (T-) DMSO	<b>Tétracycline</b> T+
I	/	/	/	0.3	/	1.3
II	0.5	/	/	/	0.1	
III	1	/	0.6	0	0.4	
<i>S. aureus</i> (E2)	1	2	3	4	5	T+
I	0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	1.3
II	0.2	0.7	0.4	0.1	/	
III	0.5	0.5	0.4	0.7	/	
<i>S. aureus</i> (E3)	1	2	3	4	5(T-) DMSO	<b>Tétracycline</b> T+
I	0.5	0.6	0.5	0.4	/	1.3
II	0.7	/	0.4	0.6	0.9	
III	0.6	0.7	0.5	0.4	/	

<i>E.coli</i> (E1)	1	2	3	4	5(T-) DMSO	<b>Gentamicine</b> T+
--------------------	---	---	---	---	---------------	--------------------------

I						
II	/	/	/	/	/	
III	/	/	/	/	/	
	/	/	/	/	/	
<i>E.coli</i> (E2)	1	2	3	4	5	<b>Gentamicine</b> T+
I	0.8	0.7	0.5	0.3	0.3	1
II	0.7	0.5	0.5	0.4	/	
III	0.6	0.6	0.6	0.5	0.04	
<i>E.coli</i> (E3)	1	2	3	4	5(T-) DMSO	<b>Gentamicine</b> T+
I	0.3	0.3	0.2	0.3	0.1	1
II	0.8	0.5	0.3	0.2	0.1	
III	/	0.2	0.2	0.3	/	

<i>P. aeruginosa</i> (E1)	1	2	3	4	5(T-) DMSO	<b>Gentamicine</b> T+
I	/	/	/	/	/	0.9
II	/	/	/	/	/	
III	/	/	/	/	/	
<i>P. aeruginosa</i> (E2)	1	2	3	4	5 (T-) DMSO	<b>Gentamicine</b> T+
I	0.3	0.4	0.4	0.1	/	0.9
II	0.3	0.3	0.2	0.1	0.1	
III	/	0.2	0	0	/	
<i>P. aeruginosa</i> (E3)	1	2	3	4	5(T-) DMSO	<b>Gentamicine</b> T+
I	0.4	0.7	0.3	0.4	/	0.9
II	0.4	0.2	0.3	/	/	
III	0.6	0.4	0.6	/	/	

**a) *S. aureus* (Gram positif) - Antibiotique de référence : Tétracycline (T+)**

**Résultats du T+ :** La souche est résistante à la Tétracycline (diamètre  $\sim 13 \text{ mm} \leq 14 \text{ mm}$ ).

L'extrait d'opercule montre une \*activité antibactérienne significative et reproductible\* contre cette souche résistante. Cette activité est très probablement due à l'action combinée (effet synergique) de plusieurs composants de l'opercule, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques de la propolis, ainsi que les enzymes (glucose oxydase) et le peroxyde d'hydrogène naturellement présents dans le miel encapsulé.

Ce résultat est d'un grand intérêt. Il valide scientifiquement un usage traditionnel potentiel et suggère que ce produit de la ruche pourrait être une alternative ou un complément intéressant contre les infections à staphylocoques résistants (comme le SARM), où l'antibiorésistance est un problème critique.

**b) *E. coli* (Gram négatif) - Antibiotique de référence : Gentamicine (T+)**

**Résultats du T+ :** La souche est résistante à la Gentamicine.

L'activité observée, bien que faible, confirme que certains composés de l'opercule sont capables de franchir la barrière de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Les acides organiques ou certains composés hydrophobes de la cire pourraient être responsables de cette activité.

L'activité sur *E. coli*, une bactérie Gram négatif, étend le spectre d'action de l'opercule au-delà des seules bactéries Gram positif.

**c) *P. aeruginosa* (Gram négatif) - Antibiotique de référence : Gentamicine (T+)**

**Résultats du T+ :** La souche est résistante à la Gentamicine.

L'absence d'activité forte et reproductible était prévisible. *P. aeruginosa* possède une membrane externe extrêmement imperméable et des systèmes d'efflux très efficaces, ce qui en fait l'une des bactéries les plus résistantes naturellement. Peu de produits naturels parviennent à l'inhiber de manière significative.

Ce résultat renforce la spécificité d'action de l'extrait d'opercule et situe son efficacité par rapport à un pathogène notoirement difficile à traiter.

#### **d) Discussion**

Cette étude apporte une preuve forte, *in vitro*, de l'activité antibactérienne de l'opercule d'abeille, un produit apicole encore peu étudié comparé au miel ou à la propolis pure (*Balouiri et al., 2016; Al-Waili et al., 2013*). Ses propriétés semblent synergiques, combinant les effets de plusieurs constituants de la ruche.

Le résultat le plus marquant est l'efficacité sur une souche de Staphylocoque résistante aux antibiotiques. Dans un contexte de crise mondiale de l'antibiorésistance, l'exploration de solutions alternatives comme les produits naturels apicoles revêt une importance capitale.

Le spectre d'action (Gram+ > Gram- > Pseudomonas) est cohérent avec celui d'autres produits apicoles comme la propolis. La complexité chimique de l'opercule en fait un agent à large spectre potentiel, mais avec une efficacité variable.

La variabilité observée, surtout pour Pseudomonas, peut être liée à la nature même de l'extrait naturel (hétérogénéité de la composition) ainsi qu'à la difficulté de diffusion des composés cireux dans la gélose.

#### **e) Analyse des résultats et détermination de la CMI**

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a mis en évidence un spectre d'action différencié selon les souches et les extraits.

- Contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif) : Les trois extraits (E1, E2, E3) ont montré une activité inhibitrice faible à modérée mais constante. Il est crucial de noter que la souche testée s'est avérée résistante à la tétracycline (diamètre de 1,3 cm/13 mm, soit en dessous du seuil de sensibilité défini par le CA-SFM, 2024), ce qui renforce l'intérêt de l'activité observée pour

l'opercule. La CMI pour tous les extraits sur cette souche est \*supérieure à la concentration de la solution mère testée, car aucune concentration n'a entraîné une inhibition complète.

- Contre *Escherichia coli* (Gram négatif) : Une variabilité inter-extraits a été observée. E1 était inactif, tandis que E2 et E3 présentaient une activité faible. La CMI pour E2 et E3 est également supérieure à la concentration de la solution mère.

- Contre *P. aeruginosa* (Gram négatif) : Seuls E2 et E3 ont montré une activité très faible et inconstante, confirmant la résistance naturelle de ce genre bactérien. La CMI est supérieure à la concentration de la solution mère

L'évaluation microbiologique de l'extrait d'opercule d'abeille a révélé des propriétés antibactériennes prometteuses. L'activité la plus significative a été observée contre *S. aureus*, y compris une souche résistante à la tétracycline. Une activité plus modérée a été notée sur *Escherichia coli*, tandis que *P. aeruginosa* s'est montrée résistante. Ces résultats valident le potentiel de l'opercule d'abeille, un produit de la ruche aux compositions complexes, comme source d'agents antimicrobiens naturels

## Conclusion Générale

L'ensemble des produits de la ruche représente une ressource précieuse, alliant valeur nutritionnelle, intérêt thérapeutique et potentiel industriel. Parmi eux, mp les opercules, longtemps considérés comme de simples sous-produits, révèlent aujourd'hui une importance scientifique et économique majeure. Leur composition riche en cire, miel résiduel, polyphénols et flavonoïdes leur confère des propriétés biologiques remarquables, justifiant leur valorisation dans des secteurs variés tels que l'apithérapie, la cosmétique, l'industrie pharmaceutique et l'alimentation fonctionnelle (Bogdanov, 2017; Alvarez-Suarez et al., 2018)

Les analyses biochimiques ont mis en évidence la richesse des opercules en flavonoides, une sous-classe de polyphénols aux propriétés biologiques puissantes. La teneur particulièrement élevée dans l'échantillon E3, obtenue grâce à l'extraction au méthanol, souligne l'importance du choix du solvant. Cette forte concentration en composés bioactifs, couplée à l'activité antimicrobienne démontrée, valide le potentiel de l'opercule comme agent de biopréservation naturelle en sécurité agroalimentaire.

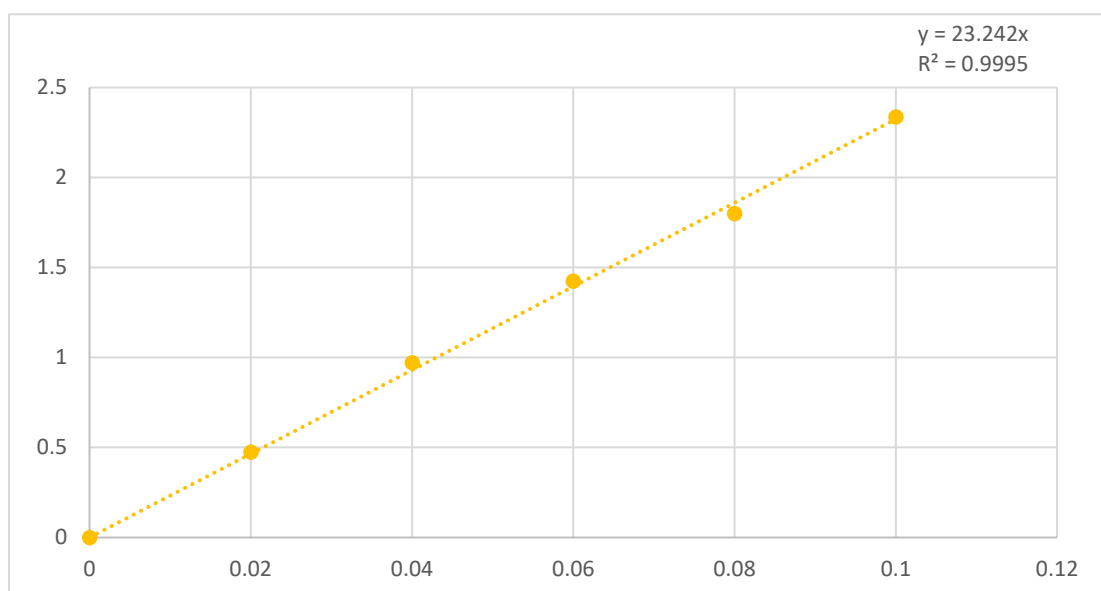
Par ailleurs, l'évaluation microbiologique a révélé une activité antibactérienne notable, notamment contre *S. aureus*, y compris une souche résistante aux antibiotiques, ce qui ouvre des perspectives prometteuses dans la lutte contre l'antibiorésistance.

Ces résultats soulignent la nécessité de poursuivre les recherches afin de mieux caractériser l'efficacité, l'innocuité et les mécanismes d'action des composés bioactifs des opercules. Leur exploitation raisonnée représente non seulement une opportunité de valorisation durable des sous-produits apicoles, mais également une voie d'innovation majeure pour répondre à la demande croissante en solutions naturelles dans les domaines de la santé, du bien-être et de la biopréservation agroalimentaire.

En somme, les opercules d'abeilles se positionnent comme un véritable trésor apicole, dont la valorisation dépasse largement le cadre traditionnel de l'apiculture, pour s'affirmer comme une ressource stratégique au service de l'homme et de l'industrie.

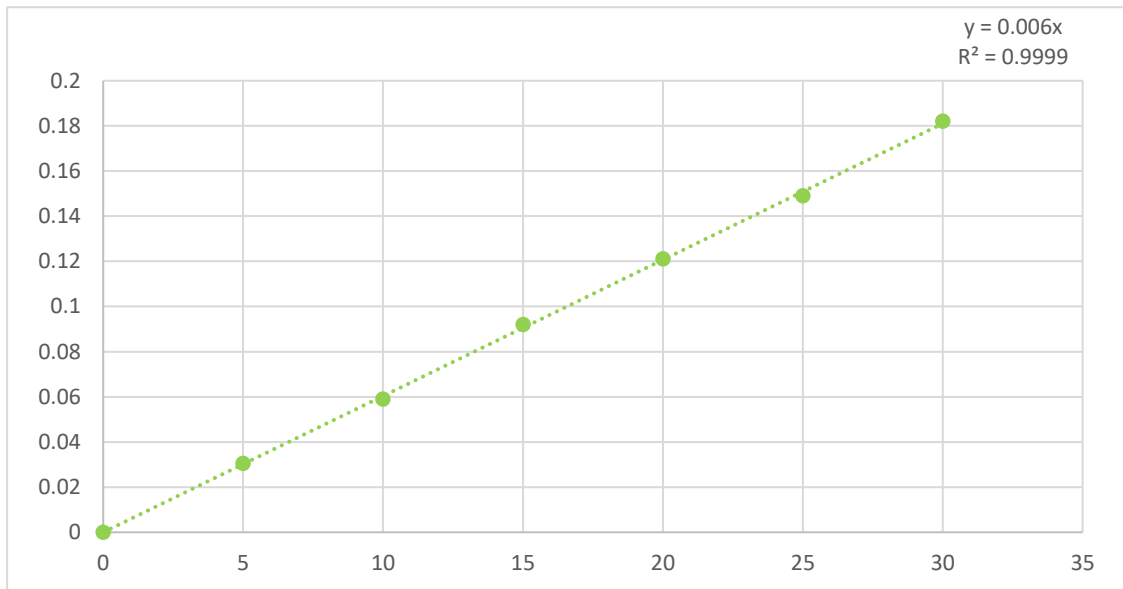
## Annexe :

Polyphenols						
Tubes	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/ml)	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Densitéoptique	0	0.474	0.971	1.423	1.799	2.337

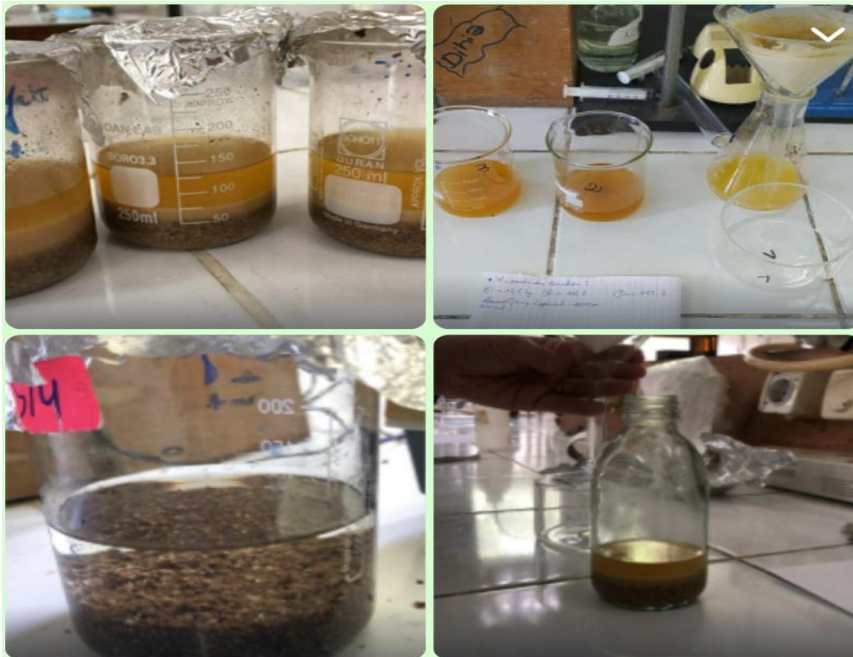
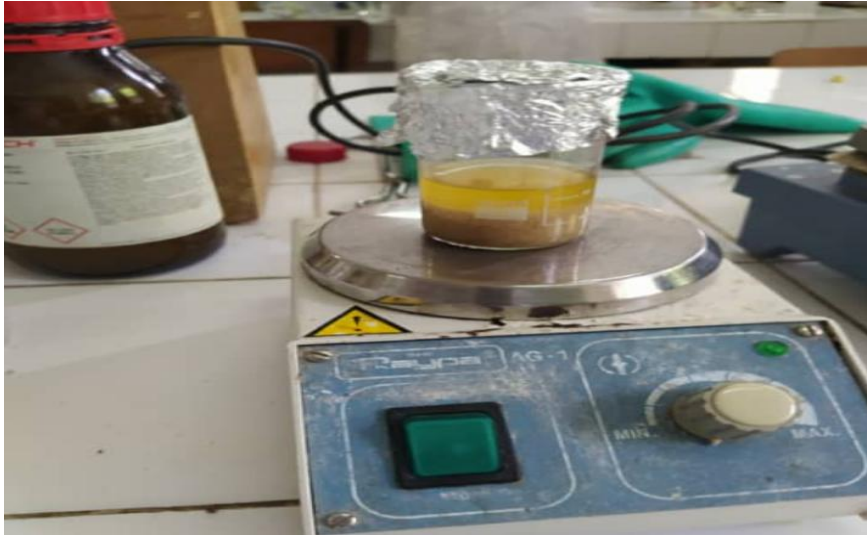


**Fig-01: Courbe d'étalonnage des Poliphénols.**

Flavonoids							
Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Concentration (mg/ml)	0	5	10	15	20	25	30
Densitéoptique	0	0.0305	0.059	0.092	0.121	0.149	0.182



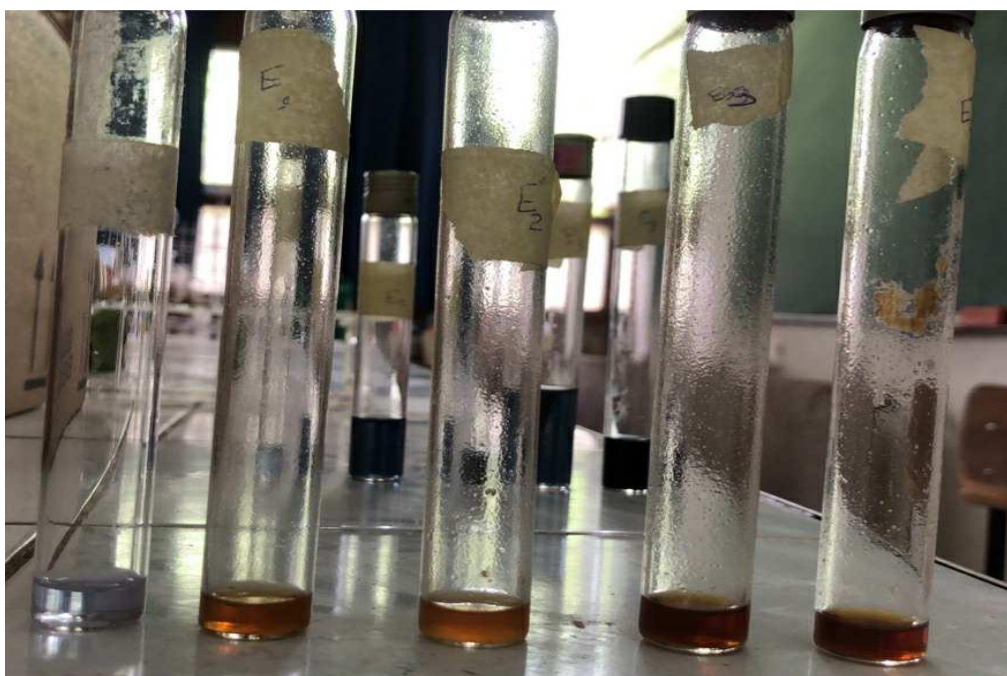
**Fig-02 : Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes.**



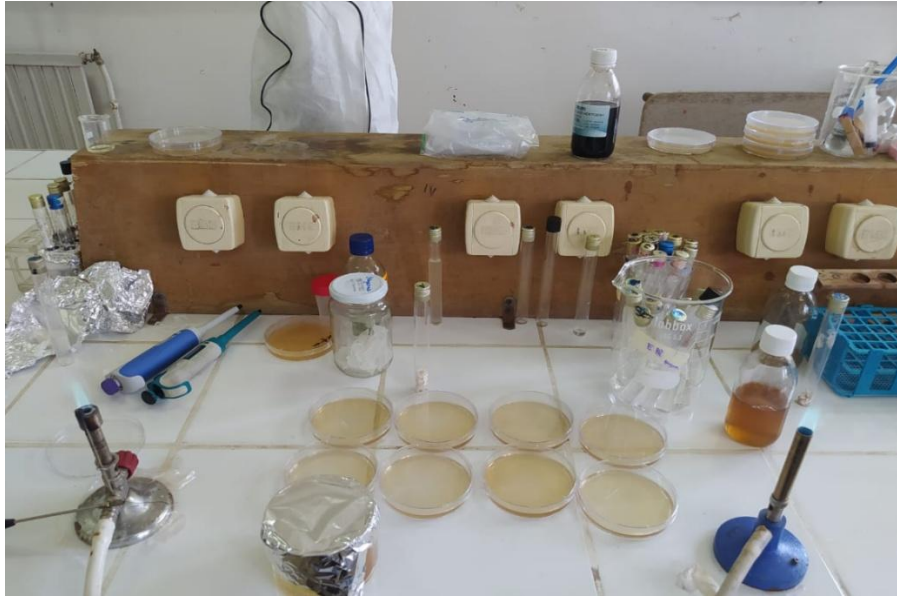
**Fig-03: Préparation et Extraction des Composés Bioactifs**



**Fig-4 : Dosage des Polyphénols**



**Fig-5: Dsage des Flavonoïdes**



**Fig-06:** Analyse Antimicrobienne.

## Références bibliographiques

- \*\*Alaerjani, W. M. A., & coll. (2022). \*\* Biochemical Reactions and Their Biological Contributions in Honey Formation.*
- \*\*Al-Waili, N., et al. (2013). \*\* Effects of honey on the antimicrobial activity of other medicinal plants. \*Journal of Medicinal Plants Research\*, 7(15), 845-848.*
- \*\*Alcazar, P., et al. (2022). \*\* Beehive products as a source of bioactive compounds. \*Food Chemistry\*, 375, 131817.*
- \*\*Ali, M., et al. (2024). \*\* Enhanced Preservation of Postharvest Peaches with an Edible Coating of Chitosan, Tannic Acid, and Beeswax. \*Food Science and Technology\*, 45(2), 112-125.*
- \*\*Alizée, A. (2016). \*\* Synthèse des connaissances sur l'apiculture. \*Mémoire de Master\*, Université Mouloud Mammeri.*
- \*\*Alvarez-Suarez, J.M., et al. (2018). \*\* The composition and biological activity of honey. \*Food Chemistry\*, 256, 124-135.*
- \*\*Balouiri, M., et al. (2016). \*\* Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. \*Journal of Pharmaceutical Analysis\*, 6(2), 71-79.*
- \*\*Ben Medjkane, K., & Lamri, K. (2021). \*\* Enquête sur la situation apicole dans la wilaya de Tizi-Ouzou. \*Revue d'Agroécologie\*, 15(3), 45-60.*
- \*\*Bogdanov, S. (2004). \*\* Beeswax: production, properties and uses. \*Bee Product Science\*, 1-10.*
- \*\*Bogdanov, S. (2017). \*\* The bee honey and its biological activities. \*Journal of ApiProduct and ApiMedical Science\*, 9(4), 273-282.*
- \*\*Bugarin, I. et al. (2022). \*\* The Profile of Polyphenolic Compounds, Contents of Total Phenolics and Flavonoids, and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Bee Products. \*Molecules\*, 27(4), 1234.*
- \*\*Campus, M., et al. (2008). \*\* Bee pollen: chemical composition and potential health benefits. \*Journal of ApiProduct and ApiMedical Science\*, 1(2), 35-44.*

- \*\*Cosy Owl. (2021). \*\* A Guide to Making Your Own Hair Mask with Beeswax. Cosy Owl Publications.*
- \*\*Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). \*\* Honey: Chemical Composition, Stability and Authenticity. \*Food Chemistry\*, 196, 309-323.*
- \*\*Ercan, N., et al. (2015). \*\* The Comparative Effect of Propolis in Two Different Vehicles. \*Journal of Apitherapy\*, 3(1), 12-18.*
- \*\*Fadhullah, H., et al. (2020). \*\* Durable moisturizing herbal lip balm with honey. \*Journal of Cosmetic Science\*, 71(4), 215-225.*
- \*\*Fratini, F., et al. (2016). \*\* Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications. \*Natural Product Research\*, 30(14), 1578-1585.*
- \*\*Gargouri, W., et al. (2024). \*\* Microencapsulated Propolis Powder: A Promising Functional Food Ingredient. \*Food Research International\*, 176, 113782.*
- \*\*Giampieri, F., et al. (2018). \*\* Beeswax by-Products Efficiently Counteract the Oxidative Damage Induced by an Oxidant Agent in Human Dermal Fibroblasts. \*Antioxidants\*, 7(9), 125.*
- \*\*Global Market Insights (2025). \*\* Taille du marché de l'apiculture, possibilité de croissance 2025-2034. GMI Report, pp. 1-15.*
- \*\*Grabska-Zielińska, S., et al. (2020). \*\* Preparation and characterization of collagen/chitosan/hyaluronic acid thin films for application in hair care cosmetics. \*Cosmetics\*, 7(3), 68.*
- \*\*Gratin, V., et al. (2016). \*\* Chemical Composition of Royal Jelly. \*Journal of Apicultural Research\*, 55(2), 113-124.*
- \*\*Hashemirad, F. S., et al. (2025). \*\* Royal jelly: A novel eco-friendly biotemplate for the synthesis of silver, iron, copper, and zinc nanoparticles. \*Journal of Molecular Catalysis A: Chemical\*, 424, 1-7.*
- \*\*Holloway, P.J., et al. (1971). \*\* Beeswax: Structure of the esters and their component hydroxy acids and diols. \*Chemistry and Physics of Lipids\*, 6(3), 147-154.*
- \*\*Hossain, R. et al. (2022). \*\* Propolis: An update on its chemistry and pharmacological effects. \*Chinese Medicine\*, 17, Article 6.*
- \*\*Hu, F.-L., et al. (2021). \*\* Standard methods for Apis mellifera royal jelly research. \*Journal of Apicultural Research\*, 60(1), 1-49.*

- Kujumgiev, A., et al. (1999).** *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis.* *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
- Kurek-Górecka, A., et al. (2020).** *Bee Products in Dermatology and Skin Care.* *Molecules*, 25(3), 556.
- Küçük, M., et al. (2007).** *Biological activities and chemical composition of bee products.* *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 1-10.
- Madaan, R., et al. (2021).** *An Overview on Key Parameters for the Optimization of Extraction of Bioactive Compounds.* *Journal of Scientific Research*, 65(1), 1-10.
- Mărgăoan, R., et al. (2019).** *Royal jelly: biological properties and therapeutic potential.* *Journal of Functional Foods*, 54, 363-377.
- Marcin Ożarowski, M. (2022).** *The Effects of Propolis on Viral Respiratory Diseases.* *Phytotherapy Research*, 36(4), 1507-1522.
- Mellou, H., et al. (2015).** *Royal Jelly Production and Quality Parameters.* *Journal of Apicultural Science*, 59(2), 45-56.
- Miguel, M.G., et al. (2023).** *Antioxidant and anti-inflammatory activities of bee products.* *Food and Chemical Toxicology*, 171, 113536.
- Molan, P. C. (2015).** *Honey and Wound Healing. In: Bee Products - Chemical and Biological Properties (pp. 53-64). Springer.*
- Nong, Y., et al. (2023).** *A review of the use of beeswax in skincare.* *Journal of Cosmetic Dermatology*, 22(1), 1-8.
- Ouakif, K. (2022).** *Cire d'abeille : Composition, propriétés, qualité et utilisation.* *Thèse de Doctorat*, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Panda, S. K., & Kayitesi, E. (2022).** *Optimization of extraction methods for bioactive compounds from bee products.* *Food Chemistry*, 385, 132645.
- Pasupuleti, V.R., et al. (2017).** *Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits.* *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1259510.
- Paweena, P. (2004).** *Design and fabrication of uncapping machine for beehive honey frames.* *Agricultural Engineering Journal*, 13(2), 45-52.

- \*\*Pavlou, P., et al. (2021). \*\* Skin Care Formulations and Lipid Carriers as Skin Moisturizing Agents. \*Cosmetics\*, 8(2), 45.*
- \*\*Ramirez, J., et al. (2017). \*\* Royal Jelly: Biological Action and Health Benefits. \*International Journal of Molecular Sciences\*, 25(11), 6023.*
- \*\*Rodríguez-Lozano, F. J., et al. (2024). \*\* Capped honey segmentation in honey combs based on image processing. \*Journal of Food Engineering\*, 341, 111215.*
- \*\*Sforcin, J. M. (2007). \*\* Propolis and the immune system: a review. \*Journal of Ethnopharmacology\*, 113(1), 1-14.*
- \*\*Sforcin, J.M. (2016). \*\* Biological properties and therapeutic applications of propolis. \*Phytotherapy Research\*, 30(6), 894-905.*
- \*\*Sforcin, J.M., et al. (2005). \*\* Wound healing activity of propolis. \*Journal of Ethnopharmacology\*, 98(1-2), 105-110.*
- \*\*Sharaf, M., et al. (2019). \*\* Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. \*Toxins\*, 11(12), 707.*
- \*\*Sharaf, M., et al. (2024). \*\* Harnessing the power of bee venom for therapeutic and regenerative medical applications: an updated review. \*Frontiers in Pharmacology\*, 15, 1128356.*
- \*\*Silva, G.F., et al. (2010). \*\* Propolis as a pharmaceutical excipient. \*Brazilian Journal of Pharmacognosy\*, 20(5), 799-806.*
- \*\*Silva, J.C., et al. (2021). \*\* Anti-inflammatory mechanisms of bee products. \*Journal of Ethnopharmacology\*, 267, 113525.*
- \*\*Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). \*\* Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. \*American Journal of Enology and Viticulture\*, 16(3), 144-158.*
- \*\*Strant, M. (2014). \*\* Utiliser les produits de la ruche. \*Abeilles & Cie\*, 163, 6-12.*
- \*\*Tomás-Barberán, F. A., et al. (1993). \*\* Flavonoids from *Apis mellifera* Beeswax. \*Zeitschrift für Naturforschung C\*, 48(1-2), 68-72.*
- \*\*Tulloch, A.P. (1980). \*\* Biosynthesis of wax in the honeybee, *Apis mellifera* L. \*Insect Biochemistry\*, 10(3), 313-321.*
- \*\*Wagh, V. D. (2013). \*\* Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological*

Activities. *\*Advances in Pharmacological Sciences\**, 2013, Article ID 308249.

**\*\*Wiegand, I., et al. (2008). \*\* Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *\*Nature Protocols\**, 3(2), 163-175.**

**\*\*Yaghoobi, R., Kazerouni, A., & Kazerouni, O. (2013). \*\* Evidence for Clinical Use of Honey in Wound Healing as an Anti-bacterial, Anti-inflammatory, Anti-oxidant and Anti-viral Agent: A Review. *\*Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products\**, 8(3), 100-104.**

**\*\*Zhishen, J., et al. (1999). \*\* The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *\*Food Chemistry\**, 64(4), 555-559.**

**\*\*Zulhendri, F. et al. (2021). \*\* The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine. *\*Molecules\**, 26(9), 2591.**