

*République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique*

*Université Abderrahmane MIRA de Bejaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences Alimentaires*

# Mémoire de Fin de Cycle

*En vue de l'Obtention du Diplôme de Master en  
Biotechnologie, Agro-ressources, Aliments et Nutritions.  
Option biotechnologie*

## *Thème*

*Modélisation de l'extraction des antioxydants  
de miel par le modèle Box-Behnken, et étude des  
Activités antioxydantes et antibactériennes.*

**Réalisé par**

**M<sup>lle</sup> ABDELHADI Baya**

**M<sup>lle</sup> MOKRANE Hanane**

**Membre du jury**

**Présidente : M<sup>me</sup> BOULEKBECHE L.**

**Promoteur : M<sup>r</sup> BOUKHALFA F.**

**Examinatrices : M<sup>me</sup> FELLA S.**

**M<sup>me</sup> GUENDOUZ N.**

*Année Universitaire  
2013/2014*



# **R**emerciements

*En premier lieu, nous remercions dieu le tout puissant pour son aide et pour nous avoir donné volonté, courage et patience.*

*Aussi nous adressons un vif remerciement à notre promoteur  
**M<sup>r</sup> BOUKHALFA F.***

*Pour l'honneur qu'il nous a accordé en nous encadrant.  
Ce travail témoigne de son confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles.  
Qu'il trouve ici l'expression de notre Haute considération et notre Profonde reconnaissance.*

*Nos remerciements s'adressent également à **M<sup>me</sup> Boulekheche** d'avoir accepté de présider le jury et **M<sup>me</sup> FELLA.S** et **M<sup>me</sup> Guendouz.N** pour avoir accepté d'examiner Cet humble travail.*

*Nous tenons aussi à remercier tout le personnels du laboratoire pour leurs aides, leurs conseils et leurs gentilleses.  
Un grand merci à toute personne ayant contribué à l'accomplissement de ce modeste travail.*

*Merci*

*Baya et Hanane*







# Dedicaces

*Je dédie cette œuvre à tous ceux qui me sont chers :*

*A mes chère grand- mère yemma lalah et yemma Taous. et*

*mon chère-grand père que dieu les protèges qui m'on toujours soutenue*

*A mes très chers parents, Karim et Houria, qui ont constitué  
l'essentiel de mon univers et pour lesquels je voue beaucoup d'affection  
et de respect.*

*A ma sœur adorable : Samia qui n'a jamais cessé de m'apporter leur  
soutien et leur affection.*

*A mes deux frères Mohand , et Larbi.*

*A ma belle sœur Lila*

*A mes très chers neveux Samy, Kais, Ilyan, Melissa.*

*A mes cousins et cousines Soussou, sylvia et thiziri.*

*A mes oncles et tantes Nadir, Dada rachid, fatima, Kahina,  
lydia, Amine, Amina et Rayane.*

*A mon binôme, ma copine, Hanane et à toute sa famille.*

*A mes amies avec qui j'ai passé des moments agréables, en particulier à:  
Rida, Aicha, Djidi, Kahina, Linda, Fatima , Ouahiba, Nabil, Boussaad et  
Khalef et toutes celles que j'aime.*

*A tout la famille Abdelhadi*

*Baya*





# Dédicaces

*Je dédie cette œuvre à tous ceux qui me sont chers :*

*A mes chère grand- mère Faroudja et Saliha. et*

*Mon chère-grand père que dieu les protèges qui m'on toujours soutenue*

*A mes très chers parents, Malek et Nadia, qui ont constitué  
l'essentiel de mon univers et pour lesquels je voue beaucoup d'affection  
et de respect.*

*A ma sœur adorable Sara qui n'a jamais cessé de m'apporter leur  
soutien et leur affection.*

*A mon frère Nassim.*

*A mes cousins et cousines Saliha, Nassima Lydiya et Rosa*

*A mes oncles et tantes A la mémoire de mon oncle Mourad,  
Farid, Yahia, Lila, Djamilia, Fatiha, Ouahiba, Houria, Salima, Khadija, lila,  
Wissam, Adel, massilya, Oualid et Malak,*

*A mon binôme, ma copine, Baya et à toute sa famille.*

*A mes amies avec qui j'ai passé des moments agréables, en particulier à:  
Nassim, Rezkia, Djouhra, Linda, Hinane, Aziz, Wahchia, Fatima, Wiza,  
Samou, Linda, Fatima, Ouahiba, Nabil, Boussaad et Khaled et toutes celles  
que j'aime.*

*A tout la famille Mokrane*

*Hanane*





## Liste des abréviations

**Abs:** Absorbance.

**ANOVA:** Analyse de la variance

**BBD:** Box-Behnken Design.

**DCPIP:** 2, 6 di Chloro Phenol-Indo Phénol.

**°C:** degree celsius

**E.A.Asc:** Equivalent d'Acide Ascorbique.

**E.A.G:** Equivalent d'Acide Gallique.

**E.Q :** Equivalent de Quercétine

**E.β.C:** Equivalent de β-Carotène.

**KOH:** Sel de potassium.

**MF :** Matière fraîche

**Mo:** Molybdate.

**P:** Probabilité.

**RMS :** Méthode de Surface de Réponse.

**TPC:** Teneur en Composés Phénoliques.

## Liste des figures

<b>Figure n° 1:</b> Photographie du miel .....	03
<b>Figure n° 2 :</b> Production mondiale de miel en 2011 .....	08
<b>Figure n° 3 :</b> Représentation graphique de la reproduction de miel au niveau des différentes communes de la wilaya de Bejaia .....	09
<b>Figure n° 4 :</b> Structure chimiques de base des acides phénoliques.....	11
<b>Figure n° 5 :</b> Structure de base des flavonoïdes.....	12
<b>Figure n° 6 :</b> Structure principale de quelques caroténoïdes.....	13
<b>Figure n° 7 :</b> Structure chimique de la vitamine C.....	14
<b>Figure n° 8 :</b> Illustration de plan Box-Behnken pour quatre facteurs .....	17
<b>Figure n° 9 :</b> Echantillons de miel.....	19
<b>Figure n°10:</b> Effet du solvant sur la teneur en polyphénols extraite.....	28
<b>Figure n°11:</b> Plan de prédiction réelle de miel étudié.....	32
<b>Figure n°12:</b> Surface de réponse pour l'interaction puissance-temps.....	35
<b>Figure n°13:</b> Surface de réponse pour l'interaction puissance-solvant.....	35
<b>Figure n°14:</b> Surface de réponse pour l'interaction temps-solvant.....	35
<b>Figure n°15:</b> Surface de réponse pour l'interaction puissance rapport (miel/solvant).....	35
<b>Figure n°16:</b> Teneur moyenne en polyphénols totaux du miel étudié .....	38
<b>Figure n°17:</b> Teneur moyenne en flavonoïdes du miel étudié .....	39
<b>Figure n°18:</b> Teneur moyenne en anthocyanine du miel étudié .....	41
<b>Figure n°19:</b> Teneur moyenne en caroténoïdes du miel étudié.....	42
<b>Figure n°20:</b> Teneur moyenne en acide ascorbique du miel étudié .....	43
<b>Figure n°21:</b> Pouvoir réducteur en $FeCl_3$ des miels étudiés .....	45
<b>Figure n°22:</b> Pouvoir réducteur en phosphomolibdate du miel étudié .....	46
<b>Figure n°23:</b> Pouvoir anti-radicalaire (DPPH $\cdot$ ) de miel étudié.....	48
<b>Figure n°24:</b> Pouvoir anti-radicalaire (ABTS $^{+\cdot}$ ) de miel .....	49
<b>Figure n°25:</b> Diamètre de la zone d'inhibition <i>vis-à-vis</i> les trois souches bactériennes étudiés.....	50

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Régions de récolte des échantillons de miel.....	19
<b>Tableau II</b> : Niveaux des variables choisies pour les essais .....	20
<b>Tableau III</b> : Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols par le plan d'expérience Box-Behnken du miel étudiée .....	31
<b>Tableau IV</b> : Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de seconde degré de miel .....	33
<b>Tableau V</b> : Condition optimales d'extraction des polyphénols pour le miel.....	37

## Sommaire

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction ..... 01**

### **Partie bibliographique**

**I Généralités sur le miel ..... 03**

I-1 Définition ..... 03

I-2 Origine du miel ..... 03

I-2.1 Miel de nectar ..... 04

I-2.2 Miel de miellat ..... 04

I-3 Composition de miel ..... 04

I-4 Propriétés physiques du miel ..... 04

I-4.1 La couleur ..... 04

I-4.2 La viscosité ..... 05

I-4.3 La densité ..... 05

I-4.4 L'indice de réfraction ..... 05

I-4.5 La conductivité thermique et électrique ..... 05

I-4.6 L'acidité ..... 06

I-4.7 Le pouvoir rotatoire ..... 06

I-4.8 La cristallisation ..... 06



---

I-5 Propriétés biologiques du miel .....	06
I-5.1 Valeur nutritionnelle .....	06
I-5.2 Propriétés thérapeutiques .....	07
I-5.3 Propriétés antibactériennes .....	07
I-6 Production du miel .....	07
I-6.1 Production mondiale de miel .....	07
I-6.2 Commerce mondial .....	08
I-6.3 Production de miel au niveau de la wilaya de Bejaia .....	08
<b>II Généralité sur les activités des molécules bioactives .....</b>	<b>10</b>
II-1 Les molécules bioactives et leur activités biologiques .....	10
II-1.1 Les polyphénols .....	10
II-1.2 Les flavonoïdes .....	12
II-1.3 Les caroténoïdes .....	13
II-1.4 La vitamine C .....	13
II-1.5 Les oligo- éléments .....	14
<b>III Généralité sur les plans d'expériences .....</b>	<b>15</b>
III-1 Définition de plan d'expérience .....	15
III-2 Principe .....	15
III-3 Terminologie .....	16
III-4 Plans pour surfaces de réponse (RSM) .....	16
III-5 Plan Box- Beh .....	17
III-5.1 Définition du plan de Box-Behnken .....	17
III-5.2 Quelques applications des plans Box-Behnken .....	18

## Partie pratique

<b>IV Matériel et méthode .....</b>	<b>19</b>
IV-1 Echantillonnage .....	19
IV-2 Extraction des antioxydants .....	20
IV-2.1 Optimisation des conditions d'extraction .....	20
IV-3 Dosage des antioxydants .....	21
IV-3.1 Les polyphénols totaux .....	21
IV-3.2 Les flavonoïdes .....	21
IV-3.3 Les anthocyanines .....	22
IV-3.4 Les caroténoïdes .....	23
IV-3.5 l'acide ascorbique (vitamine C) .....	23
IV-4 Détermination de l'activité anti-oxydante .....	24
IV-4.1 pouvoir réducteur .....	24
IV-4.1.1 Réduction de chlorure ferrique .....	24
IV-4.1.2 Réduction du phosphomolybdate .....	24
IV-4.2 Neutralisation des radicaux libres .....	25
IV-4.2.1 Neutralisation du radical DPPH <sup>·</sup> .....	25
IV-4.2.2 Neutralisation du radicale ABTS <sup>·+</sup> .....	25
IV-5 Détermination de l'activité antibactérienne .....	26
IV-5.1 Le principe .....	26
IV-5.2 Les étapes de la réalisation d'une activité bactérienne .....	26
IV-5.2.1 Préparation du standard de turbidité Mc Ferland .....	26

---

IV-5.2.2Préparation des disques.....	27
IV-5.2.3Ensemencement des géloses .....	27
IV-5.2.4Incubation .....	27
IV-5.2.5Lecture et interprétation des résultats .....	27
IV-5.3Etude statistique.....	27
<b>V Résultats et discussions .....</b>	<b>28</b>
V-1 Optimisation et conditions d'extraction des antioxydants .....	28
V-1.1 Essai préliminaires .....	28
V-1.1.1 Choix du solvant .....	28
V-1.1.2Choix de la puissance.....	29
V-1.1.3Choix du temps d'extraction .....	29
V-1.2 Plan d'expérience Box- Behenke .....	30
V-1.2.1Analyse des résultats .....	30
V-1.2.2Validation du model.....	32
V-1.2.3Modèle mathématique.....	36
V-1.2.4.Solution .....	37
VI Dosage des antioxydants.....	37
VI-1 Polyphénols totaux.....	37
VI-2 Flavonoïdes.....	39
VI-3 Les anthocyanines.....	40
VI-4 Les caroténoïdes .....	41
VI-5 Acide ascorbique .....	43

VI-6 Evaluation des activités antioxydantes .....	44
VI-6.1 Pouvoir réducteur.....	44
VI-6.1.1 Réduction du chlorure ferrique (FeCl <sub>3</sub> ) .....	44
VI-6.1.2 Réduction du Phosphomolybdate .....	46
VI-6.2 Pouvoir anti-radicalaire .....	47
VI-6.2.1 Pouvoir anti-radicalaire DPPH <sup>·</sup> .....	47
VI-6.2.2 Pouvoir anti-radicalaire ABTS <sup>·+</sup> .....	49
VI-7 Activité antibactérienne .....	50
Conclusion.....	52





*Introduction*

## Introduction

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène. Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. Cette situation de dysfonctionnement cellulaire, entraîne plusieurs maladies telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires, les troubles neuro-dégénératifs et différents types de cancers (**Ramos et al., 2003**).

Des études épidémiologiques ont montré une faible incidence chez les populations des régions méditerranéennes. Cette protection apparaît liée aux régimes alimentaires de ces populations basé essentiellement sur la consommation des produits du terroirs de la région, entre autres l'huile d'olive et le miel, dont l'effet bénéfique serait lié aux micro-constituants qu'elle renferme, entre autres les caroténoïdes, les polyphénols, les flavonoïdes, les vitamines et certains minéraux (**Lako et al., 2007**).

Le miel représente une bonne source d'antioxydants, qui fait de lui un bon aliment et un additif de l'agro-alimentaire. Au-delà d'être un aliment de valeur énergétique très élevée, et facilement assimilable (**Biri, 2003**), il a été employé dans l'ethnomédecine depuis les premiers humains, jusqu'aux temps les plus récents, dans le traitement des brûlures, désordres gastro-intestinaux, asthmes, blessures infectées et les ulcères de peau (**Kucuk et al., 2005**).

L'Algérie, parmi les pays méditerranéens producteurs du miel, utilisés non seulement pour l'alimentation mais aussi dans la formulation et la préparation d'autres produits alimentaires ou même thérapeutique à objectif médicinal.

La richesse en anti-oxydants diffère de manière quantitative et qualitative d'un miel à un autre, en fonction de plusieurs paramètres à savoir le climat et l'altitude, d'où la variation du pouvoir antioxydants. Et vu la diversité des composés antioxydants dans ce produit naturel, des processus spécifiques et optimisés doivent être désignés pour leur extraction (**Pinelo et al., 2005**).

Plusieurs modèles mathématiques ont été élaborés pour mieux gérer les interdépendances de ces échantillons **Derkyi et al., (2011)**, parmi ces modèles ; la méthode de surface de réponse (RSM) est largement utilisée dans les études d'optimisation des multi variables dans différents processus chimiques et biotechnologiques **Chang et al., (2006)**, dont s'inscrit l'objectif de la

présente étude qui consiste à la modélisation de l'extraction des antioxydants du miel, en mettant en œuvre un plan d'expérience de type « Box-Behenken » et également à étudier sa composition en antioxydant, entre autre les composés phénoliques, acide ascorbique, caroténoïdes, pour mieux évaluer ses capacités antioxyante et antibactérienne.



*Synthèse  
bibliographique*



## I. Généralité sur Le miel

### I-1 Définition

Selon la commission du **Codex Alimentarius**, (2001), la définition légale du miel est « la substance sucrée naturelle produite et traitée par les abeilles mellifiques de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions provenant des parties vivantes des plantes ou des excréments laissés par les insectes suceurs qu'elles butinent, transforment les combinent avec la matière spécifique propre, emmagasine et laisse murir dans les rayons de la ruche, cette denrée peut être fluide, épaisse ou cristallisée ». Il est largement considéré comme le seul concentré de sucre universellement disponible, aussi utilisé comme aliment conservé (Meda, 2005).



**Figure n°1** : Photographie du miel (Meda, 2005).

### I-2 Origine du miel

L'origine du miel, est importante vis-à-vis de l'évaluation de sa qualité par les consommateurs. son origine botanique influence sur ses caractéristiques organoleptiques ainsi que son origine géographique **Baroni et al.**, ( 2009). IL existe deux grandes variétés de miel selon l'origine sécrétoire, soit à partir du nectar ou à partir de miellat recueilli sur les plants. (Meda, 2005).

### I-2.1 Miel de nectar

Appelé aussi miel de fleur, il est un suc ou une solution sucrée, sécrétée par une glande spatiale appelé nectaire, dont sa production dépend de l'âge, de la taille et de la position de la fleur, de l'humidité relative de l'air, de la durée de floraison, du sexe des fleurs, de l'espèce et enfin du milieu environnant (**Sanz et al., 2008**).

Le nectar des plantes est une source d'énergie pour l'abeille vu sa richesse, principalement en sucres simples mais aussi en acides aminés, en vitamines, en sels minéraux, en protéines, en lipides, pigments et en enzymes (**Blanc, 2010**).

### I-2.2 Miel de miellat

Le miellat provient d'une substance rejetée par les insectes piqueurs et suceurs de la famille des homoptères (pucerons, cochenilles) qui absorbent la sève des plantes et rejettent les matières sucrées sous forme de gouttelettes, que les abeilles récupèrent sur les feuilles des plantes (**Lequet., 2010**).

## I-3 Composition de miel

Le miel renferme plus de 181 substances différentes (**Al-mamary et al., 2002**).

Sa composition chimique varie d'un échantillon à l'autre, et dépend étroitement de l'origine botanique, la nature du sol, de l'eau et autres facteurs (**Bath et Singh, 1999**).

Le miel est un produit semi-liquide qui contient différents glucides, principalement le glucose et le fructose, et d'autres sucres présents sous forme de traces.

Les acides organiques, les lactones, les acides aminés, les minéraux, les vitamines, les enzymes, le pollen, la cire et les pigments sont aussi présents dans le miel (**Fallico et al., 2004**) (**Annexe I**).

## I-4 Propriétés physiques du miel

### I-4.1 La couleur

La couleur des miels est par nature, extrêmement variable puisque les plus clairs sont presque incolores alors que les plus foncés sont pratiquement sombres (**Louveau, 1985**).

Les diverses couleurs du miel sont généralement toutes des nuances du jaune brun. Cependant, il existe des miels de couleurs moins communes tels que les miels grisâtres (tournesol) et les miels verdâtres (miellat) (Lequet., 2010).

#### I-4.2 La viscosité

La majorité des miels ont une viscosité moyenne ; ils suivent les lois de newton sur l'écoulement des fluides Louveau, (1985). Cependant, certains miels tels que les miels de bruyère et de *manuka* ont une viscosité plus élevée ; ils sont dits thixotropes. Au repos, ils sont gélatineux, mais il suffit de les remuer pour les rendre fluides (Lequet, 2010).

#### I-4.3 La densité

La densité du miel est comprises entre 1,39 et 1,44 à 20°C (Al-Khalifa et Al-Arif., 1999 ; Jean-Prost et Médori, 2005).

Les deux propriétés, densité et viscosité, dépendent fortement de la teneur en eau, de la température est à moindre degré de la composition chimiques du miel (Mossel et al., 2003 ; Gidamis et al., 2004).

#### I-4.4 L'indice de réfraction

L'indice de réfraction du miel est d'autant plus élevé que sa teneur en eau est plus basse ; il oscille entre 1,5041 et 1,4915 à 20°C pour une teneur en eau allant de 13 à 18% pour la majorité des miels (Lobreau Callen et al., 1999) .

#### I-4.5 La conductivité thermique et électrique

Le miel n'est pas un bon conducteur de la chaleur ; sa conductivité thermiques n'est pas très différente de celle de l'eau ; elle est de  $540 \times 10^{-3}$  w/m .k pour un miel finement cristallisé contre  $580 \times 10^{-3}$  W /m .k pour l'eau pure.

La conductivité électrique est considéré comme l'un des meilleurs paramètres utilisés pour la différenciation entre les miels floraux et ceux du miellat, ainsi que pour la classification des miels uni floraux (Bogdanov et al., 2004 ; Terrab et Heredia, 2004).

La conductivité électrique du miel est d'autant plus élevée que sa teneur en substance minérales est élevée (Lobreau Callen et al., 1999).

#### I-4.6 L'acidité

Les miels sont acides ; leur pH est généralement compris entre 3,2 et 5,5. Les miels de châtaigner font exception ; leur pH peut atteindre une valeur de 6. Le pH du miel est fonction de la quantité d'acide ionisable ( $H^+$ ) qu'il renferme ainsi que de sa composition minérale (Gonnet., 1982 ; Bogdanov et al., 2004).

#### I-4.7 Le pouvoir rotatoire

Le miel présente la propriété de dévier le plan de la lumière polarisée ; le pouvoir rotatoire global dépend de la nature et des proportions relatives des sucres présents dans le miel (Dinkov, 2003). Cette propriété est très utilisée pour la détermination de l'origine botanique du miel.

#### I-4.8 La cristallisation

Le miel possède également une autre propriété physique qui est la cristallisation. En effet, dans la ruche, à 35°C, ce produit est liquide mais une fois exposé à l'air, certains de ses glucides ont tendance à se cristalliser autour d'un cristal microscopique de glucose, d'une poussière ou d'un grain de pollen. La vitesse de cristallisation dépend de la température de conservation et de la nature des sucres ainsi que leur solubilité dans l'eau Gonnet, (1982). Selon Jean Prost et Médori, (2005), les miels riches en glucose cristallisent beaucoup plus vite que ceux riches en fructose.

### I-5 Propriétés biologiques du miel

#### I-5.1 Valeur nutritionnelle

Le miel est conseillé pour toute personne, il contribue à l'amélioration des capacités de l'organisme des personnes âgées et des malades (Blasa et al., 2006).

En effet le miel est une source d'énergie grâce à sa teneur élevée en glucides, enzymes, vitamines et une source importante de nombreux oligo-éléments indispensables au métabolisme et facilitant la digestion (Mendes et al., 1998).

Il favorise l'assimilation du calcium et l'absorption du magnésium qui sont deux minéraux indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (Meda, 2005).



### I-5.2 Propriétés thérapeutiques

Les vertus thérapeutiques du miel sont attribuées à son activité antioxydante et antibactérienne, il est utilisé pour le traitement des brûlures, des désordres gastro-intestinaux, de l'asthme et des ulcères de peau (Al-Mamary *et al.*, 2002 ; Ferreira *et al.*, 2009).

Administré par voie buccale, le miel peut guérir ou soulager l'insomnie, les maux de gorge et certaine infection gastrique. Il augmente aussi la teneur du sang en hémoglobine et la vigueur musculaire (Jean-Prost., 2005).

### I-5.3 Propriétés antibactériennes

L'activité antibactérienne du miel varie d'un miel à un autre selon la source du nectar et de miellat et de la teneur en différents antioxydants (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Les flavonoïdes et les acides phénoliques du miel possèdent des propriétés antibactériennes importantes (Blanc, 2010).

Les facteurs physiques : l'osmolarité, la viscosité et l'acidité élevée du miel contribuent également à l'inhibition de nombreuses espèces bactériennes (Basualdo *et al.*, 2007).

Le miel du fait de son osmolarité conséquente à sa forte teneur en sucre, crée un appauvrissement de l'eau disponible pour les germes et bactéries mettant en péril leur vie (Nathalie., 2012).

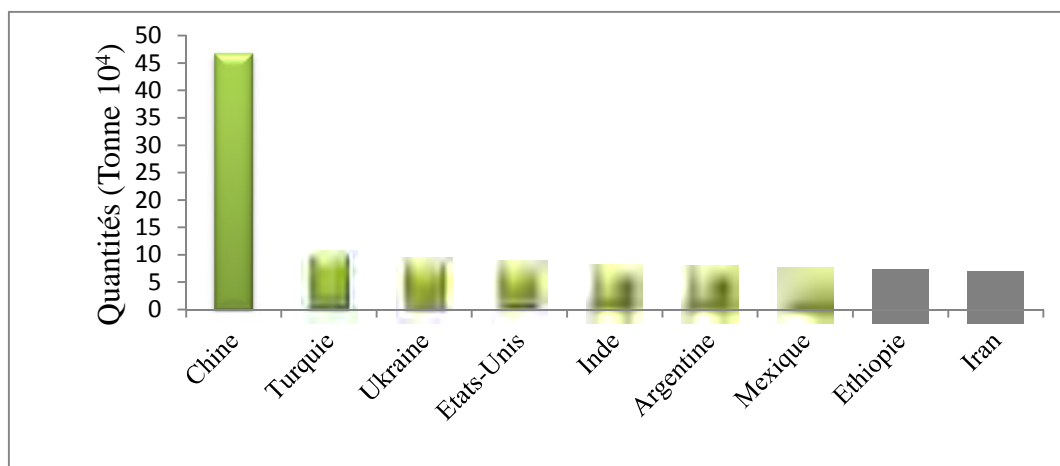
Par sa viscosité, le miel forme une barrière protectrice sur les plaies qui prévient ainsi la formation du biofilm (agrégats complexes de nombreuses espèces bactériennes)

(Nathalie., 2012).

## I.6 Production du miel

### I.6.1 Production mondiale de miel

La production mondiale a enregistré une hausse importante, soit une augmentation continue d'une année à une autre. La Chine est en première position avec 46,7% de la production mondiale en 2010 (FAOSTAT, 2011) (Annexe II).



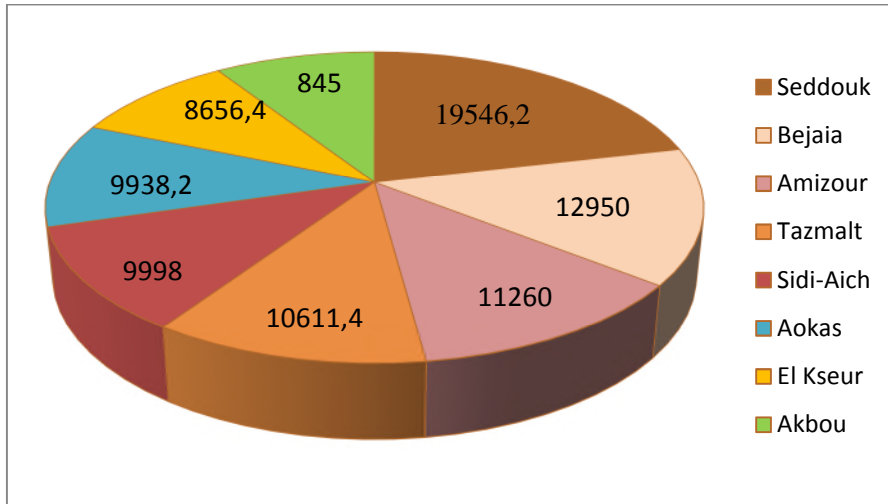
**Figure n°2 : Production mondiale de miel en 2011 (FAOSTAT, 2011).**

### **I-6.2 Commerce mondial**

Dans le commerce du miel, la Chine, l'Argentine et le Mexique sont les trois premiers pays exportateurs. La Chine, en tant que plus grand producteur, fournit plus d'un quart de la production mondiale (34,8%) en 2010.

### **I-6.3 Production de miel au niveau de la wilaya de Bejaia**

Selon la Compagne Agricole 2011-2014 : la wilaya de Bejaia a produit au total 121400 Kg de miel. Seddouk se retrouve en tête avec une production de 19546,2Kg, suivi de la commune de Kherrata et de Bejaia qui produisent 16429 et 12950Kg respectivement (Annexe III).



**Figure n°3 :** Représentation graphique de la reproduction de miel au niveau des différentes communes de la wilaya de Bejaia (2011-2012).

## II Généralité sur les activités des molécules bioactives

### II-1 Les molécules bioactives et leur activités biologiques

Un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui peut retarder ou prévenir de manière significative l'oxydation d'un substrat **Pincemail et al., (1998)**, ce qui le rend capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libre dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentration non cytotoxiques de ROS (**Vansant., 2004**).

Les antioxydants sont classés selon leur cible et leur mécanisme d'action (antioxydants primaires, antioxydants secondaires), selon leur nature hydrosoluble ou liposoluble, ou selon leur origine naturelle ou synthétique.

Les antioxydants synthétiques sont des composés avec des structures phénoliques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisol (BHA), et le propyle gallate qu'on utilise dans l'industrie alimentaire comme antioxydants (**Gulcin et al., 2004**).

Les antioxydants naturels peuvent être des composés phénoliques (acide ascorbique, tocophérols) et même des oligo-éléments, apportés par l'alimentation (**Kohen et Nyska., 2002**).

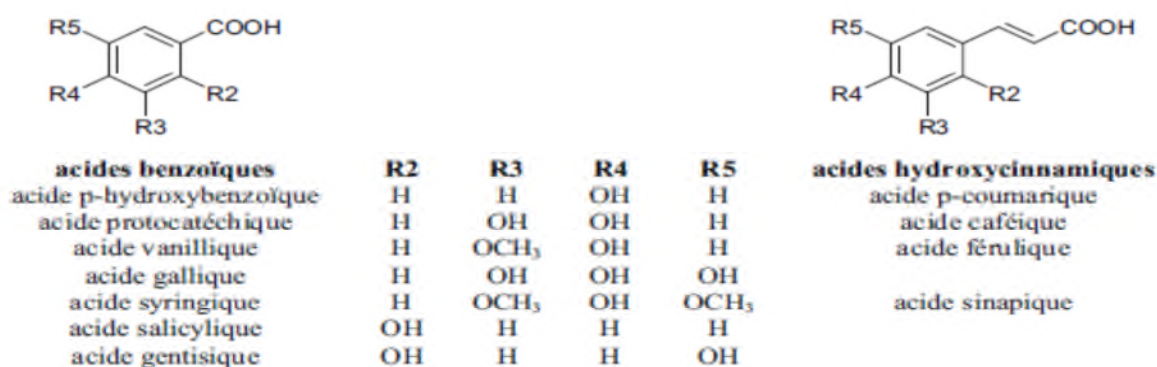
#### II-1.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la plantes contre les agressions environnementales (**Gee et al., 2001**).

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs classes : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...)

**Bruneton, (1999).** Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Ribéreau-Gayon, 1968**).



**Figure n°4:** Structure chimiques de base des acides phénoliques (**Chira et al., 2008**).

#### ❖ **Activité biologiques des polyphénols**

Les composés phénoliques ont un large spectre d'activités biologiques tel que l'activité antimicrobienne et anti-oxydante (**Ksouri et al., 2006**).

L'activité anti-oxydante des composés phénoliques se manifeste par leur grande réactivité en perdant un proton pour donner un radical libre fortement stabilisé inhibant ainsi l'oxydation de façon indirecte en désactivant l'oxygène singulet (O<sub>2</sub>) ou en chélatant les métaux (**Berset, 1999**).

Les polyphénols sont connus pour avoir des activités antibactériennes contre un grand nombre de bactéries pathogènes **Karou et al., (2005)**. Ils agissent soit sur la membrane bactérienne en perturbant son plénitude, soit en inhibant les enzymes extracellulaires, ou bien en se complexant avec les substance comme les métaux (**Smith et al., 2005**).

L'action antimicrobienne est liée à leur capacité de dénaturer les protéines et agissent en provoquant le fuite cytoplasmique des constituants (les protéines, le potassium et le phosphore), qui est peut être du à la perturbation peptidoglycane de la cellule (**Sousa et al., 2006**).

## II-1.2 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi des végétaux.

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) constitué de deux noyaux aromatiques, sont désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (figure6) (**Harborne et Williams., 2000**).

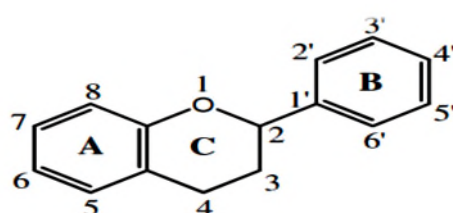


Figure n°5 : Structure de base des flavonoïdes.

### ❖ Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont connus pour les nombreuses activités biologiques à savoir les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses **Marfak, (2003)**. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées **Fuhman et al., (1995)**. L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes (**Halliwell, 1994 ; Cotelle., 2001**).

L'action antimicrobienne des flavonoïdes est souvent expliquée par l'inhibition de fonctionnement de la membrane cytoplasmique, provoquant par la suite une lésion de la bicouche lipidique par pénétration directe en arrêtant la fonction de la barrière membranaire ou par la fuite de matériel intracellulaire en formant un agrégat par l'union des deux membranes (**Cushnie et Lamb., 2005 ; Ikigia et al., 1995**).

### II-1.3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles, de couleur jaune à rouge, synthétisés par les plantes phototrophes, présents dans les chloroplastes et dans certains plastes qui colorent les fleurs, les fruits ou les racines (**Krinsky, 1989 ; Rodriguez-Amaya, 2001**).

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des tétra-terpènes ( $C_{40}$ ), formés de huit unités à cinq atomes de C, liées par le modèle tête-à-queue. Son squelette est linéaire et symétrique à la base et peut avoir des cycles à ses extrémités. Ils contiennent une chaîne centrale hautement polyinsaturés (**Rao et al., 1999 ; Rodriguez-Amaya, 2001**).

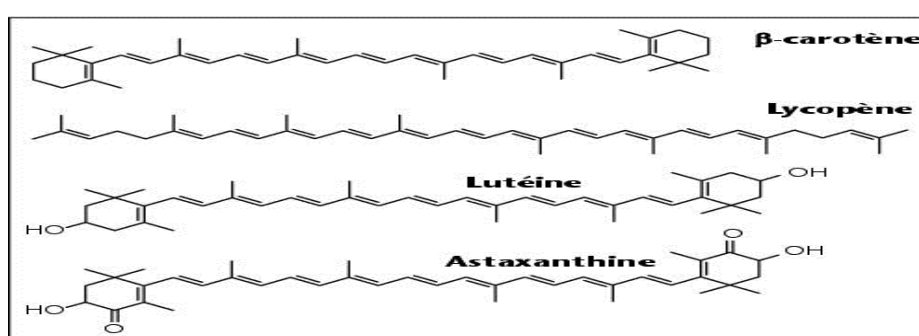


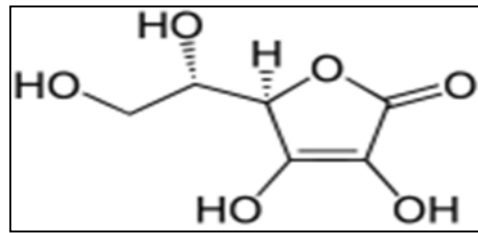
Figure n°6 : Structure principale de quelques caroténoïdes.

#### ❖ Activités biologiques des caroténoïdes

Les caroténoïdes agissent en stabilisant les radicaux libres ( $ROO\cdot$ ) en les neutralisant par transfert d'hydrogène **El-Agamey et al., (2004)**. Ils protègent contre les radiation solaires par absorption de leur énergie tout en protégeant la peau des dommages oxydatifs **Stahl et al., (2000)**. Ils jouent un rôle préventif contre plusieurs formes du cancer (prostate et de sein), les maladies cardio-vasculaires et l'érythème provoqué par la lumière (**Dias et al., 2009**).

### II-1.4 La vitamine C

La vitamine C, ou L-acide ascorbique, est l'antioxydant hydrosoluble majeur. Elle est facilement oxydée par l' $O_2$  en milieu neutre ou alcalin (**Couplan, 1998 ; Berthet et Costesec, 2006**), stable en milieu acide et très stable lorsqu'elle est séchée. Elle est thermosensible et subit une altération en contact avec les métaux et la lumière (**Couplan, 1998**).



**Figure n°7:** Structure chimique de la vitamine C.

### ❖ Activités biologiques de la vitamine C

La vitamine C possède une action anti-infectieuse et antitoxique vis-à-vis des poisons chimiques et des toxines bactériennes. Elle joue un rôle important dans la prévention des cancers et favorise l'absorption de fer et de calcium alimentaire (**Couplan, 1998**).

### II-1.5 Les oligo- éléments

Les oligo- éléments appelés aliments protectifs, micronutriment sont présents en très petits quantités dans l'organisme (élément-trace) et indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (**Ducros et Favier, (2004)**). Ils doivent être apportés par la ration alimentaire quotidienne. Certains d'eux présentent une propriété antioxydante tel que : le Sélénium, Cuivre, Manganèse et Zinc.

### ❖ Activités biologiques des oligo-éléments

Les oligo-éléments participent à la défense antioxydante. Par le biais de systèmes enzymatiques qui constituent une principale ligne de défense contre les agressions des radicaux libres (**Couplan, 1998**).

Certains éléments sont doués de plusieurs activités tel que l'activité antibactérienne (l'argent), anti-inflammatoires (l'or), anti-infectieuses (le soufre) et même antitoxique (la silice et l'iode) (**Couplan, 1998**).



### III Généralité sur les plans d'expériences

#### III-1 Définition de plan d'expérience

Un plan d'expérience consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales de manière à révéler les effets de différents traitements, **(Pierre, 2009)**.

La méthode d'expérimentation choisie doit faciliter l'interprétation des résultats, et minimiser le nombre des essais sans toutefois sacrifier la qualité.

L'objectif principal peut être résumé par la devise : « Obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expérience » **(Tinsson, 2010)**.

#### III-2 Principe

Il consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou de plusieurs facteurs, qui sont les variables, discrètes ou continues, à chaque essai. Ceci va permettre de diminuer fortement le nombre d'expériences à réaliser tout en augmentant le nombre de facteurs étudiés, en détectant les interactions entre les facteurs et les optimaux par rapport à une réponse **(Faucher, 2006)**.

Il existe différents types de plans d'expérience, qui peuvent être toutefois regroupés en grandes familles :

1. Les plans factoriels complets ou fractionnaires à deux niveaux ;
2. Les plans factoriels à plus de deux niveaux ;
3. Les plans en blocs complet ou incomplets ;
4. Les plans de surface de réponse ;
5. Les plans de mélange ;
6. Les plans optimaux **(Chagnon, 2005)**.

Chacun de ces plans, diffère selon ses propriétés, permet de résoudre certains problèmes particuliers. On peut cependant diviser les plans d'expériences en deux grandes catégories :

- Les plans pour étudier (estimer et comparer) les effets des paramètres ;
- Les plans pour régler les paramètres afin d'atteindre un optimum (**Faucher, 2006**).

### III-3 Terminologie

**Réponse** : C'est la grandeur physique étudiée (**Vivier, 2002**).

**Facteur** : Sont les variables qui peuvent modifier la réponse (**Goupy et Creighton, 2006**).

**Niveau d'un facteur** : Est la valeur donnée à un facteur pour réaliser une expérience (**Goupy et Creighton, 2006**).

**Domaine d'étude** : domaine expérimental délimité par les niveaux inférieurs et supérieurs des facteurs étudiés (**Chaabouni et al., 2011**).

**Plan d'expérimentation** : matrice déclinant l'ensemble des conditions expérimentales, imposées aux variables naturelles pour la réalisation des différents essais, dans le cadre du plan d'expériences choisi (**Chaabouni et al., 2011**).

**Matrice d'expériences** : indique les niveaux pris par les variables codées aux différentes expériences (**Chaabouni et al., 2011**).

### III-4 Plans pour surfaces de réponse (RSM)

La méthode des surfaces de réponse (RSM) est une technique d'analyse statistique puissante, bien adaptée à la modélisation des processus complexes où la réponse est influencée par plusieurs variables et dont l'objectif est d'optimiser cette réponse.

Box et Wilson sont les premiers à introduire la théorie de la RSM en 1951, et qui devient par suite la plus utilisée pour l'optimisation des processus.

Dans ce modèle, plusieurs types de plans sont utilisés, les plus connus et les plus utilisés sont les plans composites centrés, les plans Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans hybrides (**Chagnon, 2005**).

Le modèle mathématique utilisé avec le plan de Box-Behnken pour quatre facteurs est un modèle du second degré classique :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + e$$

Ou :

**Y** : la réponse ou la grandeur d'intérêt, mesurée ou cours de l'expérimentation et obtenue avec une précision donné ;

**X<sub>i</sub>, X<sub>j</sub>** : Le niveau attribué aux facteurs *i* et *j* par l'expérimentateur pour réaliser un essai, valeur parfaitement connue, dont ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression) ;

**a<sub>0</sub>, a<sub>i</sub>, a<sub>ij</sub>, a<sub>ii</sub>** : Les coefficients du modèle mathématique adoptés à priori, doivent être calculés à partir des résultats des expériences ;

**e** : l'erreur

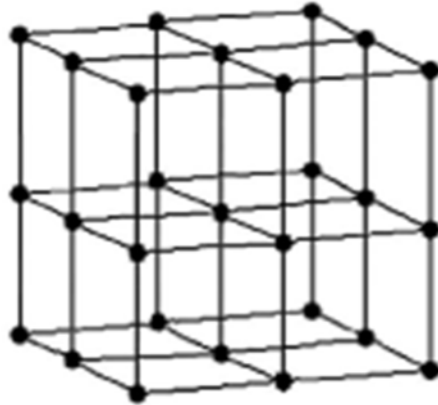
### III-5 Plan Box- Behnken

#### III-5.1 Définition du plan de Box–Behnken

Le plan de Box-Benken est un exemple de modélisation de surface de réponse (RMS). Il nécessite 15 à 27 essais, qui sont dans la plupart des cas satisfaisants (**Myers et al., 1995**).

Il possède des structures symétriques dans lesquelles chaque facteur prend trois niveaux. Il est la combinaison de plans factoriels à deux niveaux, avec des blocs incomplets équilibrés suivant un arrangement particulier avec plusieurs essais au centre du domaine expérimental (**Chagon, 2005**).

Le plan de Box-Behnken pour quatre facteurs, est un cube possède 16 arête qui représente 27 essai à qui sont ajoutés, habituellement points d'expériences, au centre du domaine d'étude (**Goupy et Creighton, 2006**) (**Annexe IV**).



**Figure n°8** : Illustration de plan Box-Behnken pour quatre facteurs (Goupy, 2006).

### III-5.2 Quelques applications des plans Box-Behnken

- Optimisation de l'électrophorèse sur papier, exemple : Hous et ses collègues ont optimisé une séparation simultanée des sulfamides, d'inhibiteurs de la dihydrofolate réductase et des  $\beta$ -lactamines par électrophorèse capillaire.
- Optimisation des fermenteurs, exemple : Optimisation de la production du biohydrogène à partir du sirop de sorgho (Saraphirom et Reugsang, 2010).



*Partie  
pratique*

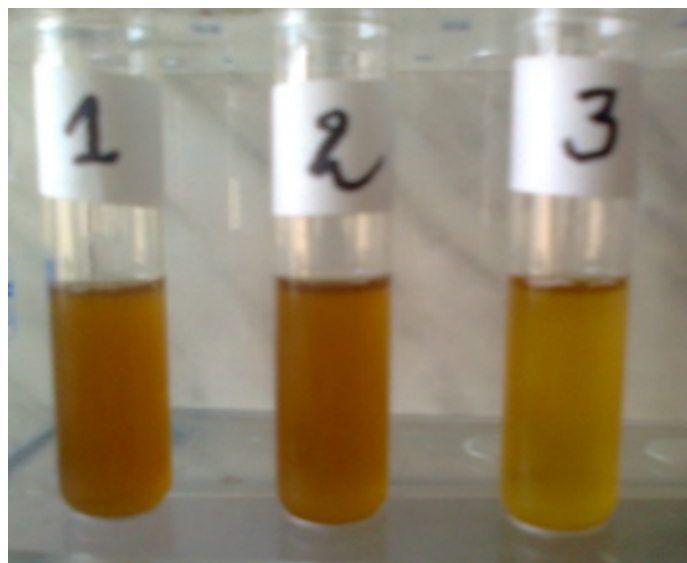


*Matériel et méthodes*

## IV Matériel et méthode

### IV-1 Echantillonnage

Les échantillons de miel, au nombre de trois offerts par les apiculteurs, ont été récoltés durant le mois de juillet de l'année 2013, d'une manière aléatoire, dans différents régions de la wilaya de Bejaia (Tableau3). L'extraction du miel a partir des cadres de cire, provenant de ruches traditionnelle et réaliser manuellement (pression).



**Figure N°9** : Echantillons de miel

**Tableau I** : Régions de récolte des échantillons de miel.

Echantillon de miel	Régions de récolte	Plantes mellifères dominantes	Couleur
1	Akfadou	chêne, eucalyptus, romarin, figuier de barbarie, romarin	Marron foncée
2	Ighil-Ali (Djedida)	Chêne, eucalyptus, romarin, ronce, oranger, citronnier, figuier de barbarie	Marron
3	Sidi-Aich (Tibane)	Figuier de barbarie, romarin, lavande, ronce	Jaune

## IV-2 Extraction des antioxydants

L'extraction des antioxydants du miel étudié est réalisée selon la méthode décrite par (Al-Farsi et al., 2005 et Heinonen et al., 1998), avec l'éthanol (50%) comme solvant d'extraction.

Une prise d'essai du miel (1g) est mise en contact avec 7ml de solvant d'extraction (éthanol 50%). A près une agitation mécanique pendant 60 minutes à une puissance donnée pendant un temps donnée, à l'abri de la lumière, le miel est filtré, et le résidu subit deux autre extractions dans la même condition jusqu'à l'obtention d'une couleur plus au moins transparente (Annexe V).

### IV-2.1 Optimisation des conditions de l'extraction

Le model expérimental est divisé en deux parties. Un essai préliminaire est effectué pour déterminer le type de solvant d'extraction, selon le model classique d'extraction en variant un paramètre (type de solvant) et fixant les autres (temps et puissance) (Al-Farsi et al., 2005 et Heinonen et al.,1998).

L'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques à partir des variétés de miels étudiés selon la méthode de surface de réponse (RMS), un model mathématique polynomial à été développé, le type du model choisi et le plan de Box-Behnken Goupy, (2006). Quatre facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ) à trois niveaux (-1 ,0 et +1) sont appliqué pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir des variétés de miels étudiés qui sont illustrées dans le tableau suivant.

**Tableau II** : Niveaux des variables choisies pour les essais (Goupy, 2006).

Les variables	(-1)	(0)	(+1)
Puissance (W)	300	500	700
Temps (s)	60	90	120
Solvant (%)	30	50	70
Rapport solvant/Matière (%(v /v))	1/5	1/10	1/15



Le plan de Box-Behnken comprend 27 essais dont l'essai centré (0, 0, 0, 0) est répété quatre fois pour vérifier l'erreur type et la reproductibilité du procédé d'extraction (**Annexe VI**).

### IV-3 Dosage des antioxydants

#### IV-3.1 Les polyphénols totaux

La teneur en composés phénolique totaux des extraits selon la méthode décrite par (**Wilferd et al., 2006**).

Les 500µl d'extrait sont additionnées à 1,5 ml de réactif de folin-Ciocalteu (dilue dix fois), Auquel un volume de 1,5 ml de carbonate de sodium (60g/l) est ajouté après cinq minutes. Après une incubation de 90 mn à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 725 nm.

La concentration en composés phénoliques des extraits, exprimée en gramme d'équivalent d'acide gallique (EAG)/100g de l'échantillon, est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue dans la même condition on expérimentale en utilisant l'acide gallique (**Annexe VII**).

#### IV-3.2 Les flavonoïdes

Le teneur en flavonoïdes des extraits étudiés est évaluée selon la méthode décrite par (**Ordonez et al., 2006**).

Pour 1,5 ml d'extrait sont ajoutées 1,5 ml de chlorure d'aluminium (2%).Après un heur d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à420nm.

La teneur en flavonoïdes, exprimée en mg d'équivalent de quercitrine (EQ) /100g de l'échantillon, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions expérimentale avec de la quercétine (**Annexe VII**).

### IV-3.3 Les anthocyanines

La teneur en anthocyanine est déterminée selon la méthode décrite par **Lako et al., (2007)**, légèrement modifiée en utilisant les tampons de chlorure (pH=1,0025 M) et d'acétate (pH=4,5. 0,4 M).

Une quantité de miel 2g est mélangée avec 10ml d'eau distillée, l'égerment acidifiée avec l'acide chlorhydrique (0,1N). Après 15minutes d'agitation, le mélange est filtré, le résidu subit une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les filtrats additionnés, sont centrifugés à 1500g pendant 10 minutes.

Deux tubes à essai, contenant chacun 1ml d'extrait, sont ajoutés 8ml de tampon (pH=1,0) pour le premier et 8ml de tampon (pH=4,5) pour le deuxième tube, et l'absorbance est mesurée à 510 nm et à 700 nm pour chacun.

Les teneurs en anthocyanines, exprimées en mg d'équivalent cyanidines-3-glucoside par 100g de produite, sont calculées selon la formule suivante :

$$\text{Anthocyanine (mg/100g)} = \frac{\text{Abs} \times \text{MM} \times \text{FD} \times (\text{V/P}) \times 100}{\epsilon \times \text{L}}$$

**Avec :**

**Abs :** absorbance à 510 nm.

**L :** Trajet optique.

**FD :** Facteur de dilution.

**P :** Masse de l'échantillon (mg).

**V :** Volume final de l'extrait (ml).

**MM :** Poids moléculaire de cyanidines-3-glucoside (449.2 g/mol).

**ε :** Coefficient d'absorbance molaire de la cyanidines-3-glucoside (26900).

#### IV-3.4 Les caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes totaux des échantillons étudiés est déterminée selon la méthode décrite par **Wang et al., (2008)**, qui consiste à extraire les caroténoïdes, à l'abri de la lumière, en homogénéisant 5ml de l'extrait avec 30 ml d'un mélange de solvants (hexane, acétone, méthanol : 12 :9 :9 ) pendant 15mn.

Deux millilitres d'une solution de KOH (1M) sont additionnés au mélange qui sera gardé à l'abri de la lumière pendant 16 h, Ensuite, sont ajoutés respectivement ,30ml d'hexane et après une minute, 30 ml d'une solution de sulfate de sodium (1%). le mélange est laissé à décanter, à l'abri de la lumière, pendant une heure et la phase supérieure qui représente l'extrait caroténoïde est récupérée.

L'absorbance des extraits est mesurée à 450 nm et la concentration en caroténoïdes est estimée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le  $\beta$ -carotène (**Annexe VII**).

#### IV-3.5 l'acide ascorbique (vitamine C)

La teneur en acide ascorbique des échantillons est déterminée selon la méthode de **Klein et Perry, (1982)**, légèrement modifiée ou le solvant d'extraction l'acide métaphosphorique (1%) est remplacé par l'acide oxalique (0,4%).

Une quantité de miel (5g) est mélangé avec 25ml de solvant d'extraction, l'ensemble est laissé sous agitation pendant 15minutes à l'abri de la lumière et d'air. Après, le mélange est filtré en utilisant des filtres wattman (N°4), l'extraction est refaite pour le retentât dans les même conditions, les deux filtrats sont additionnés et centrifugés à 16000g pendant 20minutes à 4° C.

Pour 500 $\mu$ L de filtrat, sont ajouté 2,5 ml du réactif 2.6 dichlorophenol – indophénol (DCPIP), l'absorbance est mesuré à 515nm.

La teneur en vitamine C de l'extrait, exprimée en mg /100g de miel, est déterminée en se référant a une courbe d'étalonnage obtenue dans les même conditions en utilisant l'acide L-ascorbique (**Annexe VII**).

#### IV-4 Détermination de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des extraits a été déterminée selon deux méthodes. La première est l'estimation du pouvoir réducteur qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux). La deuxième évalue le pouvoir anti-radicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation d'un radical le pourcentage de neutralisation d'un radical (DPPH<sup>·</sup>) par les extraits.

##### IV-4.1 pouvoir réducteur

###### IV-4.1.1 Réduction de chlorure ferrique

La réduction de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) des extraits est déterminée selon la méthode décrite par (Lim et al., 2006).

Pour 1 ml d'extrait sont ajoutés 1ml de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferrocyanure de potassium (1%). Après incubation à 50 °C pendant 30 mn dans un bain marié, 1,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés, et le mélange est centrifugé à 3000g.

Ensuite, 1,5 ml du surnageant sont additionnés de 1,5 ml d'eau distillé et 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1), l'absorbance est mesurée à 700 nm après 10mn. Des courbes d'étalonnage ont été établies pour les standards (l'acide gallique, l'acide ascorbique et la quercitrine) dans la même condition opératoire que les échantillons (Annexe VIII).

###### IV-4.1.2 Réduction du phosphomolybdate

L'activité antioxydants de l'extrait de étudié est évaluée par la méthode décrite par (Ramalakshmi et al., 2008).

Pour 200µl d'extrait sont ajoutées, 2ml de réactif de molybdate. La lecture d'absorbance de l'extrait est mesurée à 695nm, après une incubation à 90°C pendant un heure et demie.

L'évaluation du pourcentage de réduction du phosphomolybdate par rapport aux concentrations des standards (Acide gallique, quercitrine, et vitamine C) est réalisée dans les mêmes conditions (Annexe VIII).

## IV-4.2 Neutralisation des radicaux libres

### IV-4.2.1 Neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup>

Le pouvoir anti radicalaire, par la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup> de l'extrait est évalué selon la méthode décrite par **Brand-Williams et al., (1995)**, légèrement modifiée par (**Lim et al., 2006**).

Pour 500µl d'extrait, 2ml de DPPH (0,06mg/ml) sont ajoutées. Après une incubation de 30minutes à l'abri de la lumière, l'absorbance de l'extrait est mesuré à 515nm.

L'évaluation de l'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup> Par rapport aux concentrations des standards (Acide gallique, quercitrine, et vitamine C) est réalisée dans les mêmes conditions (**Annexe IX**).

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>

$$PI\% = \left[ 1 - \left( \frac{Abs_{Ech}}{Abs_T} \right) \right] \times 100$$

D'où :

**Abs<sub>Echa</sub>** : Absorbance de l'extrait, après 30 minutes, à 517nm.

**Abs<sub>T</sub>** : Absorbance de témoin, après 30 minutes, à 517nm.

### IV-4.2.2 Neutralisation du radicale ABTS<sup>•+</sup>

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> est évalué par la méthode de **Re et al., (1998)**, qui consiste à additionner 2ml de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> ( $A_{734nm}=0,700 \pm 0,020$ ) à 20µl de l'extrait. La lecture de l'absorbance est mesurée, à partir de la première minute pendant 6 minutes, à 734nm.

L'évaluation d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> par rapport aux concentrations des standards (Acide gallique et vitamine C) est réalisée dans les même conditions (**Annexe IX**).

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> :

$$PI\% = \left[ \frac{(Abs_{\text{Contrôle}} - Abs_{\text{Extrait}})}{Abs_{\text{Contrôle}}} \right] \times 100$$

D'où :

Abs<sub>Contrôle</sub> : Absorbance du témoin après 30 minutes à 734nm.

Abs<sub>Extrait</sub> : Absorbance de l'extrait après 30 minutes à 734nm.

#### IV-5 Détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits à été déterminée selon la méthode décrite par (Baydar et al., 2004).

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de miel étudiée, on procède à la technique des disques en papier vis-à-vis des trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*). Ces dernières sont à l'origine d'une collection du laboratoire de microbiologie appliqué de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia.

##### IV-5.1 Le principe

Les disques imprégnés des extraits à tester diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, ils s'entourent de zones d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture.

##### IV-5.2 Les étapes de la réalisation d'une activité bactérienne

###### IV-5.2.1 Préparation du standard de turbidité Mc Ferland

Un standard de Mc Ferland 0,5 doit être préparé et un contrôle de la qualité sera effectué avant de commencer le test de sensibilité, ce standard peut être conservé pendant 6mois .Il est utilisé pour ajuster la turbidité de l'inoculum pour le test de sensibilité.

Des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau physiologique stérile afin d'avoir de suspension microbienne ayant une turbidité voisine à celle de Mc Ferland  $0,5(10^6 \text{UFC /ml})$ .

#### **IV-5.2.2 Préparation des disques**

Des disques d'un diamètre de 5mm ont été préparés à partir du papier Wattman, après stérilisation ces dernières sont déposées de 10 $\mu$ l de l'extrait. Des disques témoin imprégné de l'éthanol 50% sont aussi préparés.

#### **IV-5.2.3 Ensemencement des géloses**

La gélose (Muller Hinton) est versé dans des boites de pétri stériles, une fois solidifiées on procède à l'ensemencement en surface par inondation de 1ml de l'inoculum et l'excès est récupérer à l'aide d'une micropipette. Les disques chargés sont imprégnés délicatement sur la gélose ensemencée probablement avec une suspension bactérienne des souches de références.

#### **IV-5.2.4 Incubation**

Après 30 minutes de pré diffusion des solutions à 4°C, les boites de pétri sont incubées à 37°C pendant 18 heures pour permettre la croissance des bactéries.

#### **IV-5.2.5 Lecture et interprétation des résultats**

Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) est mesuré en mm et noté.les mesures peuvent être prises avec une règle sur le fond de la boite sans enlever le couvercle (**Annexe X**).

#### **IV-5.3 Etude statistique**

Une étude statistique des résultats obtenus à été faite dans le but de mise en évidence des différences significatives entre les extraits à l'aide du logiciel STATISTICA (comparaison post Hoc, test LSD). Pour l'analyse de la variance a un seul critère de classification (ANOVA), dont le degré de signification des donnés est pris à la probabilité de  $P < 0,05$ .



*Résultats et  
discussion*



## V-Résultats et discussions

### V-1 Optimisation et conditions d'extraction des antioxydants

Dans le but d'étudier les composés bioactives, les industries alimentaires utilisent le plus souvent la méthode d'extraction par solvant à partir du matériel végétal **Barzana et al., (2002)**, destinée à séparer les antioxydants solubles par diffusion à travers une matrice solide (matériel végétal) vers une matrice liquide (solvant) (**Musa et al., 2011**).

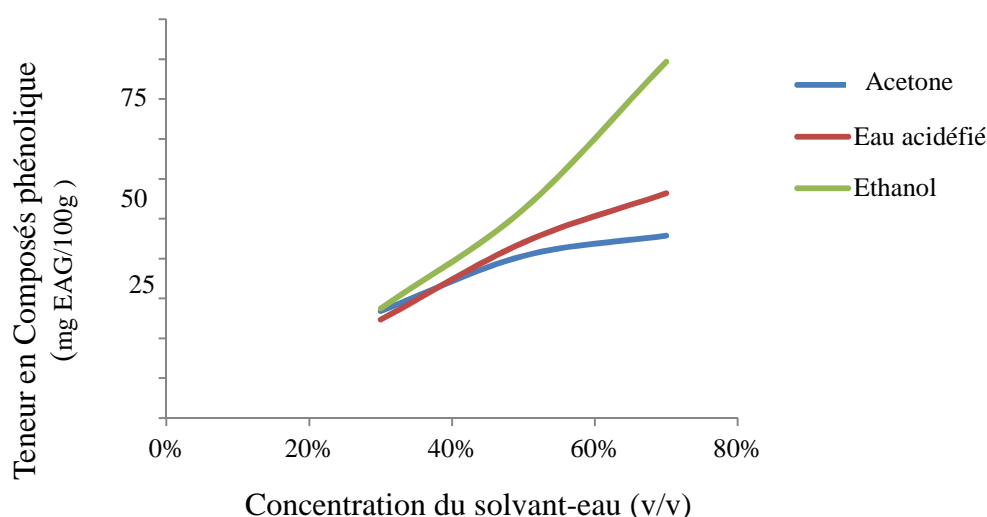
#### V-1.1 Essai préliminaires

##### V-1.1.1 Choix du solvant

Le choix de solvant est l'une des plus importantes étapes au cours d'une extraction. Le méthanol, l'éthanol ou l'éther de pétrole et leurs mélanges dans l'eau, aussi bien que l'acétone et éthyle d'acétate sont jusqu'ici les solvants les plus généralement utilisés dans l'extraction des composés phénoliques des matières végétales (**Escribano-Bailon et Santos-Buelga, 2003 ;Nacz et Shahidi, 2006 ;Hayouni et al.,2007** ).

L'addition de l'eau au solvant organique crée habituellement un milieu plus polaire qui facilite l'extraction des polyphénols comme suggéré par **Spigno et al., (2007)**. En augmentant la proportion de l'eau, la polarité du solvant augmente également, ce qui permet d'avoir des rendements élevés mais non sélectifs (**Leandro et al., 2012**).

Les résultats de l'optimisation du solvant sont représentés dans la figure N°10.



**Figure n°10** : Effet du solvant sur la teneur en polyphénols extraite

D'après les résultats de la présente étude, la teneur en polyphénol extraite varie de 21,34 à 73,65mg/100g de miel. Cette variation de la teneur extraite est due probablement à la différence de polarité existant entre les solvants utilisés (Nacz et Shahidi, 2006).

Les résultats obtenus montrent également que plus le pourcentage de l'eau diminue dans la fraction du solvant, plus le taux d'extraction est important, ce qui explique le choix des concentrations utilisées (30%, 50% et 70%) dans l'application du plan Box-Behnken.

### V-1.1.2 Choix de la puissance

La sélection de la puissance d'extraction est l'une des étapes des essais préliminaires. La puissance améliore l'efficacité de l'extraction, en rendant les membranes cellulaires plus perméables, et augmentent la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire. Elle diminue la viscosité du solvant ce qui facilite son passage dans les substrats solides.

Cependant, les puissances excessives peuvent causer la dégradation des composés phénoliques (Hoffmann *et al.*, 2003).

Yuefei Zhan *et al.*, (2014) ont démontré que l'extraction par micro-onde est très influencée par la puissance de micro-onde, et que une puissance au alentour de 300 à 900 watt.

### V-1.1.3 Choix du temps d'extraction

Le temps d'extraction est un autre paramètre principale dans la procédure d'extraction des composés phénoliques (Lapornik *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2005). Il correspond au temps pendant lequel le solvant et le matériel végétal sont mis en contact. Ce dernier peut influencer la libération progressive de solutés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et de cela influencer l'efficacité de l'extraction (Michiels *et al.*, 2012).

D'après Silva *et al.*, (2007), un temps d'extraction excessif n'est pas utile pour l'amélioration de la teneur en antioxydants extraite, ce qui favorise l'oxydation des composés phénoliques (Santos-Buelga *et al.*, 2012).

Yuefei *et al.*, (2014) ont montré qu'un temps d'extraction plus prolongé présente également un effet positif sur la concentration des iso-flavonoïdes extraites, par contre il entraîne une augmentation de la consommation d'énergie, qui affecte l'efficacité et la rentabilité du procédé. Ces derniers préconisent un temps d'extraction aux alentours de 60 à 240 secondes.

### V-1.2 Plan d'expérience Box- Behenken

L'extraction des polyphénols peut être influencée par plusieurs paramètres entre autres ; la méthode d'extraction utilisée, la nature et la concentration de solvant, la puissance et le temps d'extraction (**Spigno et al., 2007**).

Récemment, l'extraction assistée par micro-ondes est utilisée comme une méthode d'extraction à l'échelle du laboratoire car elle offre plusieurs avantages, telles que la consommation réduite d'énergie, de faibles quantités de solvants organiques moins toxiques ce qui réduit les quantités de déchets et permet d'obtenir de meilleur rendement par rapport aux méthodes classiques d'extraction (**Grigonis et al., 2005**).

L'efficacité de l'extraction est attribuée à plusieurs facteurs dont la nature et volume de solvant, le nombre d'extraction, la nature des composés à extraire et la température d'extraction (**Owen et Johns, 1999**).

**Yuefei Zhang et al., (2014)** ont démontré que l'extraction par micro-onde est très influence par le choix des paramètres d'extraction entre autres; le solvant, le temps, le ratio matière-solvant et la puissance de micro-onde.

Quatre facteurs ( $X_1, X_2, X_3, X_4$ ) à trois niveaux (-1, 0, +1) sont appliqués pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir des miels étudiés. Les facteurs choisis dans la présente étude sont :

- La Puissance d'extraction (300, 500, 700w) ;
- Le temps d'extraction (60, 90, 120 s) ;
- La concentration du solvant (v /v) (30, 50, 70%);
- Rapport miel / Solvant (1/5, 1/10, 1/15 %) ;

#### V-1.2.1 Analyse des résultats

Les résultats des expériences du plan Box-Behnken (BBD) obtenus sont représentés dans le Tableau III.

**Tableau III :** Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols par le plan d'expérience Box-Behnken du miel étudiée.

N° d'essai	Puissance (KW) X <sub>1</sub>	Temps (min) X <sub>2</sub>	Solvant (% v/v) X <sub>3</sub>	Rapport miel/solvant X <sub>4</sub>	Valeurs Réelles TPC (mgd'EAG/100g)	Valeurs Prédites TPC (mgd'EAG/100g)
1	(0) 500	(0) 90	(1) 70	(1) 0.067	81.47	78.89
2	(1) 700	(0) 90	(0) 50	(-1) 0.2	41.63	41.18
3	(0) 500	(0) 90	(0) 50	(0) 0.067	77	74.52
4	(0) 500	(-1) 60	(1) 70	(0) 0.1	38.97	36.40
5	(-1) 300	(1)120	(0) 50	(0) 0.1	44	42.69
6	(-1) 300	(0) 90	(1) 70	(0) 0.1	55.86	56.81
7	(0) 500	(-1) 60	(0) 50	(-1) 0.2	33.32	32.15
8	(0) 500	(1)120	(0) 50	(-1) 0.2	36.34	34.78
9	(0) 500	(0) 90	(0) 50	(0) 0.1	42.45	44.72
10	(-1) 300	(-1) 60	(0) 50	(0) 0.1	37.23	37.82
11	(1) 700	(1)120	(0) 50	(0) 0.1	41.51	40.29
12	(1) 700	(0) 90	(0) 50	(1) 0.067	80	76.58
13	(-1) 300	(0) 90	(-1) 30	(0) 0.1	29.48	28.14
14	(-1) 300	(0) 90	(0) 50	(-1) 0.2	46.56	47.34
15	(0) 500	(-1) 60	(-1) 30	(0) 0.1	22	19.87
16	(0) 500	(1)120	(1) 70	(0) 0.1	37.16	37.28
17	(0) 500	(0) 90	(-1) 30	(-1) 0.2	40	41.64
18	(0) 500	(1)120	(0) 50	(1) 0.067	56.66	69.05
19	(0) 500	(-1) 60	(0) 50	(1) 0.067	59	63.56
20	(0) 500	(0) 90	(-1) 30	(1) 0.067	57.96	58.16
21	(0) 500	(1)120	(-1) 30	(0) 0.1	28	28.55
22	(1) 700	(0) 90	(-1) 30	(0) 0.1	40.83	41.87
23	(-1) 300	(0) 90	(0) 50	(1) 0.067	77.324	77.62
24	(0) 500	(0) 90	(1) 70	(-1) 0.2	29	29.73
25	(1) 700	(1) 60	(0) 50	(0) 0.1	34.9	35.59
26	(1) 700	(0) 90	(1) 70	(0) 0.1	35.13	38.46
27	(0) 500	(0) 90	(0) 50	(0) 0.1	45.77	44.72

L'analyse des résultats de la présente étude, montre que le taux d'extraction des composés phénoliques varié de 22 à 81.47 mg d'E.A.G./100g de miel. Ceci confirme l'influence

des paramètres étudiés à savoir le temps, la puissance, la concentration du solvant, et le ratio miel/solvant, sur la teneur en composés phénoliques extraites.

En effet, cela a été démontré par plusieurs auteurs (Shi *et al.*, 2003 ; Chandrika et Fereidoon, 2004 ; Juntachote *et al.*, 2006 ; Ghafoor *et al.*, 2009 ; Kashif *et al.*, 2009).

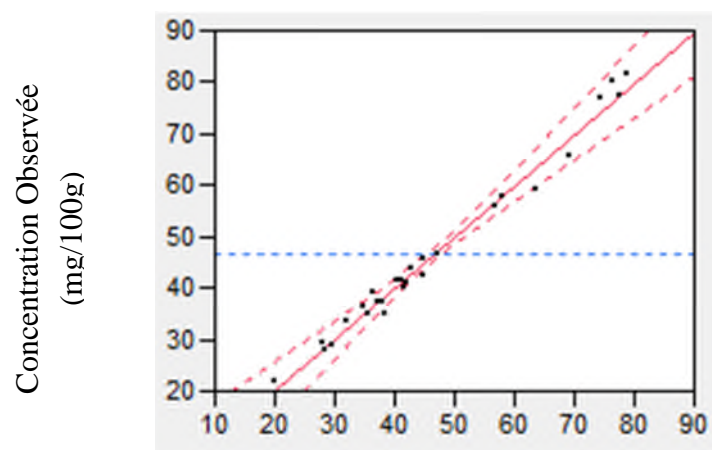
Plusieurs d'autres facteurs peuvent influencer l'extraction des polyphénols tel que le pH Chirinos *et al.*, (2007) et la granulométrie (Bucic-Kojic *et al.*, 2007).

### V-1.2.2 Validation du model

Dans les plans d'expériences le model mathématique relie la réponse aux facteurs qui l'influence, et afin d'avoir une bonne réponse plusieurs conditions doivent être vérifiées.

#### a) Coefficient de corrélation

L'efficacité d'ajustement globale est exprimée par le coefficient de corrélation  $R^2$  Chan *et al.*, (2009). Les résultats de l'analyse de la variance de la régression obtenus sont représentés dans la figure suivante :



Concentration (mg /100g) Prévüe

$$P < .0001 \quad R^2 = 0,99$$

$$R^2_{\text{ajusté}} = 0,97$$

**Figure n°11** : Plan de prédiction réelle de miel étudié.

Dans la présente étude, la valeur de coefficient de corrélation  $R^2$  est de l'ordre de 0.99, signifiant que uniquement 1% des variations ne sont pas expliquées par le model.

De plus, la valeur du coefficient de détermination ajusté ( $R^2_{\text{ajusté}}$ ) est d'environ de 0.97, qui est assez élevée pour confirmer la haute significativité du model, sachant que Ce terme représente la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) après élimination des termes (coefficients) inutiles du model.

Un model contenant beaucoup de termes inutiles (non significatifs) aura une valeur du  $R^2_{\text{ajusté}}$  très inférieure à celle du coefficient de corrélation ( $R^2$ ) (El-Adawi et al., 2011).

L'analyse de la variance de la régression montre que le model est très significatif dont la P-value est d'environ 0.0001, inférieur à  $<0.05$ , ce qui confirme que le modèle est satisfaisante (Chin et al., 2010).

#### b) Effet des facteurs (coefficients)

L'analyse de la variance de la régression des coefficients consiste à analyser l'impact des variables ( $X_1, X_2, X_3$  et  $X_4$ ) à  $p < 0.05$ , afin déterminer le degré d'influence des facteurs étudiés sur l'extraction des polyphénols du miel (Uma et al., 2010).

Les P-value sont utilisés comme un moyen pour vérifier la signification de chaque coefficient, ce qui indique aussi l'intensité d'interaction de chaque paramètre. Les plus faibles P-value présentent la plus grande signification du facteur correspondant Chan et al., (2009) ; Liu et al., (2010). Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau VI.

**Tableau IV** : Estimation des coefficients de régression du model polynomiale de seconde degré de miel.

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	P-value
Constante	-40.07603	33.4426	-1.20	0.2539
<b>Linéarité</b>				
$X_1$	0.0400637	0.045544	0.88	0.3963
$X_2$	1.9237008	0.328227	5.86	<.0001*
$X_3$	3.7221168	0.455444	8.17	<.0001*
$X_4$	-1610.913	153.6253	-10.49	<.0001*
<b>Interaction</b>				

$X_1 X_2$	$-6.667e^{-6}$	0.000242	-0.03	0.9785
$X_1 X_3$	-0.002005	0.000363	-5.52	0.0001*
$X_2 X_3$	-0.003254	0.002423	-1.34	0.2040
$X_1 X_4$	-0.096117	0.101075	-0.95	0.3604
<b>Quadratique</b>				
$X_1 X_1$	$6.4616e^{-5}$	$3.354e^{-5}$	1.93	0.0780
$X_2 X_2$	-0.009123	0.001491	-6.12	<.0001*
$X_3 X_3$	-0.014974	0.003354	-4.46	0.0008*
$X_4 X_4$	6558.3727	440.4529	14.89	<.0001*

#### ➤ Effet linéaire

Les résultats de la présente étude, montrent que trois facteurs ( $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ) possèdent une influence significative sur l'extraction des polyphénols du miel étudiés.

Les facteurs, temps ( $X_2$ ) et la concentration du solvant ( $X_3$ ) influencent significativement avec une probabilité de l'ordre de  $P = <.0001$  et des coefficients d'estimation positifs de l'ordre de 1.9237008 ; 3.722116, respectivement.

Le facteur, rapport miel/solvant ( $X_4$ ), influence lui aussi significativement avec une probabilité  $P = <.0001$  mais avec un coefficient d'estimation négatif de l'ordre de -1610.913.

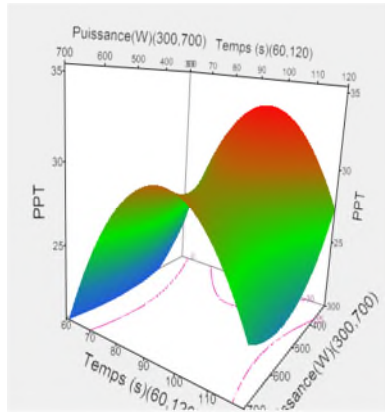
Cependant, l'impact est non significatif pour le facteur ( $X_1$ ) qui représente la puissance des ondes utilisées qui présente une probabilité de l'ordre de 0.39 supérieur à 0.05.

#### ➤ Effet Interaction

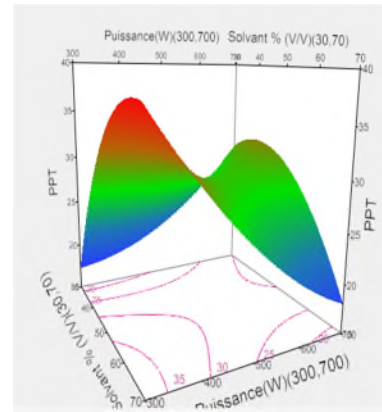
Les résultats obtenus indiquent que l'interaction (Puissance – Solvant) est significative sur l'extraction des polyphénols du miel étudiée, avec une probabilité  $P = 0.0001$  et un coefficient d'estimation négatif de l'ordre de (-0.002005).

La présente étude montre également que les interactions (Puissance – Temps), (Temps – Solvant) et (Puissance – Rapport miel/solvant), ne sont pas significatives avec des probabilités supérieurs à 0.05.

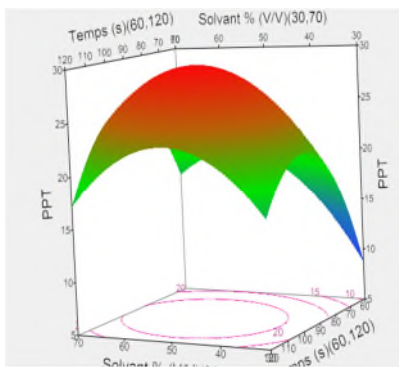
La signifiante de l'interaction  $X_1 X_3$  (Puissance – Solvant) confirme l'influence de ces deux paramètres sur l'extraction des polyphénols de miel, l'impact de ces deux facteurs a été démontré par plusieurs auteurs (Chan *et al.*, 2009; Uma *et al.*, 2010 ).



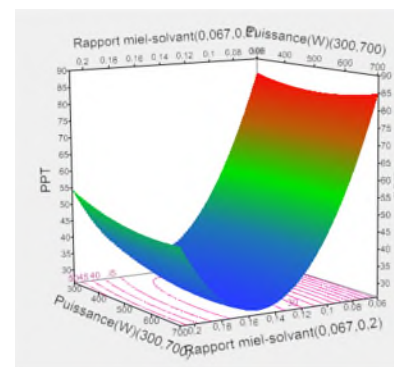
**Figure n° 12:** Surface de réponse pour  
L'interaction puissance – temps



**Figure n° 13:** Surface de réponse pour  
l'interaction puissance - solvant



**Figure n° 14:** Surface de réponse pour  
l'interaction temps - solvant



**Figure n° 15 :** Surface de réponse pour  
l'interaction puissance – rapport miel-solvant

### ➤ Effet quadratique

Les résultats obtenus, indiquent que seulement trois facteurs possédant un effet quadratique sur l'extraction des polyphénols du miel étudié, à savoir : le temps d'extraction, la concentration du solvant et le rapport miel/solvant.



Le facteur  $X_2^2$  (temps – temps) montre un effet significatif avec une probabilité d'environ de  $P = <.0001$ , et un coefficient négatif de l'ordre de  $-0.009123$ .

L'effet quadratique  $X_3^2$  (solvant – solvant) est significatif avec une probabilité  $P=0.0008$ , et un coefficient de l'ordre de  $(-0.014974)$ .

Le facteur  $X_4^2$  (rapport miel/solvant–rapport miel/solvant) montre également un effet significatif sur l'extraction étudiée avec une probabilité de l'ordre ( $<.0001$ ) et un coefficient ( $6558.3727$ ).

Contrairement aux autres facteurs étudiés, le facteur  $X_1^2$  (puissance – puissance) ne présente pas d'effet quadratique sur l'extraction des polyphénols du miel étudié ( $p >0.05$ ).

Ces résultats montrent que le temps, la concentration de solvant et le rapport miel/solvant jouent un rôle important dans l'extraction des polyphénols, ce qu'est déjà rapporté par plusieurs auteurs (**Yapet *al.*, 2009 ;Liyana – Pathiranaet *al.*, 2005**).

### V-1.2.3 Modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Les modèles les plus classiques sont les modèles polynomiaux (le plus souvent de degré inférieur ou égal à deux) (**Tinsson, 2010**).

Le modèle mathématique postulé utilisé avec le plan de Box- Behnken, à quatre facteurs, est un modèle de second degré classique, volontairement simplifié par élimination des effets d'interaction jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permet de manipuler plus facilement cette expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (**Tinsson, 2010**).

Le modèle mathématique opté, pour le miel, est représenté par l'équation :

$$Y = -40.07603 + 1.9237008 X_2 + 3.7221168 X_3 - 1610.913 X_4 - 0.002005 X_2 X_3 - 0.014974 X_3^2 + 6558.3727 X_4^2.$$

Avec ce modèle, le calcul de toutes les réponses dans le domaine d'étude sera possible. Il suffit d'attribuer des valeurs aux niveaux  $X_1$   $X_2$   $X_3$  et  $X_4$  pour obtenir immédiatement la teneur en polyphénols totaux.

### V-1.2.4 Solution

Cette étude montre qu'un modèle polynomial d'ordre deux peut modaliser correctement le phénomène étudié. Les conditions expérimentales optimales obtenues au sien du domaine expérimental conduisent à une optimisation d'extraction des polyphénols, par l'utilisation du logiciel JMP, sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau V** : Condition optimales d'extraction des polyphénols pour le miel.

Variables	Valeur critique
Puissance (W)	537.74
Temps (minute)	93.86
Rapport (eau/solvant, v/v) (%)	47.07
Rapport (solvant/matière)	0.15
Valeur prévue de la solution (mg d'E.A.G /100g de miel)	96.69

La présente étude confirme les avantages de cette méthode comparant à la méthode classique d'optimisation des conditions d'extraction des antioxydants.

Les résultats ont montrés que la teneur en polyphénols est beaucoup plus affectée par le temps d'extraction suivie respectivement parle rapport (miel- solvant) et la concentration du solvant. Tandis que la puissance des micro-ondes dans le seuil choisi n'est pas trop significative.

Pour avoir une teneur en composés phénoliques de l'ordre de 96.69544 mg/100g, il faut utiliser l'éthanol comme solvant à une concentration de 47.07 % (v/v), une puissance de 537.74 W, un rapport (solvant – Matière) est de 0.15 durant un temps de 93.86 secondes.

## VI Dosage des antioxydants

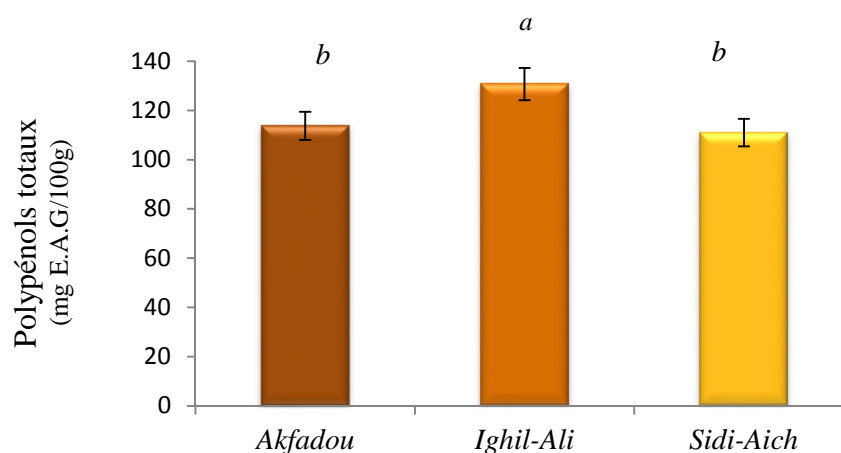
### VI-1 Polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits optimisés est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965).

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $MO_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite

est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Lapornik *et al.*, 2005).

Les résultats de dosage des polyphénols des miels étudiés, exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par 100g d'échantillon (mg E.A.G/100g) en référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions, sont représentées dans la figure n°16.



**Figure n°16 :** Teneur moyenne en polyphénols totaux des miels étudiés.

*Les barres verticales représentent les écart-types.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  écart-type.  
a > b : représentent les différences significatives ( $p < 0.0001$ )*

Les résultats de la présente étude, montrent que la teneur en composés phénoliques des miels étudiés varie de 111.02 à 130.74 mg d'E.A.G/100g d'échantillons. Le miel d'*Ighil-Ali* est considéré le plus riche, suivie respectivement par les miels de *Akfadou* et de *Sidi-Aich*.

L'étude statistique montre l'existence d'une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les teneurs en composés phénoliques de l'échantillon de miel d'*Ighil-Ali* avec les échantillons des autres miels étudiés, alors que les échantillons du miel *Akfadou* et de *Sidi-Aich* ne présentent aucune différence significative.

Selon **Ferreira *et al.*(2009)**, la teneur en polyphénols totaux de miel de l'ordre 72.77 mg/100g.

D'après les études de **Meda *et al.* (2005)**, en analysant des échantillons de miel de différentes sources florales, la quantité en composés phénoliques est comprise entre 110 à 320 mg E.A.G /100g de poids.

Les teneurs en composés phénoliques de la présente étude sont légèrement différentes de celles rapportées par la bibliographie, ceci peut être attribué non seulement à la différence de composition du miel mais aussi aux facteurs d'environnement de la ruche.

D'après l'étude réalisée par **Pyrzynska et biesagan, (2009)**, la composition phénolique du miel est fortement affectée par l'origine florale, le climat et la zone géographique.

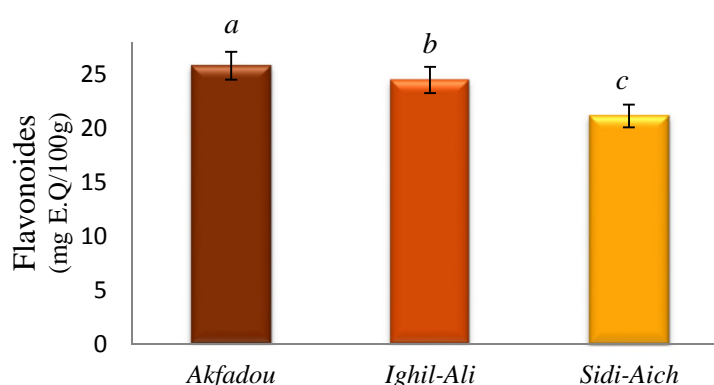
Les miels foncés présentent des teneurs élevées en composés phénoliques **Blasa et al., (2006)**. En effet, ceci a été constaté dans la présente étude. Le miel d'*Akfadou* qui est le plus sombre contient la plus forte concentration en composé phénolique ; le miel de *Sidi-Aich* ayant une couleur plus claire, renferme la quantité la plus faible.

L'évaluation du contenu phénolique total de miel peut être employé en tant que bons paramètres pour l'évaluation de leur qualité (**Al-Mamary et al., 2002**).

## VI-2 Flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits du miel optimisés est déterminée par une méthode colorimétrique basée sur la formation de complexe jaunâtre suite à la chélation de métaux  $Al^{3+}$ , utilisés sous forme de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), par les groupements hydroxyles des flavonoïdes. La coloration ainsi formée est proportionnelle aux taux des flavonoïdes dans le mélange (**RibereauGayon., 1968**).

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des miels étudiés, exprimées en mg d'équivalent de quercitrine (E.Q /100g) de l'échantillon en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions, sont représentées dans la figure n°17.



**Figure n°17** : Teneur moyenne en flavonoïdes des miels étudiés.

*Les barres verticales représentent les écart-types.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  écart-type.  
a>b>c : représentent les différences significatives ( $p < 0.0001$ ).*

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, les teneurs en flavonoïdes des différents échantillons étudiés varient de 21.14 à 25.81 mg d'EQ/100g de produit. Le miel d'*Akfadou* est considéré comme le plus riche suivie respectivement par l'échantillon du miel d'*IghilAli* et de *Sidi-Aich*.

L'étude statistique montre l'existence d'une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les teneurs en flavonoïdes des trois échantillons du miel étudiés.

D'après les études de **Socha et al. (2009)**, la quantité en flavonoïdes du miel oscille de 6.9 à 28.5 mg d'E.Q /100g de miel.

**Ferreira et al., (2009)**, ont rapporté des teneurs en flavonoïdes de miel de l'ordre de 12.36 mg E.Q /100g de miel.

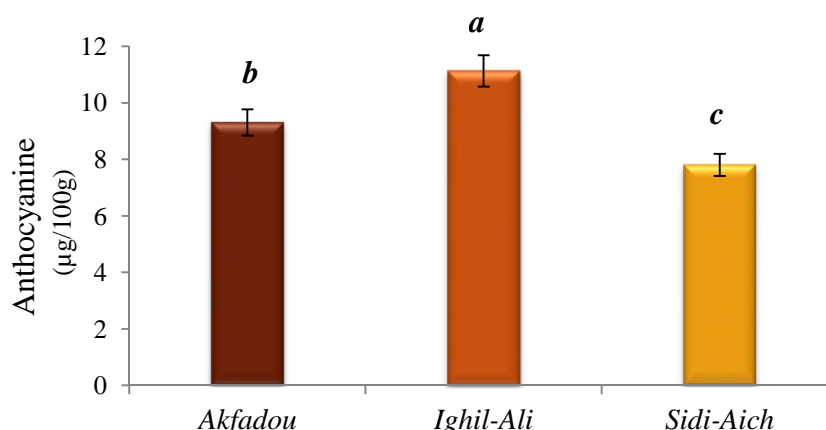
Les résultats de la présente étude sont légèrement supérieurs à celle de la bibliographie, dont la différence peut être due à plusieurs facteurs dont les méthodes d'extraction et d'analyse, l'origine géographique, les conditions de récolte et de stockage du miel (**Pyrzynska et Biesaga, 2009**).

La teneur en flavonoïdes retrouvée dans le miel, est très influencée par plusieurs facteurs tels que ; l'origine florale, la situation géographiques aussi bien que par le climat **Pyrzynska et Biesaga, 2009 ; Sladana et al., 2011 ; Lianda et al., 2012**. En générale, les miels les plus foncé contiennent un taux plus élevé en flavonoïdes (**Zalibera, 2008**).

### VI-3 Les anthocyanines

La fonction la plus importante des anthocyanes est leurs capacité à conférer de la couleur à plusieurs fruits et légumes et aux végétaux, dont sont responsables de la couleur orange, rose, rouge, violet et bleu **Košir et al., 2004; Sass-Kiss et al., 2005**. Ils peuvent agir en tant qu'antioxydants ou comme agents antibactériens (**Kong et al., 2003**).

Les teneurs en anthocyanines, des miels étudiés, obtenues exprimées en mg d'équivalent cyanidines-3-glucoside par 100g de l'échantillon, sont représentées dans la figure n°18.



**Figure n°18 :** Teneur moyenne en anthocyanine des miels étudiés.

*Les barres verticales représentent les écart-types.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  écart-type.  
 $a > b > c$  : représentent les différences significatives ( $p < 0.0001$ ).*

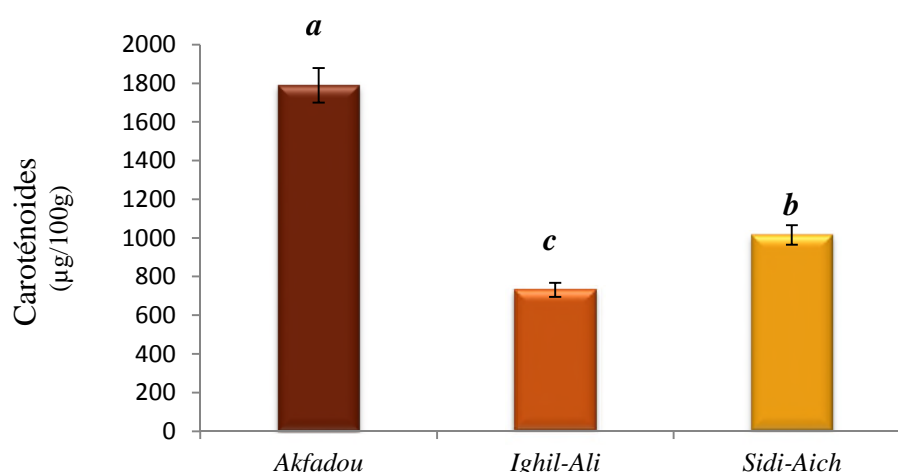
D'après les résultats de la présente étude, les teneurs en anthocyanines des différents miels étudiés varient de 7.8 à 11.13  $\mu\text{g}$  d'équivalent cyanidines-3-glucoside /100g du miel. Le miel d'*Ighil-Ali* (11.13  $\mu\text{g}$ ) est considéré comme le plus riche suivie respectivement par l'échantillon du miel d'*Akfadou* (9.3  $\mu\text{g}$ ). L'échantillon du miel de *Sidi-Aich* (7.3  $\mu\text{g}$ ) est considéré comme le plus pauvre en anthocyanines.

L'analyse statistique révèle l'existence d'une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les taux d'anthocyanines des trois échantillons du miel étudiés.

Les anthocyanines sont des composés très sensibles, et plusieurs facteurs (la température élevée, le pH, la lumière, la structure et la concentration des anthocyanines) peuvent les déstabiliser (**Laleh et al., 2006**).

#### **VI-4 Les caroténoïdes**

Les résultats du dosage des caroténoïdes obtenus, exprimé en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de  $\beta$ -carotène/100g de matière en se référant à une courbe d'étalonnages réalisée dans les mêmes conditions, sont représentées dans la figure n°19.



**Figure n°19 :** Teneur moyenne en caroténoïdes des miels étudiés.

*Les barres verticales représentent les écart-types.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  écart-type.  
 $a > b > c$  : représentent les différences significatives ( $p < 0.0001$ ).*

Les résultats de la présente étude, montre que la teneur en caroténoïde des extraits étudiés varie de 731.25 à 1789.06  $\mu\text{g d'E.}\beta\text{C}/100 \text{ g}$  de miel, dont le miel d'*Akfadou* est plus riche, suivie respectivement par les échantillons du miel de *Sidi-Aich* et d'*Ighil-Ali*.

L'étude statistique montre l'existence d'une différence hautement significative ( $p < 0.05$ ) entre les teneurs retrouvées en caroténoïdes des échantillons de trois miels étudiés.

**Aknouche et al., (2008)**, dans leur étude portée sur quatre échantillons du miel de quelque régions de la willaya de Bejaia (Adekar, Bejaia, Oued Ghir et El-Kseur), la teneur en caroténoïdes de ces derniers oscille de 0.3 à 1.2  $\mu\text{g d'E.}\beta\text{C}/100\text{g}$ .

D'après **Ferreira et al., (2009)**, la teneur en caroténoïde du miel est de l'ordre  $932 \pm 1 \mu\text{g}/100\text{g}$ .

Les résultats de la présente étude sont différents aux valeurs rapportées pour le miel, ceci peut être attribué à plusieurs facteurs tel que ; la composition du miel, à la méthode d'extraction et d'analyse.

Les teneurs en caroténoïdes rapportés par **Aires et al.,(2009)**, 93à et 950  $\mu\text{g}/100\text{g}$  du miel. Ces différences peuvent être attribuées à plusieurs facteurs dont les méthodes d'extraction et d'analyse, l'origine géographique (taux d'ensoleillement), la source florale, le caractère génétique, le degré de maturité et les conditions de stockage (**Alvarez-Suarezetal.,2010**).

De nombreux facteurs affectent la composition des caroténoïdes tels que les différences environnementales (Martinez, 2006 ; Dutta, 2005) ainsi que le caractère variétal et le degré de maturité (Martinez, 2006 ; Dutta, 2005).

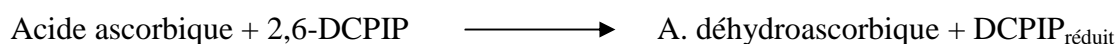
L'extraction lente des caroténoïdes ainsi que l'exposition à la lumière, à l'oxygène, aux températures élevées et aux métaux pro-oxydants, tels que le fer ou le cuivre, provoquent des pertes de caroténoïde pendant le procédé d'extraction (De Quiro, 2006).

La saponification provoque des pertes, particulières des caroténoïdes plus polaires tels que la lutéine, la violaxanthine et la neoxanthine (Niizu, 2004).

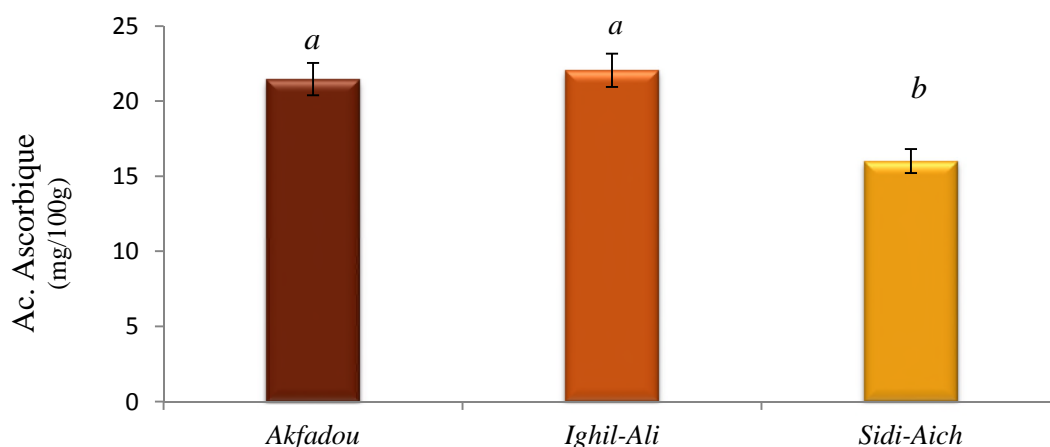
La présence de certains produits chimiques (tel que les pesticides et insecticides) pourrait empêcher la caroténogénèse. La congélation, l'entreposage, l'épluchage, le séchage et l'absence d'antioxydant endogène ou exogène provoquent généralement des pertes et la destruction considérable des caroténoïdes (Dutta, 2005).

#### VI-5 Acide ascorbique

Le DCPIP permet l'oxydation de la vitamine C en milieu acide, qui est coloré sous sa forme oxydée en bleu et devient rose après réduction de cette molécule (Ball, 1997). Selon la réaction suivante :



Les teneurs en acide ascorbique obtenues, exprimées en mg d'équivalent d'acide ascorbique (E.A.Asc /100 g) de miel en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions, sont représentées dans la figure n°20.



**Figure n°20 :** Teneur moyenne en acide ascorbique du miel étudié.

Les barres verticales représentent les écarts-types.  
Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  écart-type.  
 $a > b > c$  : représentent les différences significatives ( $p < 0.0001$ ).



Les résultats de la présente étude, montre que les teneurs en vitamine C du miel étudiés sont de l'ordre de 16 à 22.057 mg d'E.A Ascorbique /100g de miel. L'échantillon du miel de *Sidi-Aich* est considéré comme le plus pauvre en acide ascorbique.

L'étude statistique ( $p < 0.05$ ) montre que l'échantillon du miel de *Sidi-Aich* présente une différence significative vis-à-vis les échantillons du miel de *Ighil-Ali* et d'*Akfadou*, qui ne présente à eux aucune différence significative.

Selon **Ferreira et al. (2009)**, la teneur en vitamine C retrouvé dans le miel est d'environ de 14.001 mg/100g d'échantillon frais.

## VI-6 Evaluation des activités antioxydantes

L'activité antioxydante des différents échantillons de miels étudiés est évaluée selon deux principes. Le premier, regroupe les tests de la réduction de chlorure ferrique et du molybdate, qui mesurent la capacité antioxydante ou le pouvoir réducteur. Le deuxième, inclut les tests scavenger vis-à-vis le radicale **DPPH\*** et le radical cationique **ABTS<sup>+</sup>\***, qui mesurent le pouvoir anti-radicalaire des différentes substances présentes dans les extraits.

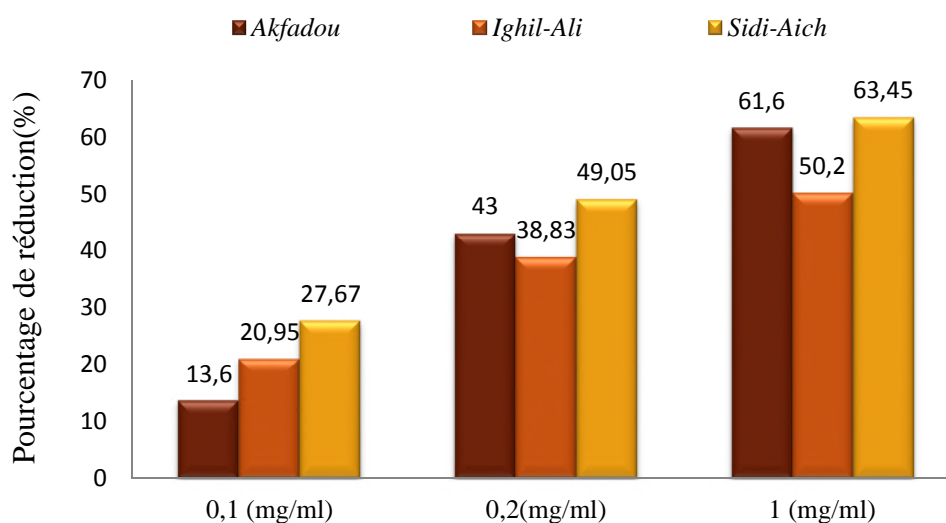
### VI-6.1 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure la capacité qu'à un antioxydant présent dans un extrait à donner un électron qui peut servir comme indicateur du potentiel de l'activité antioxydante. Le pouvoir réducteur peut être évalué par plusieurs tests à savoir la réduction de chlorure ferrique, le test de réduction de molybdate (**Sousa et al., 2008 ; Sahreen et al., 2010**).

#### VI-6.1.1 Réduction du chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ )

Ce test mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques [fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du ferrocyanure de potassium pour donner du fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Il représente l'aptitude d'une substance à transférer un électron ou à donner un atome d'hydrogène, ce qui lui permet d'agir sur le processus de peroxydation de lipides en tant qu'antioxydant primaire et secondaire (**Bea et Suh, 2006 ; Rajestet et al., 2007**).

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des échantillons des miels étudiés, sont représentés dans la figure n°21.



**Figure n°21 :** Pouvoir réducteur en  $FeCl_3$  des miels étudiés

D'après les résultats de la présente étude, le pouvoir réducteur des échantillons des miels étudiés varie de 13.6% à 27.67% pour une concentration de 0.1 mg/ml. Le miel de *Sidi-Aich* présent le meilleur pouvoir réducteur avec un taux de réduction d'environ de 27.67% équivalant à ceux de ; d'acide gallique (0.08mg/ml), de laquercétine (0.01mg/ml) et de d'acide ascorbique (0.048mg/ml) (**AnnexeVIII**).

Les résultats de la présente étude montrent également que le pouvoir réducteur des différents échantillons étudiés varie avec la variation de la concentration du miel.

Pour une concentration de 0.2mg/ml du miel, le pouvoir réducteur varie de 43 à 49.05%, dont le miel de *Sidi-Aich* présent le meilleur pouvoir réducteur avec un taux de réduction d'environ 49.05% suivie respectivement par les miels d'*Akfadou* et d'*IghilAli*.

La concentration de 1mg/ml du miel à donner un pouvoir réducteur qui oscille de 50.2 à 63.45%. Le miel de *Sidi-Aich* présent toujours le meilleur pouvoir réducteur.

L'étude statistique montre l'existence d'une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre le pouvoir réducteur des différents échantillons du miel étudié.

L'analyse statistique montre également, l'existence d'une bonne corrélation entre le pourcentage de réduction de  $FeCl_3$  avec les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, en anthocyanines, en caroténoïdes, en acide ascorbiques avec des coefficients de corrélations de l'ordre de  $r = 0.685$  ;  $r = 0.984$  ;  $r = 0.894$  ;  $r = 0.787$  ;  $r = 0.994$ , respectivement (**AnnexeXII**).

Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de composés donneurs d'électrons qui entraînent la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  (Sladana et al., 2011).

Le miel est connu pour être riche en sucres réducteurs, cela explique son fort pouvoir réducteur (Ferreira et al., 2009 ; Sladana et al., 2011).

Il est à noter que le miel ayant une quantité plus élevée en composés phénolique a montré le plus faible pouvoir réducteur. Ceci peut être expliqué par la nature de ces agents réducteurs (position et nombre des groupements hydroxyles). Pa ailleurs **küçüketal., (2007)**, rapporte que le pouvoir réducteur total est la somme des pouvoirs réducteurs des antioxydants présents dans l'échantillon.

### VI-6.1.2 Réduction du Phosphomolybdate

Le test au phosphomolybdate d'ammonium est employé pour déterminer la capacité antioxydante totale, qui est basée sur la réduction de l'ion  $\text{Mo}^{+6}$  en ion  $\text{Mo}^{+5}$  par les antioxydants contenus dans l'extrait. Par conséquent, il y a formation d'un complexe phosphate- $\text{Mo}^{+5}$  de couleur verdâtre, en milieu acide, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en antioxydants (Prietoetal., 1999 ; Sathish-Kumaret al., 2007).

Les résultats du pouvoir réducteur, exprimé en pourcentage de réduction du molybdate, sont représentés dans la figure n° 22.

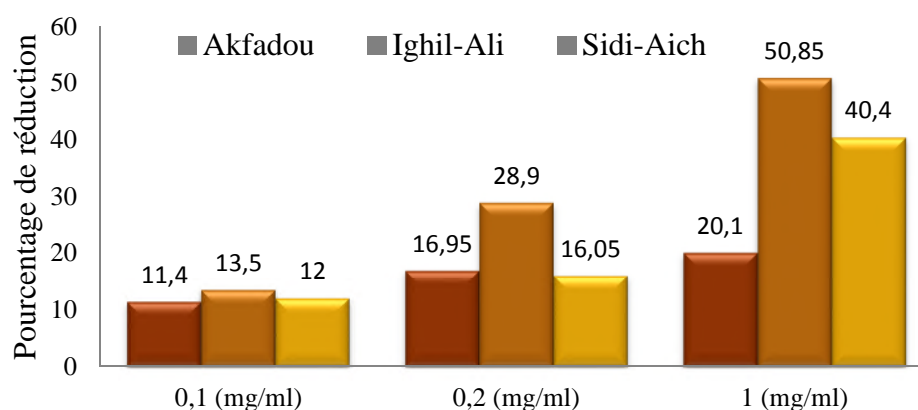


Figure n°22 : Pouvoir réducteur du phosphomolybdate du miel étudié.

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, le pouvoir réducteur varié entre 11.4 à 13.5%. Pour une concentration de 0.1mg/ml. Le miel d'*Ighil-Ali* présent le meilleur pouvoir réducteur avec un taux de réduction d'environ de 13.5% équivalant aux pouvoir réducteurs des standards à savoir l'acide gallique (0.08 mg/ml), de quercétine (0.005 mg/ml) et de l'acide ascorbique (0.025 mg/ml) (**Annexe VIII**).

Les résultats de la présente étude montrent également que le pouvoir réducteur du phosphomolybdate des différents échantillons étudiés augmente avec l'augmentation de la concentration du miel.

L'analyse statistique ( $P < 0.05$ ) souligne l'existence de différence significative entre les différents extraits du miel à la concentration de 1mg/ml, tandis que le pouvoir réducteur du phosphomolybdate extraits du miel aux concentrations de 0.1 et 0.2 mg/ml ne présentent aucune différence significative.

L'activité anti-oxydante des échantillons de miels à des différentes concentrations sont inférieurs à celle enregistrés par **Sagdic et al., (2010)**. Les différences des résultats peuvent être attribuées plusieurs facteurs dont ; la source florale, les facteurs saisonniers, la nature du solvant d'extraction (**Sangsrichan et Wanson, 2008 ; Giorgi et al., 2011; Lianda et al., 2012**).

Plusieurs études ont montré que l'activité antioxydante peut être affectée par de nombreux facteurs entre autres la structure des composés phénoliques et aux interactions synergiques avec divers antioxydants, et également par la méthode d'analyse utilisée, les conditions d'extractions et le caractère génétique (**Slusarczyk, 2009 ; Abrantes et al., 2007**)

Les études effectuées par **Jayaprakaska et al., (2008)** ont montré que le pouvoir réducteur dépend de la teneur en composés phénoliques des échantillons et de la position et du nombre de groupements hydroxylés.

L'étude statistique montre l'existence d'une corrélation linéaire entre le pourcentage de réduction du phosphomolybdate avec les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, en anthocyanines, et acide ascorbiques avec des coefficients de corrélations de l'ordre de  $r = 0.685$  ;  $r = 0.994$  ;  $r = 0.685$  ;  $r = 0.905$ , respectivement (**Annexe XIII**).

## VI-6.2 Pouvoir anti-radicalaire

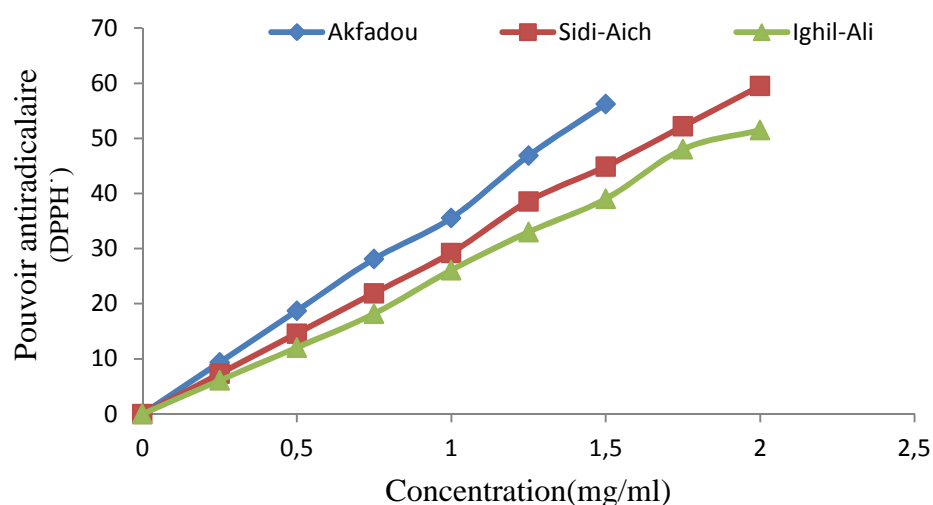
### VI-6.2.1 Pouvoir anti-radicalaire DPPH\*

Le DPPH\* (2,2-Di-Phényl-1-Picryl-Hydrazyl) est caractérisé par une couleur violette. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH\* est réduit en sa forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine). Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné

d'une diminution de l'absorbance qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction du DPPH\* **Lee et al.,(1986)**. Le suivi de la décoloration est réalisé par spectrophotométrie à 517 nm (**Gulcin et al., 2003 ; Roginsky et Lissi., 2005**).

Conventionnellement, une grande capacité de piégeage des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante (**Lee et al., 1986**).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH\*, par les extraits des échantillons des miels étudiés, est représenté dans la figure n°23.



**Figure n°23** : Pouvoir anti-radicalaire (DPPH\*) de miel.

Le meilleur pouvoir anti-radicalaire des échantillons du miel étudiés vis-à-vis le radical DPPH\* à une concentration 2 mg/ml est attribuée pour le miel *de Sidi-Aich*, suivie par le miel *d'Ighil-Ali*. Le miel *d'Akfadou* présent le pouvoir anti-radicalaire le plus faible.

Les études de **Socha et al., (2009)**, ont révélé un pourcentage d'inhibition de l'échantillon miel de l'ordre de 27.2%.

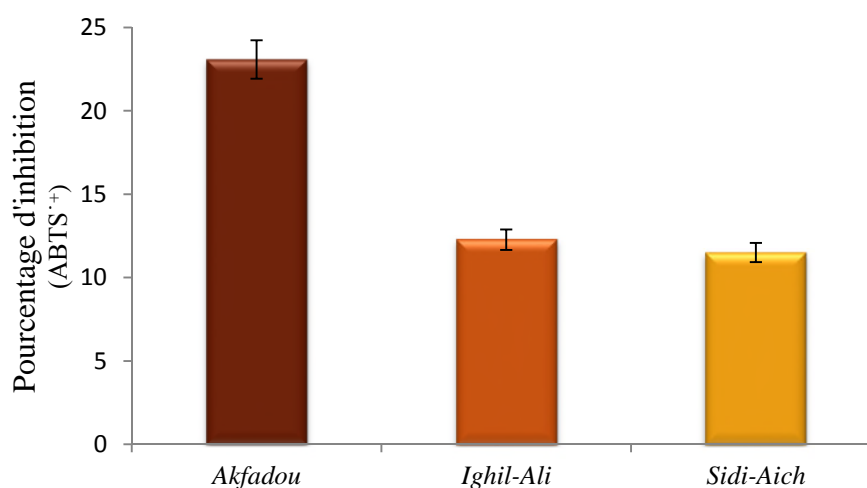
Les résultats obtenus dans notre étude ont montré l'existence d'une différence à la bibliographie donnée due non seulement au mode d'extraction mais à la composition de miel.

Les résultats indiquent l'existence de bonnes corrélation linéaires entre les teneurs en composés phénoliques en flavonoïdes, en caroténoïdes en anthocyanine et en acide ascorbiques de miel, et le pouvoir anti-radicalaire DPPH\* des extraits avec des coefficients de corrélation ( $r$ ) de l'ordre **0.736 ; 0.460 ; 0.985 ; 0.480 ; 0.763**, Respectivement (**Annexe XIV**).

### VI-6.2.2 Pouvoir anti-radicalaire ABTS<sup>•+</sup>

En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS<sup>•+</sup> [acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-sulphanique)] forme le radical ABTS<sup>•+</sup>, de couleur bleue à verte, l'ajout d'antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 734 nm, cette mesure est proportionnelle à la concentration en antioxydants. La méthode est généralement standardisée par rapport au Trolox (vitamine E sous forme hydrosoluble, dépourvu de chaîne carbonée) (Rolland, 2004 ; Samaniago-Sánchez *et al.*, 2007).

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup>, par les extraits de miel étudiés, est représenté dans la figure n° 24.



**Figure n°24 :** Pouvoir anti-radicalaire (ABTS<sup>•+</sup>) de miel.

D'après les résultats obtenus dans la présente étude, le pouvoir anti-radicalaire des échantillons de miel étudié vis-à-vis le radical d'ABTS<sup>•+</sup> varié de 11.51 à 23.08% à une concentration 0.1 mg/ml, dont le miel d'Akfadou présente le meilleur pouvoir anti-radicalaire avec un taux d'inhibition d'environ 23.08% équivalent à 0,881mg/ml d'acide gallique et 0.702 mg/ml d'acide ascorbique (Annexe IX)

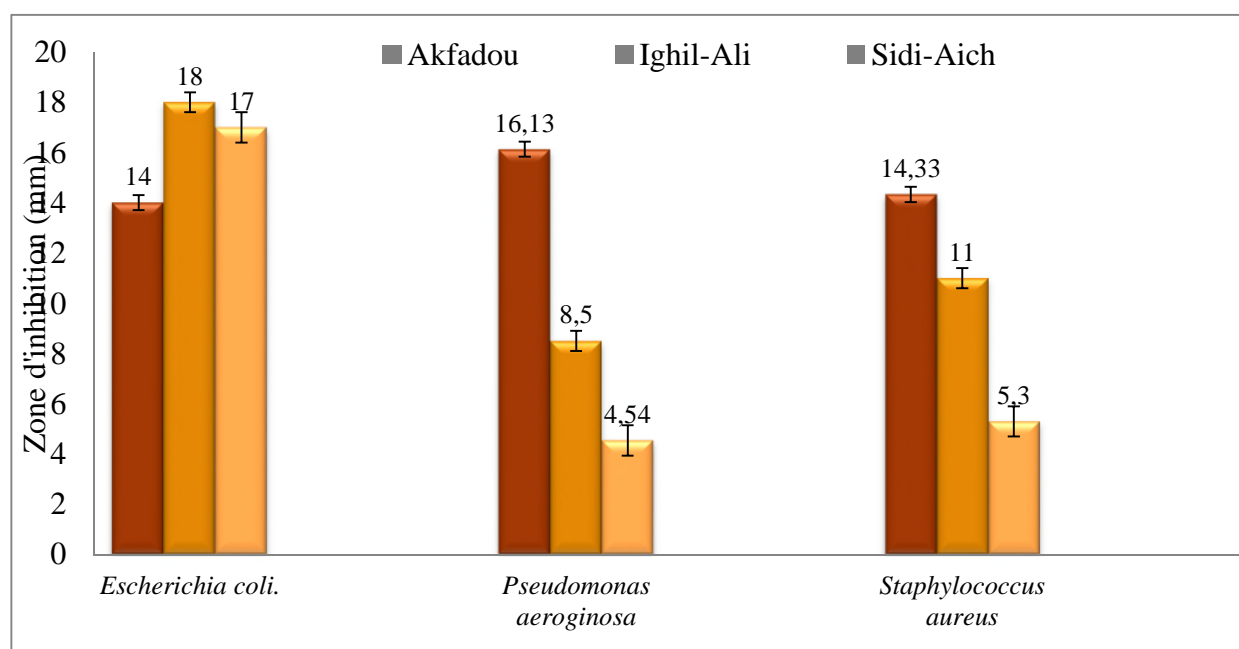
Le miel de Sidi-Aich est considéré comme le plus faible avec un taux d'inhibition de 11.51% équivalent à 0.454 mg/ml et 0.201 mg/ml d'acide ascorbique.

Les résultats obtenus montrent également l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes, en caroténoïdes en acide ascorbique de miel, et le pouvoir anti-radicalaire ABTS<sup>•+</sup> des extraits avec des coefficients de corrélation (r) de l'ordre **0.347 ; 0,556 ; 0.911 ; 0.149**, respectivement (Annexe XV).

Plusieurs études ont montré que l'activité anti-radicalaire est très influencée par le solvant d'extraction (Teow *et al.*, 2007 ; Floegel *et al.*, 2011).

### VI-7 Activité antibactérienne

Les tests d'activité antibactérienne ont permis de mettre en évidence la présence d'une activité sur les différentes souches testées.



**Figure N°25** : Diamètre de la zone d'inhibition vis-à-vis les trois souches bactériennes étudiés.

D'après les résultats de la présente étude, l'activité antibactérienne des extraits de trois miels vis-à-vis des trois souches varie de 4.5 à 18 mm de zone d'inhibition.

Les zones d'inhibition mesurées pour la souche *Escherichia coli* varient de 14 à 18 mm. L'effet inhibiteur le plus prononcé est obtenu avec l'extrait du miel d'*Ighil-Ali* avec un diamètre de 18 mm, suivie de l'extrait de miel du *Sidi-Aich*, miel d'*Akfadou* avec un diamètre de 17 et 14 mm, respectivement (**Annexe XI**).

Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* la valeur la plus élevée est obtenue par l'extrait de miel d'*Akfadou* avec un diamètre de 16,13 mm, suivie de l'extrait de miel d'*Ighil-Ali* et l'extrait de miel du *Sidi-Aich* avec des diamètres d'environ de 8,5, 4,54 mm, respectivement (**Annexe XI**).

Pour la souche *Staphylococcus aureus*, la valeur la plus élevée est obtenue par l'extrait de miel d'*Akfadou* avec un diamètre de 14.33 mm, suivie de l'extrait de miel d'*Ighil-Ali* et de miel de *Sidi-Aich* avec des diamètres d'environ de 11, 5.3 mm, respectivement (**Annexe XI**).

D'après **Jimoh et al., (2010)**, les bactéries à Gram(-) sont moins sensibles que les bactéries Gram(+) à cause de la composition chimique de la paroi des bactéries à gram(-) qui présente des structures spéciales : les LPS (lypopolysaccharides), ne permettent pas la pénétration des molécules.

Selon **Merah et al., (2010)**, l'action du miel naturel sur les bactéries dépend de la composition et la nature du miel qui sont influencés par plusieurs facteurs tels que la durée et les conditions de conservation.

D'après **Kerkliet, (1996)**, l'effet antimicrobien du miel peut être expliqué par son contenu important en enzymes, le glucose oxydase, qui active la transformation du glucose en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène.





*Conclusion*

## Conclusion

L'objectif de la présente étude est d'étudier la modalisation de l'extraction des antioxydants du miel, en utilisant le model Box-Behnken et le dosage des majeurs constituants des composés phénoliques, ainsi que la détermination de l'activité antioxydante et antibactériennes des extraits optimaux.

Les conditions expérimentales optimales permettant une optimisation de l'extraction des polyphénols des échantillons de miel étudié sont ;

L'éthanol à une concentration de 47.07% (v/v), à une puissance de 537.74 (W) pendant un temps d'extraction de 93.86 secondes et un rapport (solvant/matière) de 0.15% (v/v).

Le taux des composés phénoliques des extraits optimisés varie de 111.02 mg à 130.74 mg d'EAG/100g de produit qui sont supérieurs à l'intervalle de prévision du plan d'expérience Box-Behnken estimé entre 23.40 à 110.72 mg/100g et la plus grande teneur en polyphenols est retrouvé dans le miel d'*Ighil-Ali*.

La teneur en flavonoïdes des extraits optimaux varie de 21.14 mg à 25.81 mg d'E.Q./100g de produit, dont le miel d'*Akfadou* est considérée le plus riche en flavonoïdes.

Les teneurs en anthocyanine oscillent de 7.8 mg à 11.13 mg/100g d'équivalent de cyanidine 3 glucoside par 100g de produit, dont la plus grande teneur est attribuée pour le miel d'*Ighil-Ali*.

La teneur en caroténoïdes des extraits optimaux varie de 731.25 µg à 1789.06 µg d'E.β.C/100g de produit, dont le miel d'*Akfadou* est considérée le plus riche en caroténoïdes.

Concernant l'acide ascorbique, la teneur la plus élevée est marquée dans Le miel d'*Ighil-Ali* 22.057 mg d'E.A.Asc /100g de produit, et la plus faible est retrouvée dans le miel de *Sidi-Aich* 16 mg d'E.A.Asc /100g de produit.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits étudiés à des déférentes concentrations (0.1mg/ml, 0.2mg/ml et 1 mg/ml) ont révélée des pourcentages de réductions qui varient entre 13.6% à 63.45%, dont le miel de *Sidi-Aich* présent la meilleure réduction en FeCl<sub>3</sub>.

L'étude statistique montre l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pourcentage de réduction de FeCl<sub>3</sub> avec les teneurs en composés phénoliques, flavonoïde, anthocyanines, caroténoïdes et en acide ascorbique avec des coefficients de corrélation (r) de l'ordre de **0.685 ; 0.984 ; 0.894 ; 0.787 ; 0.994**, respectivement.

Les résultats du pouvoir réducteur du phosphomolybdate des extraits étudiés augmentent avec l'augmentation de la concentration du miel (0.1mg/ml, 0.2mg/ml et 1 mg/ml), ont révélée des pourcentages de réductions qui varient entre 11.4% à 50.85%, dont le miel d'*Ighi-Ali* présent la meilleure réduction en phosphomolybdate.

L'étude statistique montre l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pourcentage de réduction de phosphomolybdate avec les teneurs en composés phénoliques, flavonoïde, anthocyanines et en acide ascorbique avec des coefficients de corrélation (r) de l'ordre de **0.685 ; 0.994 ; 0.685 ; 0.905**, respectivement.

Le pouvoir anti radicalaire *vis-à-vis* le radical DPPH• des extraits étudiés à la Concentration de 2 mg/ml est attribuée pour le miel de Sidi-Aich à une valeur de 59.51%.

Le pouvoir anti-radicalaire *vis-à-vis* le radical cationique ABTS<sup>+</sup> varié de 11.51 à 23.08%, dont le miel d'Akfadou présent le meilleur pouvoir anti-radicalaire avec un taux d'inhibition d'environ 23.08%.

Les résultats indiquent l'existence de bonnes corrélations linéaires entre le pouvoir anti-radicalaire DPPH• des extraits et les teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes, anthocyanine et en acide ascorbique avec des coefficients de corrélation (r) de l'ordre **0.736 ; 0.460 ; 0.985 ; 0.480** et **0.763**, respectivement.

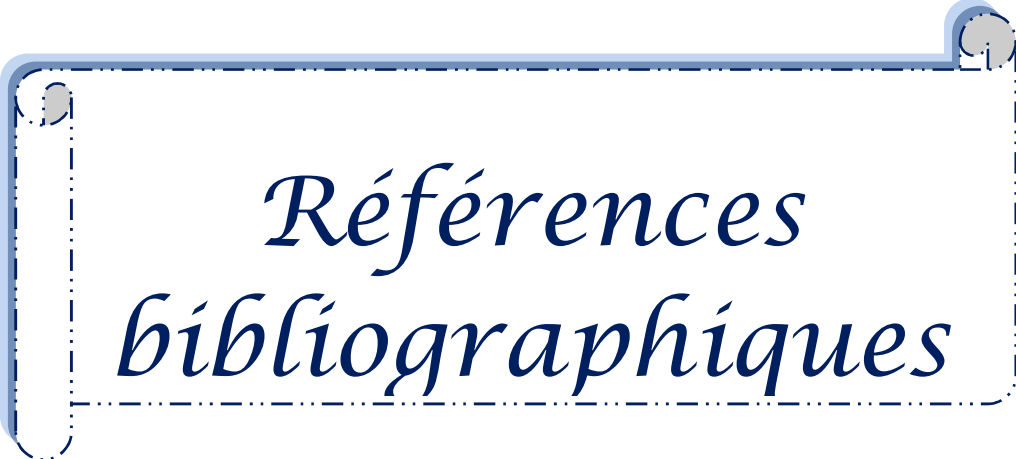
L'étude statistique montre l'existence d'une bonne corrélation linéaire entre le pouvoir Anti-radicalaire ABTS<sup>+</sup> des extraits et les teneurs en, composés phénoliques, flavonoïdes, Caroténoïdes et en acide ascorbique de miel, avec des coefficients de corrélation (r) de l'ordre **0.347 ; 0.556 ; 0.911** et **0.149**, respectivement.

L'activité antibactérienne de l'échantillon de miel d'Ighil-Ali est la plus importante vis-à-vis de la souche *Echerichia coli* utilisée suivie par les échantillons de miel de Sidi-Aich et d'Akfadou, respectivement.

L'activité antibactérienne de l'échantillon de miel d'Akfadou est la plus importante par rapport aux autres échantillons de miel d'Ighil-Ali et de Sidi-Aich sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* utilisée et *Staphylococcus aureus*.

En termes de perspective et dans le but de compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'optimiser d'autres paramètres influençant l'extraction des polyphénols tels que le ratio solide/liquide et la granulométrie ;
- D'élargir l'application du model de Box- Behenken sur d'autres produits, et de favoriser son utilisation au niveau industriel ;
- D'approfondir l'étude de l'activité antibactériennes sur d'autre espèces pathogène ;
- D'étudiés d'autres propriétés biologiques des l'extraits optimaux (antiviral, anti-inflammatoire, anti-cancérigène).



*Références  
bibliographiques*

## A

**Aires E., Barreira J. et Estevinho L.M.** (2009). Antioxydant activity of portuguese honey samples : Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114: 1438-1443.

**Al-Farsi M., Alasalvar C., Morris A., Baron M. et Shahidi F.** (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sundried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7592-7599.

**Al-Khalifa A.S. et Al-Arify I.A.** (1999). Physicochemical characterisation and pollen spectrum of some Saudi honey. *Food Chemistry*. 67(1): 21-25.

**Al-Mamary M., Al-Meeri A. et Al-Habori M.** (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22:1041-1047.

**Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M.,** (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3: 15–23.

## B

**Ball G.F.** (1997). Vitamin C. In bioavailability and analyse of vitamins in foods. *Ed. Jones Barleh*. 515-563.

**Baroni M.V., Arrua C., Nores M.L., Fayé P., Del Pilar Diaz M., Chiabrando G.L. et Sanz M.L., Gonzalez M., De Lorezo C., Sanz J. et Martinez-Castro I.** (2008). A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*. 91 : 313-317.

**Barzana E., Rubio D., Santamaria R.I., Garcia-Correa O., Garcia F. et Ridaura-Sanz V.E.** (2002). Enzyme mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4491–4496.

**Basualdo C., Singh V., Finola M.S. et Marioli J.M.** (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. 124:375-381.

**Baydar N.G., Ozkan G. etSagdic O.** (2004).Total contents and antibacterial activites of grape (vitisviniferal) extracts. *Food Control*.15:335-339.

**Bea S.H. etSuh H.J.** (2007).Antioxidant activities of five different mulberry cultivarsin Kore a. *Food science and technologie*.1:456-749.

**Berset C.** (1999).Antioxydants phénoliques- Structure, propriétés, sources végétales in les polyphénols en agroalimentaire. Science et techniques Agroalimentaire. pp.269-289.

**BiriM.** (2003).Le grand livre des abeilles. Edition : De Vecchi S A. Paris, pp. 75-190.

**Blanc M.** (2010).Propriétés et usage medical des produits de la ruche. Limoge.8p.

**Blasa M., Cndiracci M., Accorsi A et Piacentini M.P.** (2006).Raw millefiori honey is packed full of antioxidant.*Food chemistry*.97:217-222.

**Bogdanov S., Kanzig A., Frey T and Iff D.,** (2004).Mannuel des denrées alimentaires. Ed : MSDA: 1-39.

**Brand-Williams W., Cuvelier M.E. etBerset C.** (1995).Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmittelWissenschaften and Technologie*. 28: 25-30.

**Brunetone J.**(1999).Pharmacognosie etphytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition technique et documentation, Lavoisier. pp. 233-447.

**Bucic-Kojic A., Planinic M., Tomas S., Bilic M. etVelic D.** (2007). Study of solid-liquid extraction Kinetics of total polyphénols from grape seeds. *Journal of food Engineering*. 81: 236-242.

## C

**Chaabouni M.M., Ayedi H.F. et Kamoun A.** (2011). Plans d'expériences et traitements de surface. Etude quantitative des effets et interactions. Techniques de l'ingénieur.

**Chagnon P.** (2005). Les plans d'expériences (partie 2), Les modèles de régression. Article réalisé par un membre de la commission de normalisation AFNOR X06E «Méthodes statistiques». *Avis d'experts statistiques*. 99.

- Chan S.W., Lee C.Y., Yap C. F., Wan Aida W.M. et Ho C.W.** (2009).Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from lima purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*. 16: 203-213.
- Chandrika L.P et Fereidoon S.** (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*.93:47-56.
- Chang Y.C., Lee C.L. et Pan T.M.** (2006).Statistical optimization of media components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC623 in submerged cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*.72:654-661.
- Chin Y.F., Jumat S. et Mamot S.** (2010).Optimisation of Urea Complexation by Box - Behnken Design. *Sains Malaysiana*. 39: 795-803.
- Chira, K. Suh, Saucier, J. H. & Teissedre, P. L.** (2008).Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*.6: 75 – 82.
- Codex Alimentarius.** (2001).Revised codex standard for honey. Codex standard 12-1981.
- Cotelle N.**(2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 1:569-590.
- Couplan F.** (1998).Guide nutritionnel des plantes sauvage et cultivées. Edition : Delachaux et Nestlé. Paris, France.pp, 14-104.
- Cushnie T. P. T. et Lamb A. J.,** (2005).Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 : 343-356.

## D

- Derkyi S.A., Adu-Amankwa B., Sekyere D. et Darkwa A.** (2011).Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology for the Extraction of Formaldehyde-Condensable Phenolics from Pine Bark. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*. 2: 64-69.
- De Quiros AR-B, Costa HS.** (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*.19: 97–111.



**Dias M.G., Camões M.F.G.F.C. et Oliveira L.** (2009). Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 113: 808-815.

**Dinkov, R., Hristov, G., Stratiev, D., Aldayri, V.B.,** (2009). Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability. *Fuel* 88 : 732–737.

**Direction de l'agriculture de Wilaya de Béjaia.**(2011).

**Ducros V. et Favier A.** (2004). Métabolisme de Selenium. *EMC-endocrinologie*. 1: 19-28.

## **E**

**El-Adawi H., Abdel-Fattah Y. et Abd El-Wahab A.** (2011). Application of numerical modeling for optimization of selective hot water extraction of taxifolin from milk thistle seeds. *African journal of biotechnology*. 48:9804-9811.

**El-Agamey A., Low G.M., Mc Garvey D.J., Mortensen A., Phillip D.M., Truscott T.G. et Young A.J.** (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 114 : 127-1277.

## **F**

**Falico B., Zappala M., Arena E. et Verzera A.** (2004). Effects of conditioning on HMF content in unifloral honey. *Food Chemistry*. 85:305- 313.

**F.A.O.**(2011).(Food and Agriculture Organisation). Database results; FAO-STAT.

**Faucher J.** (2006). Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de Doctorat, *Institut national polytechnique de Toulouse*. 198p.

**Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J. CM and Estevinho.** (2009). Antioxidant activity of portuguese honey samples: Different contribution of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*.

**Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. et Leverve X.** (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. 11 : 411-20.

**Fuhrman B., Lavy A., Aviram M.** (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. Journal. Clinic Nutriment.* 61 :549-554.

## G

**Gee J.M., Johnson I.T.** (2001). Polyphenolic compounds : interactions with the gut and complications for human health. *Current Medicinal chemistry.* 8 : 1-182.

**Gidamis A.B., Cove N.B., Shayo N.B., Nnko S.A. et Bangu N.T.** (2004). Quality evaluation of honey harvested areas in tanzania with special emphasis on hydroxymethyl furfural (HMF) levels. *Plant Food for Human Nutrition.* 59: 129-132.

**Giorgi A., Madeo M., Baumgartner J. et Lozzia G.C.,** (2011). The Relationships between phenolic content, Pollen Diversity, Physicochemical information and radical scavenging Activity in honey. *Molecules.* 16: 336-347.

**Ghafoor K. et Choi Y. H.** (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 52 : 295-300.

**Gonnet M.,** (1982). Le miel : composition, propriétés et conservation. Ed OPIDA : 1-30.

**Goupy J.** (2006). Introduction aux plans d'expérience. 3<sup>ème</sup> édition –Dunod. Paris. 324p.

**Goupy J.** (2009). Plans d'expériences, Manuel d'utilisation du logiciel JMP (Version 9). 24, avenue Perrichont. 75016. Paris.

**Goupy J. et Creighton L.** (2006). Introduction au plan d'expérience. Dunod. Paris. 336.

**Gulcin I., Oktay M., Kirecci E. et Kufrevioglu OI.** (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*pimpinella anisum L*) seed extracts. *Food chemistry.* 83:371-382.

**Gulcin I., Oktay M., Kirecci E. et Freviog Lu OI.** (2004). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*pimpinellaanisum L*) seed extracts. *Food chemistry*. 83:371-382.

## *H*

**Halliwell B.** (1994). Free radicals and antioxidants. *Nutrition Review*. 52:253-265.

**Harborne J.B., Williams C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since (1992). *Phytochemistry*. 55 : 481-504.

**Heinonen I.M., Meyer A.S. et Frankel E.N.** (1998). Antioxidant activity of berry phenolics on human low density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4107-4112.

## *I*

**Ikigai H., Nakae T., Hara Y. et Shimamura T.,** (1995). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochemistry Biophys Acta*. 132-136.

## *J*

**Jayaprakasha, G. K., Girenavar, B. & Patil, B. S.** (2008). Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*. 41: 376–384.

**Jean-Prost P. et Medori P.** (2005). Miel. In « Apiculture ». Ed. Tec et doc : 180-424-199.

**J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka, P. Wasserscheid,** Ionic liquids and their heating behaviour during microwave irradiation – a state of the art report and challenge to assessment, *Green Chem*. 5 (2003) 296.

**Jimoh F., Adedapo A., Aliero A. et Afolayan A.** (2010). Polyphenolic and biological activities of leaves extracts of *argemonesubfusiformis* (Papaveraceae) and *UrticaUrens* (Urticaceae). *Revista de Biologia Tropical*. 58 :1517-15331.

**Juntachote T., Berghofer E., Bauer F. et Siebenhandl S.** (2006). The application of

response surface methodology of the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International journal of food Science and Technology*.41:121-133.

## K

**Kashif G. et Yang H.C.** (2009). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*.52:295-300.

**Karou D., Dicko M.H., Simpore J. et Traore A.S.**,(2005).Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of Biotechnology*.4: 823-828.

**Kerkvliet J.D.** (1996). Screening method for the determination of peroxide accumulation in honey and relation with HMF content. *Journal of Apiculture Res.*35 :110-117.

**Klein B.P. et Perry A.K.** (1982). Ascorbic Acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of United States. *Journal of Food Science*. 47:941-948.

**Kohen R., Nyska A.**(2002). Oxidation of biological systems:Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*.30 :620-650.

**Košir I.J., Lapornik B., Andrenšek S., GolcWondra A., Vrhovšek. et Kidri J.** (2004). Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta*. 513:277-282.

**Krinsky N.I.** (1989).Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology. Med*7. (6). P: 617-35.

**Ksouri R., Falleh H. et Abdely C.** (2006). Contenu en polyphénols et activité antioxydantes d'une halophyte, *Tamarix gallica* L. Actes du séminaire international « les plantes à parfums, Aromatique et Médicinales ». pp.307-310.

**Kûçûk M, Kolaylı S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F.** (2005). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*.91, 3, 2005, p.571-577; 22.

**Küçük, M., Kolaylı, S., Şengül K., Ulusoy, E., Baltacı, C. & Candan, F.** (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100: 526–534.

## Ł

**Lako J., Trenerry V.C., Wahlqvist M., Wattanapenpaiboon N., Sotheeswaran S. et Premier R.** (2007). Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and readily available. *Food Chemistry*. 101:1727-1741.

**Laleh G.H., Frydoonfar H., Heidary R., Jamei R. et Zare S.** (2006). The Effect of light, temperature, pH and species on stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberis Species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 90-92.

**Lapornik B., Prošek M., Wondra A.G.** (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*. 71: 214-222.

**Lee J. H., Koo N.S. et Min D.J.** (1986). Antioxidant protection of phospholipid bilayers by tocopherol. *Journal of Biological Chemistry*. 261(5):12-14.

**Lee B. K., Jung J.E. et Choi Y.H.** (2005). Optimization of microwave-assisted extraction process of *Rehmannia Radix preparata* by response surface methodology. *Food Engineering Progress*. 9: 283-290.

**Lee J., Koo N. et Min D.B.** (2004). Reactive Oxygen Species, aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3: 21-33.

**Lequet L.** (2010). Du Nectar à un miel de qualité : Contrôle analytique du miel et conseils pratiques à l'intention de l'apiculture amateur. *Ecole Nationale Vétérinaire*. Lyon. 195p.

**Lianda R.L.P., Sant'Ana L.D., Echevarria A. et Castro R.N.,** (2012). Antioxidant Activity and phenolic composition of Brazilian Honeys and their Extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 1: 1-10.

**Lim Y.Y., Lim T.T. et Tee J.J.** (2006). Antioxydant properties of several tropical fruits: Comparative study. *Food Chemistry*. 103: 1003-1008.

**Liu Q.M., Yang X.M., Zhang L. et Majeti G.** (2010). Optimization of ultrasonic assisted extraction of chlorogenic acid from *Folium eucommiae* and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*. 23 : 2503-2511.

**Liyana-Pathirana C. et Shahidi F.** (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food chemistry*. 93 : 47-56.

**Lobreau- Callen D., Marmion V. et Clément M-C.** (1999). Les miels. In « techniques de l'ingénieur » : 1-20.

**Lojkoška E et Holubovská M.** (1992). The role of polyphenol oxidase and peroxidase. In: Potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Journal of phytopathology*. 136:319-328.

**Louveaux J.** (1985). Les produits du rucher. In « les abeilles et leur élevage ». Ed. OPIDA : 165.

## M

**Mafak A.** (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de pesticides. Thèse de Doctorat : Université de Limoges.

**Meda A.** (2005). Utilisation thérapeutiques des produits de la ruche, étude phytochimique et activités biologiques des miels du Burkina Faso. Thèse de doctorat en science biologiques appliquées : 10-12.

**Melendez-Martinez AJ, Vicario M, Heredia FJ.** (2007). Provitamin A carotenoids and ascorbic acid contents of the different types of orange juices marketed in Spain. *Food Chemistry*. 101: 177-184.

**Mendes E., Brojoproenc E., Ferreira I.M.P.L.V.O. et Ferreira M.A.** (1998). Qualité évaluation of portuguese honey. *Carbohydrate polymers*. 37 : 219-223.

**Merah M., Bensaci Bachagha M. et Boudershem A.** (2010). Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons du miel naturel récolté des terroirs algériens. *Annales des sciences et technologie*. 2 :115-125.

**Mossel B., Bhandari B., D'Arcy B. et Caffin N.** (2003). Determination of viscosity of some Australian Honey Based on Composition. *International Journal of Food properties*. 6(1): 87-97.

**Musa K.H., Abdullah A., Jusoh K. et Subramaniam V.** (2011). Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods*. 4: 100-107.

**Myers R.H., Montgomery D.C.** (1995). Réponse surface methodology, Process and Product optimization using designed experiments. 2eme édition- Wiley. New York.

## N

**Nacz M, Shahidi F.,** (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 41: 1523–1542.

**Nathalie, L., Isabelle, D., Alain, D., & Julien, B.,** (2012). Microfibrillated cellulose-Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*. 90: 735–764.

**Niizu PY, Rodriguez-Amaya DB.** (2005). New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18:739–749

## O

**Ordoñez A. A. L., Gomez J.D., Vattuone M.A. et Isla M.I.** (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry*. 97 :452-458.

## P

**Pham-Delegue M. H.** (1999). Les abeilles. Genève, Minerva. pp.206.

**Pierre J. S.** (2009). Les plans d'expérience initiation à leur analyse et à leur construction.

**Pincemail, J., Defraigne, J.O., Meurisse, M. & Limet, R.** (1998). Anti-oxydants et prévention des maladies cardiovasculaires - 3ème partie: caroténoïdes et vitamine A. *Medisphere bilan*.

**Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. et Nunez M.J.** (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 53: 2111–2117.

**Prieto P., Pineda M. et Aguilar M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex, Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269:337-341.

**Pyrrznska K. et Biesaga M.** (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 1-20.

## R

**Rajesh M., Nagarajan A., Perumal S. et Sellamuthu.** (2007). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*. 107:1000-1007.

**Ramalakshmi K., Rahath Kubra L. et Jagan-Mohan-Rao L.** (2008). Antioxidant potential of low-grade coffee beans. *Food Research International*. 41: 96-103.

**Ramos A., Visozo A., Piloto J., Garcia C., Rodriguez A. et Rivero R.** (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 241–246.



**Rao A.V., Flesher N. et Agarwal S.**(1999). Serum and tissue lycopene as biomarker of oxidation in prostate cancer patients: a case control study. *Nutrition and Cancer Journal*. 33:159-164.

**Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. et Rice-Evans C.** (1998). Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.

**Ribereau-Gayon P.** (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition : *Dunod*, Paris. 1-201.

**Rodriguez-Amaya B.D.** (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. *International Life Sciences Institute Press*. 1-71.

**Rodriguez-Amaya B.D.**(2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids (review). *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:726-740.

**Rodriguez Vaquero M.R. et Manca de Nadra M.C.**(2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 18: 93-101.

**Roginsky V. et Lessi L.A.** (2005). Review of method to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 96: 235-254.

**Rolland Y.**(2004). Antioxydants naturels végétaux. *OCL*. 11:419-424.

## S

**Sagdic, O., Karahan, A. G., Ozcan, M., & Ozkan, G.** (2003). Effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *Food Science and Technology International*. 9:353–356.

**Sahreen S., Khan M.R. et Khan R.A.** (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits. *Food Chemistry*. sous presse .

**Samaniago-Sánchez C., Troncoso-González A.M., Garcia-Parrilla M.C., Quesada-Grandos J.J., López Garcia de la Serrana H. et López Martínez M.C.** (2007). Different

radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal ChimActa*.593:103-107.

**Sangsrichan S. et Wanson W.**(2008).The antioxydant capacity of honey samples collected in the north part of thailand in relationship with its total polyphenol *KMITL Sci. J.* 8(2) :69-73.

**Santos-Buelga C., Gonzalez-Manzano S., Duenas M. et Gonzalez-Paramas A.M.**(2012).Extraction and isolation of phenolic componds. *Natural products isolation, methods in molecular biology*, 864:427-464.

**Sanz M.L., Gonzalez M., De Lorezo C., Sanz J. et Martinez-Castro I.** (2008).A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*.91 : 313-317.

**Saraphirom P. et Reungsang A.** (2010).Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods. *International journal of hydrogen energy*. 35 : 13435-13444.

**Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M.M. et Toth-Markus M.** (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*. 38: 1023-1029.

**Sathish-Kumar T., Shanmugam S., Palvannan T. et Bharathi Kumar V.M.** (2007).Evaluation of antioxidant properties of *Elaeocarpus ganitrus* Roxb Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* .7 (3): 211-215.

**Scalbert A., Monties B. et Janin G.** (1989). Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.37:1324-1329.

**Shi J., Yu J., Pohorly J., Yong J.C., Brayan. et Wu Y.** (2003).Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food Agriculture and Environement*. 2 : 42-47.

**Silva E.M., Rogez H. et Larondelle Y.** (2007).Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 55: 381-387.

**Singleton V.L. et Rossi J.A.** (1965) .Colorimetry of total phenolic with phosp h omolib die –phosphotungstic acids reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158

**Sladana M., Dimitrijevic D. J. Djilas, S.M, Canadanovic-Brunet J.M., Cetkovic G.S., Tumbas V.T. et Stajner D.I.**(2011).Antioxydant activity of three different serbian floral honeys. *APTEFF*. 42: 1-288.

**Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S. & Fortuna, T.** (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chemistr*.113: 568–574.

**Sousa A., Ferreira I.C.F.R., Barros L., Bento A. et Pereira J.A.** (2008).Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Food Science and Technology*.41: 739-745.

**Spigno G., et De Faveri D.M.** (2007).Antioxidantsfromgrape stalksand marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of FoodEngineering*.78: 793-801.

**Stahl W., Heinrich U., Jungmann H., Sies H. etTronnier H.** (2000).Carotenoids and vitamin E protect against ultraviolet light-induced erthema in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71:795-798.

## T

**Terrab A. and Herdia F. J.**(2004). Characterization of avocado (persea Americana Mill) honys physicochemical characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.84: 1801-1805.

**Tinsson W.** (2010).Plans d'expérience : constructions et analyses statistiques, *Mathématiques et applications 67*, Berlin Heidelberg. 532.

**Tumbas V.T. etStajner D.I.**(2011). Antioxydant activity of three different serbian floral honeys. *APTEFF*. 42: 1-288.

## U

**UmaD.B., Ho C.W. et Wan Aida W.M.** (2010).Optimization of extraction parametersoftotal phenolic compounds from Henna (*Lawsoniainermis*) Leaves. *Sains Malaysiana*. 39:119-128.

## V

**Vansant G.** (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed institut Danone.

**Vivier S.** (2002). Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrochimiques modélisés par éléments finis. (Thèse) Université des sciences et technologie de Lille-Ecole centrale de Lille France. 309.

## W

**Wang Y C., Chuang Y C. et Hsu H W.** (2008).The flavonoid, carotenoid and pectin content in peel of citrus cultivated in Taiwan. 106: 277-284.

**Wilfred V., Ralph N.** (2006). Phenolic Compound Biochemistry, *Purdue University, West Lafayette, In.-University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A.*

## Y

**Yap C.F., Ho C.W., Wan Aida W.M., Chan S.W., Lee C.Y. et Leong Y.S.** (2009) .optimization of extraction conditions of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola L*) residues. *Sains Malaysiana*. 38:511-520.

**Yuefei Zhang, Zhe Liu, Yali Li, Ruan Chi.** (2014). Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of isoflavones from *Radix puerariae* by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*. 129: 71–79

## Z

**Zalibera M., Stasko A., Slebođova A., Jancovicova V., Cermakova T. et Brezova V.** (2008). Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys- An electron paramagnetic resonance study. *Food Chemistry*. 110: 512-521.



*Annexes*

**Annexe I : Les principaux constituants du miel (Pham-Delegue, 1999 ; Meda et al., 2005).**

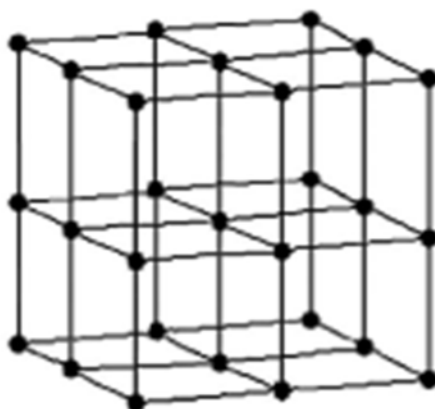
Composition		Teneur
Eau		14-20%
Glucides	Fructose	38%
	Glucose	31%
	Saccharose	1,3%
Protéines		0,62%
Acides aminés		≥180 mg /Kg
Substances minérales		Ne dépasse pas 1,2%
Substances aromatiques		100-150 substances différentes
Acides organiques		Teneur faible

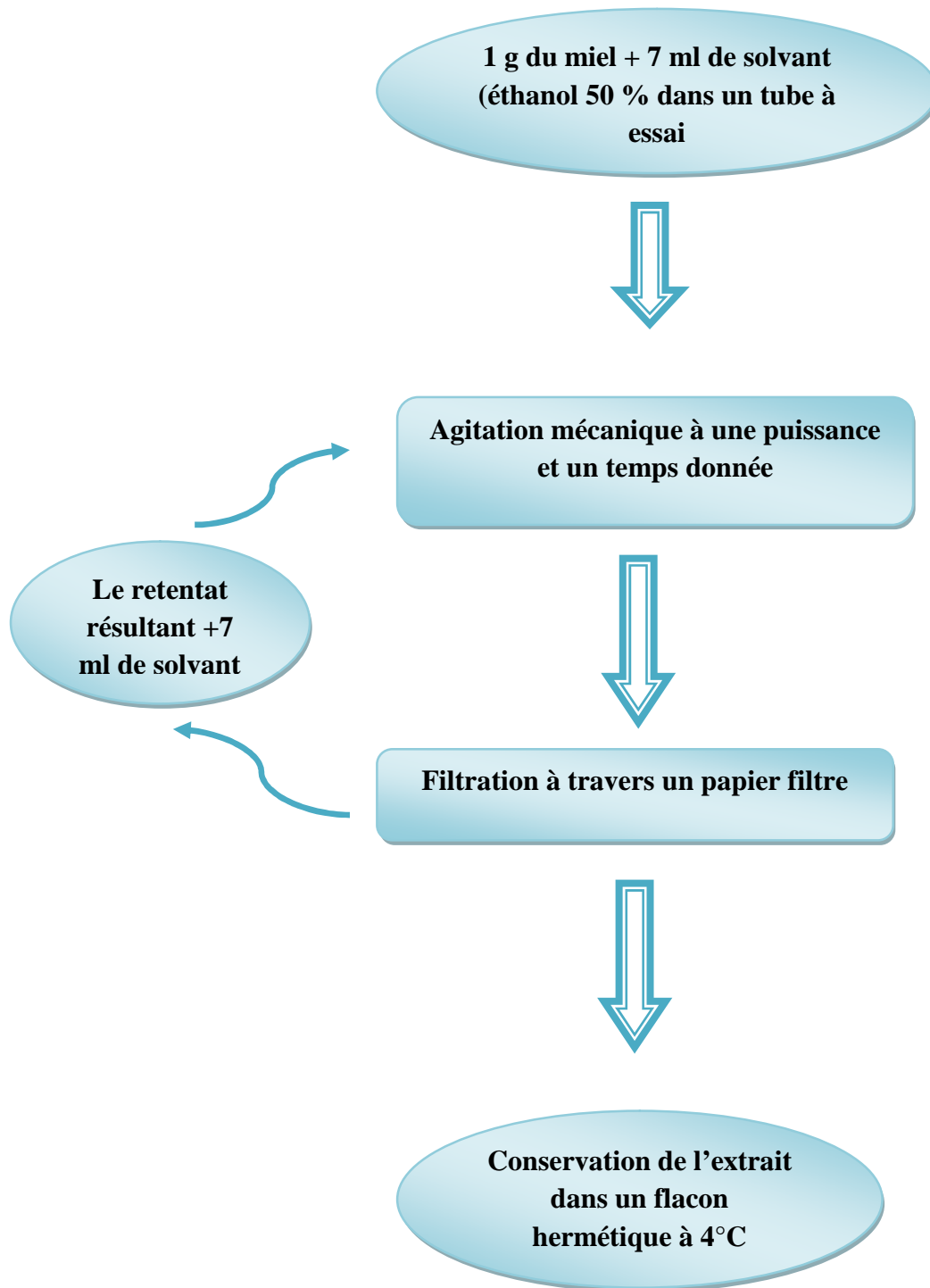
**Annexe II : Production mondiale de miel en 2011 (FAOSTAT., 2011).**

Pays	Production (Tonnes)
<b>Chine</b>	<b>46,7</b>
<b>Turquie</b>	<b>10</b>
<i>Ukraine</i>	<b>8,7</b>
<b>Etats-Unis</b>	<b>8,2</b>
<b>Inde</b>	<b>7,5</b>
<b>Argentine</b>	<b>7,3</b>
<b>Mexique</b>	<b>7</b>
<b>Ethiopie</b>	<b>6,6</b>
<b>Iran</b>	<b>6,2</b>

**Annexe III : Production Algérienne de miel en 2011 (FAOSTAT., 2011).**

Pays	Production
Seddouk	19546,2
Bejaia	12950
Amizour	11260
Tazmalt	10611,4
Sidi-Aich	9998
Aokas	9938,2
EL-Kseur	8656,4
Akbou	8445

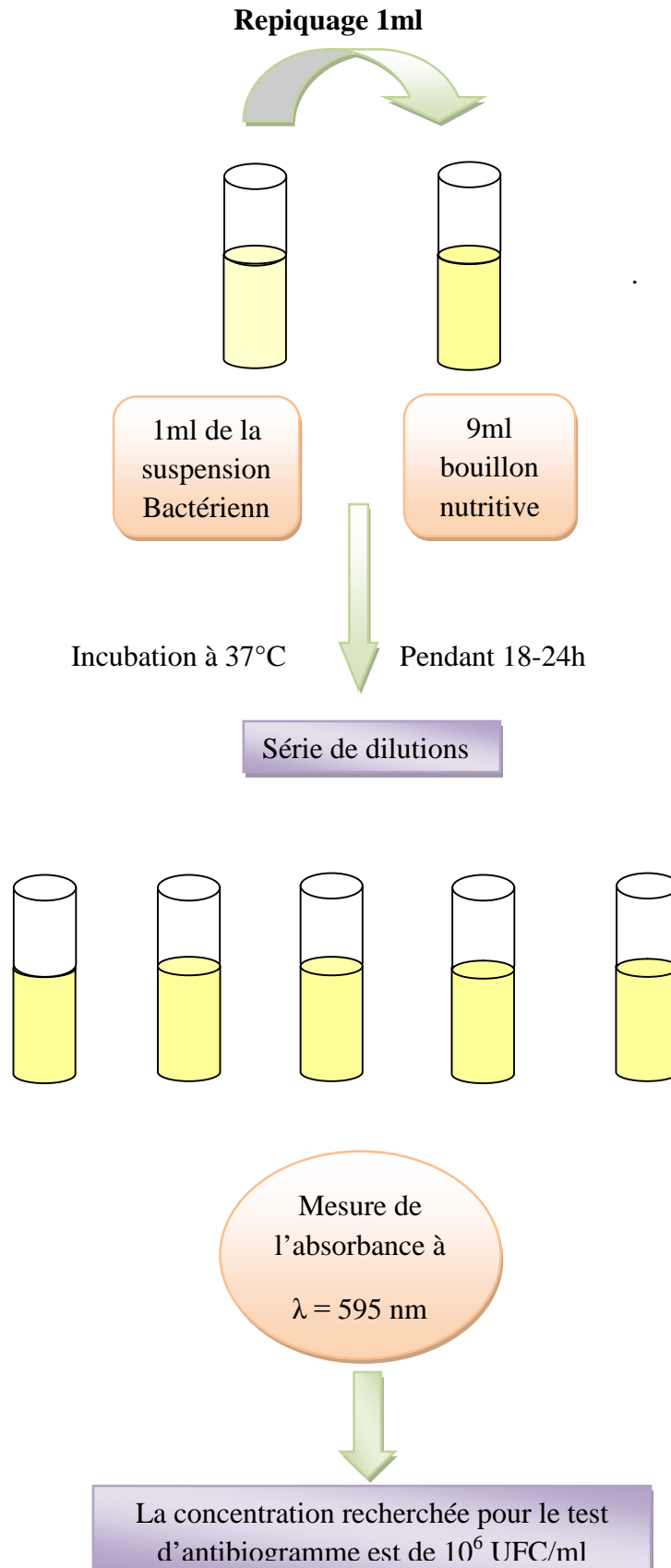
**Annexe IV : Illustration de plan Box-Behnken pour quatre facteurs (Goupy, 2006).**

**Annexe V :Schéma d'extraction des antioxydants.**



**Annexe VI : Tableaux récapitulatif des expériences du plan de Box-Behnken pour quatre facteurs (Goupy, 2006)..**

Essai n°	Pattern	puissance	temps	Rapport eau/solvant	Rapport miel/solvant
01	00++	0	0	1	1
02	+00-	1	0	0	-1
03	0000	0	0	0	0
04	0-+0	0	-1	1	0
05	-+00	-1	1	0	0
06	-0+0	-1	0	1	0
07	0-0-	0	-1	0	-1
08	0+0-	0	1	0	-1
09	0000	0	0	0	0
10	--00	-1	-1	0	0
11	++00	1	1	0	0
12	+00+	1	0	0	1
13	-0-0	-1	0	-1	0
14	-00-	-1	0	0	-1
15	0- -0	0	-1	-1	0
16	0++0	0	1	1	0
17	00-+	0	0	-1	-1
18	0+0+	0	1	0	1
19	0-0+	0	-1	0	1
20	00-+	0	0	-1	1
21	0+0-	0	1	-1	0
22	+0-0	1	0	-1	0
23	-00+	-1	0	0	1
24	00+-	0	0	1	-1
25	+00	1	-1	0	0
26	+0+0	1	0	1	0
27	0000	0	0	0	0

**Annexe X : Schéma de la standardisation des souches bactériennes.**

## Annexe XI : la mesure des zones d'inhibitions

	Gram -		Gram +
	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<b>Miel d'Akfadou</b>	14±0,94	16,3±0,14	14,33±0,52
<b>Miel d'Ighil-Ali</b>	18±0,33	8,5±0,4	11±0,15
<b>Miel De Sidi-Aich</b>	17±0,54	4,54±0,53	5,3±0,32

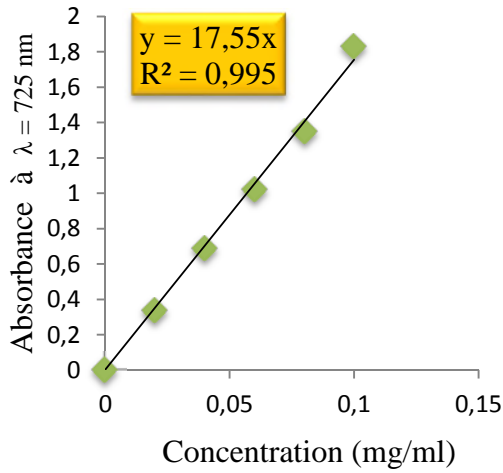
## Annexe XVI : Matériels et Réactifs utilisés

Matériels	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bain marie (MEMMERT)</li> <li>- Balance de précision (BP 310 P)</li> <li>- Centrifugeuse (PHYWE)</li> <li>- Etuve (BINDER, MEMMERT, BD53)</li> <li>- Micro- Onde</li> <li>- pH mètre (HANNA pH 210)</li> <li>- Spectrophotomètre UV-VIS (SHIMADZU 1240 MINI)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acétone pure</li> <li>- Acide acétique</li> <li>- Acide trichloracétique</li> <li>- Chlorure d'aluminium (<math>\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}</math>)</li> <li>- Carbonate de sodium</li> <li>- Chlorure ferrique (<math>\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}</math>)</li> <li>- DPPH</li> <li>- Ethanol pure</li> <li>- Méthanol pure</li> <li>- Ferrocyanure de potassium [<math>\text{K}_3\text{Fe}(\text{NC})_6</math>]</li> <li>- HCl</li> <li>- Hexane</li> <li>- <math>\text{NaSO}_4</math></li> <li>- Sodium phosphate dibasic dehydrate <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}</math></li> <li>- Sodium dihydrogène phosphate <math>\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}</math></li> <li>- Acidesulfurique pure (<math>\text{H}_2\text{SO}_4</math>)</li> <li>- Molybdate d'ammonium</li> <li>- KOH</li> <li>- Réactifs de Folin- ciocalteu</li> <li>- L'acide oxalique</li> <li>- DCPIP</li> <li>- Persulfate de potassium</li> <li>- ABTS</li> <li>- Standards utilisés: acide gallique, quercétine, acide ascorbique et <math>\beta</math>-carotène.</li> </ul>

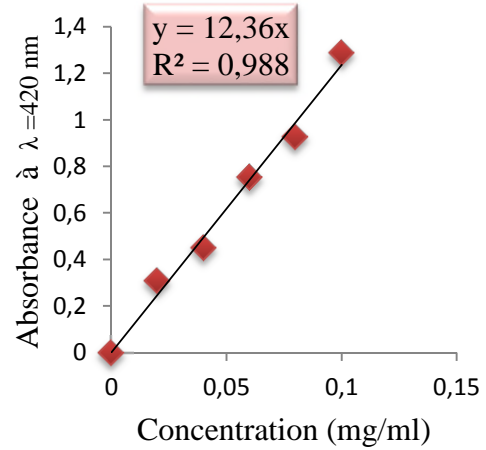
## Annexe XVII : Préparation de différentes solutions utilisées.

Solution	Réactifs
Solution de carbonate de sodium $\text{NaCO}_3$ (60g /l)	6g de $\text{NaCO}_3$ 100 ml d'eau distillée
Solution de chlorure d'aluminium $\text{AlCl}_3$ (2%)	3,61 g de ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) 100ml d'éthanol
Tompon chlorure (pH=1 ; 0,025M)	0,7 g de KCl dans 50ml d'eau distillée 1,82ml d'HCl dans 50ml d'eau distillée
Acétate desodium } Tompon acétate (0,4M) (pH=4,5 ; 0,4M) Acide acétique } (1M)	16,40g dans 50ml d'eau distillée 3ml dans 50ml d'eau distillée
Sel de potassium (1M)	5,611 g dans 100ml d'eau distillée
Tompon phosphate (0,2 M ; pH=6,6)	1,4199 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ dans 50ml d'eau distillée 0,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ dans 50ml d'eau distillée
Chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) PM=270,33g/mol	0,16 g de chlorure ferrique dans 100ml d'eau distillée
Acide sulfurique $\text{H}_2\text{SO}_4$ } Réactif Phosphate de sodium } molybdique } Molybdate d'ammonium }	3,248ml (0,6M, PM=98,07 g /mol) 0,4368 g (28 mM, PM= 156)
Solution de DPPH·	1,182 g DE DPPH dans 50 ml de méthanol
Solution d'ABTS ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$ ) à 7mM	- 90 mg de la poudre d'ABTS dans 25ml d'eau distillée. -Persulfate de potassium à 2,45 Mm. - Mélanger les deux solutions de 12 à 16heures à l'abri de la lumière avant son utilisation.

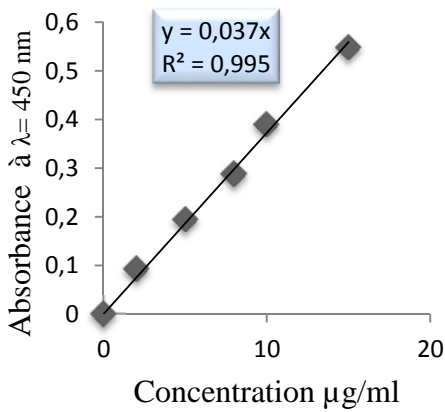
## Annexe VII : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants



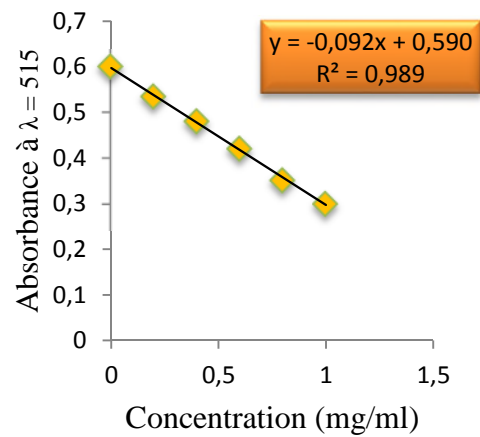
1. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique



2. courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la Quercitine



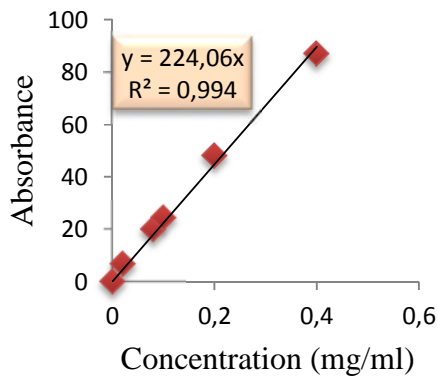
3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes en utilisant la  $\beta$ -carotène



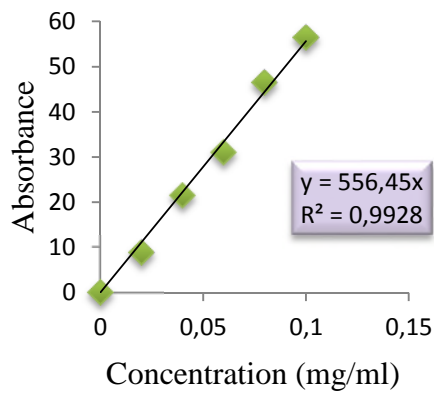
4. courbe d'étalonnage pour le dosage vitamine C en utilisant l'A. Ascorbique.



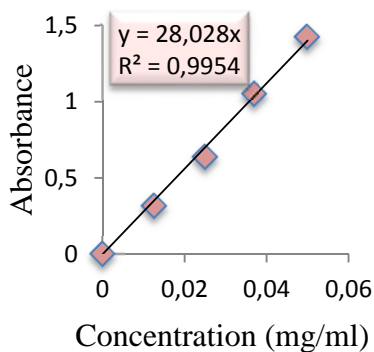
### Annexe VIII : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants



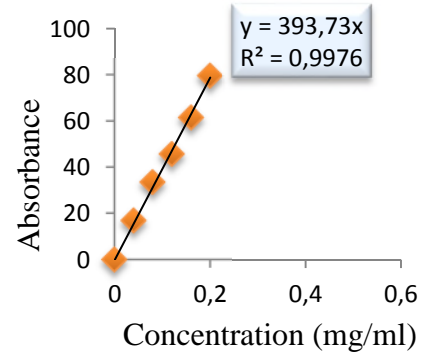
- Pourcentage de réduction de  $FeCl_3$  en fonction de la concentration en acide gallique



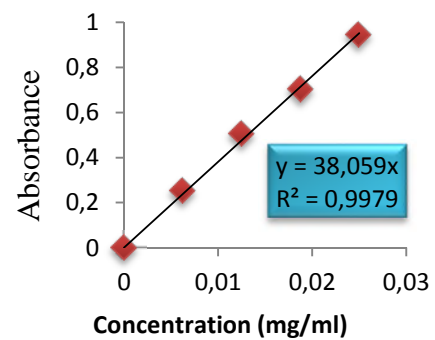
-Pourcentage de réduction de  $FeCl_3$  en fonction de la concentration en acide ascorbique



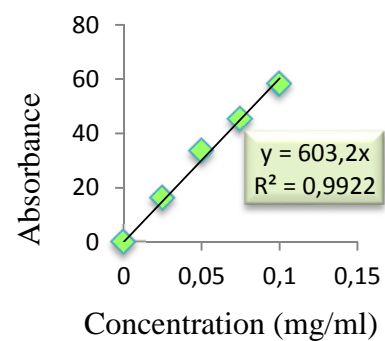
-Pourcentage de réduction du phosphomolybdate en fonction de la concentration en acide gallique.



-Pourcentage de réduction de  $FeCl_3$  en fonction de la concentration en quercétin.



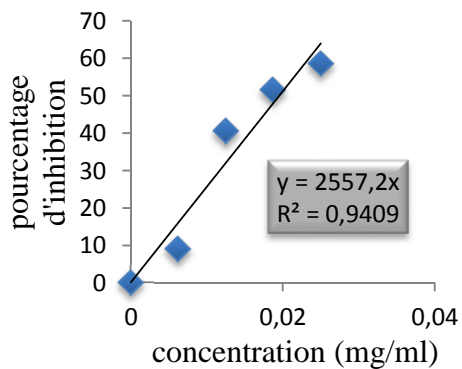
-Pourcentage de réduction du phosphomolybdate en fonction de la concentration en quercétine



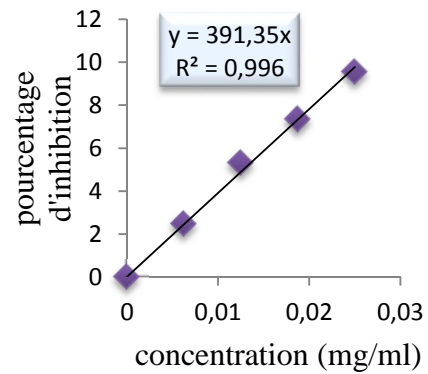
-Pourcentage de réduction du phosphomolybdate en fonction de la concentration en acide ascorbique.



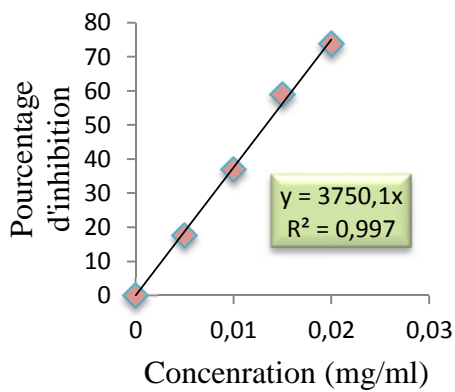
## Annexe IX : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des antioxydants



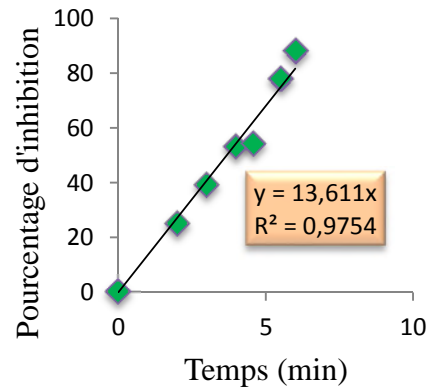
- Pourcentage de réduction de DPPH en fonction de la concentration en acide gallique.



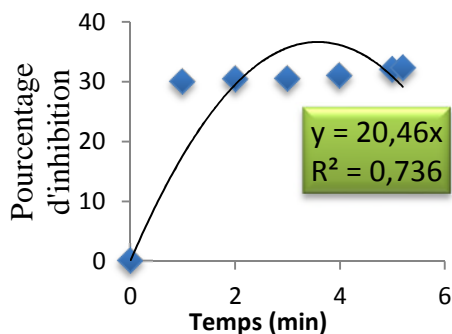
- Pourcentage de réduction de DPPH en fonction de la concentration en acide gallique.



- Pourcentage de réduction de DPPH en fonction de la concentration en acide Ascorbique.

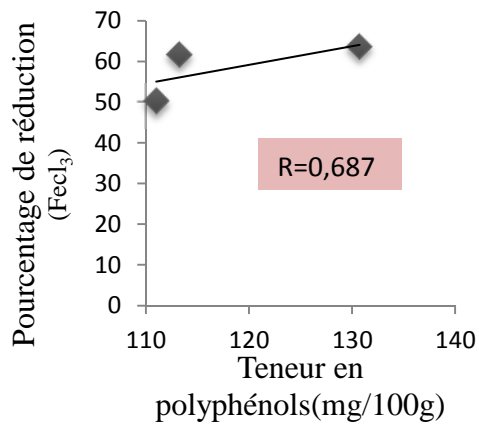


- Pourcentage de réduction d'ABTS en fonction de la concentration acide Ascorbique.

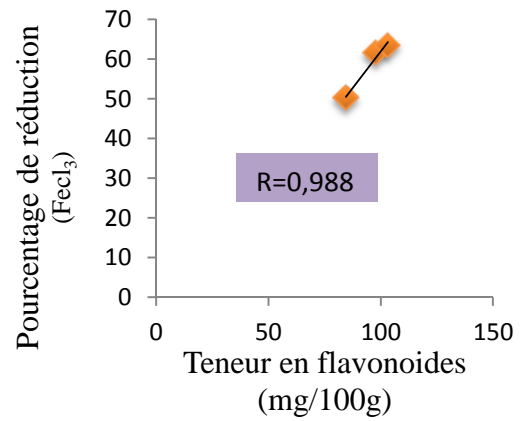


- Pourcentage de réduction d'ABTS<sup>•+</sup> en fonction de la concentration acide gallique.

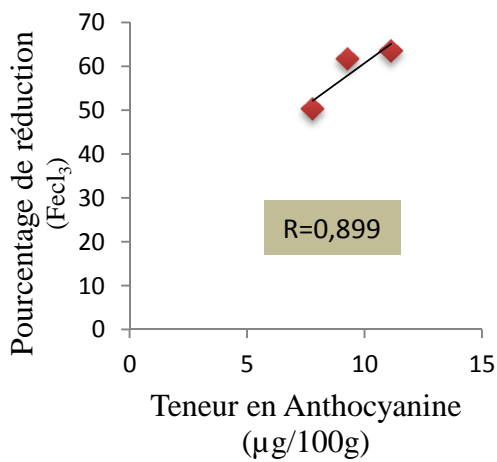
**Annexe XII:** Corrélation entre le pourcentage de réduction du  $\text{FeCl}_3$  avec, les Teneurs en antioxydants.



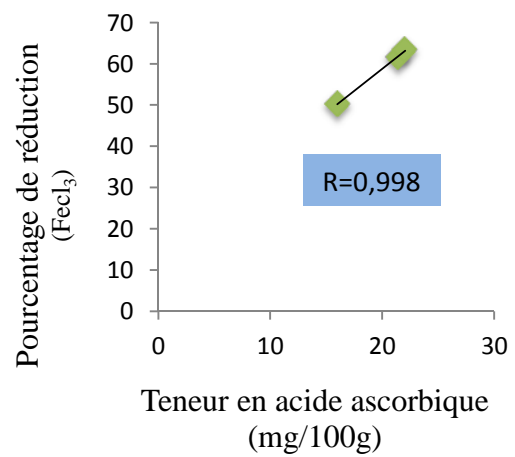
1. Avec les Polyphénols du miel étudié.



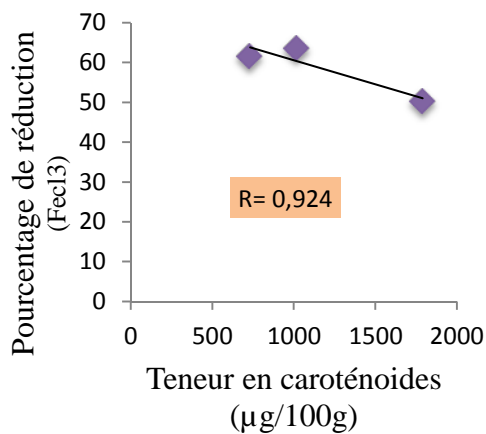
2. Avec les Flavonoïdes du miel étudié.



3. Avec les Anthocyanines du miel étudié.

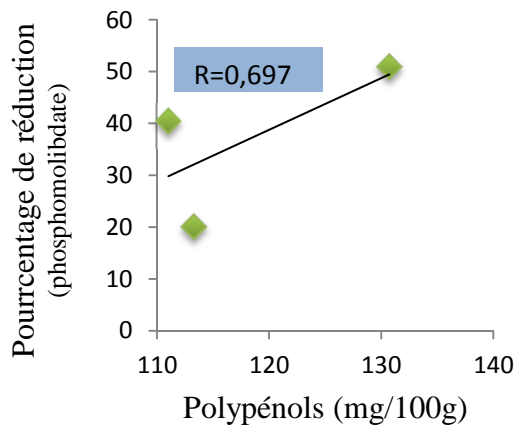


4. Avec l'acide ascorbique du miel étudié.

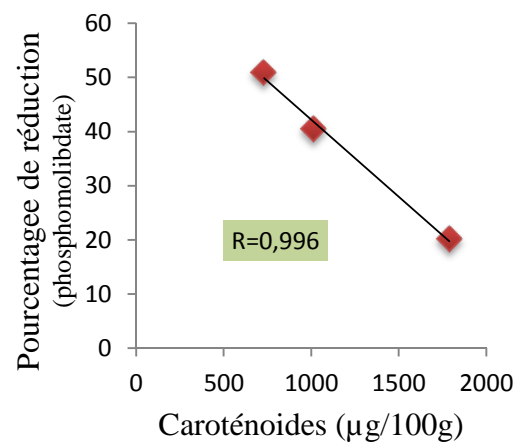


5. Avec les Caroténoïdes du miel étudié.

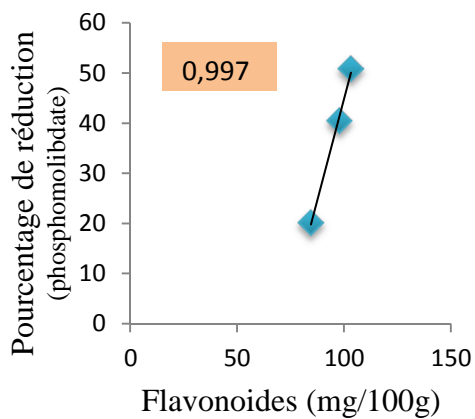
**Annexe XIII : Corrélation entre le pourcentage de réduction du phosphomolibdate avec, les Teneurs en antioxydants.**



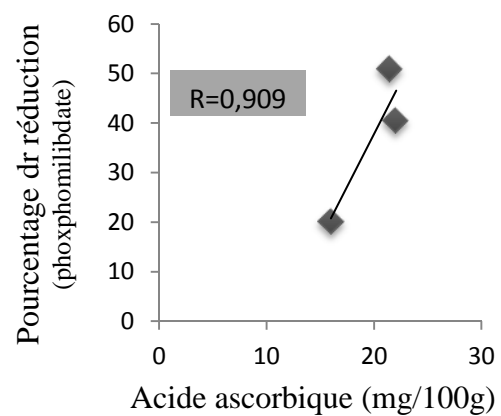
1. Avec les Polyphénols du miel.



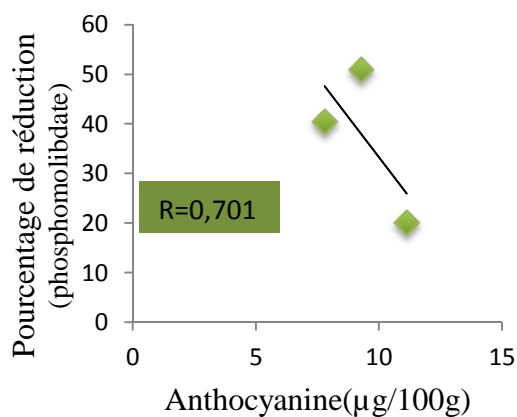
2. Avec les Caroténoïdes du miel étudié.



3. Avec les Flavonoïdes du miel étudié.

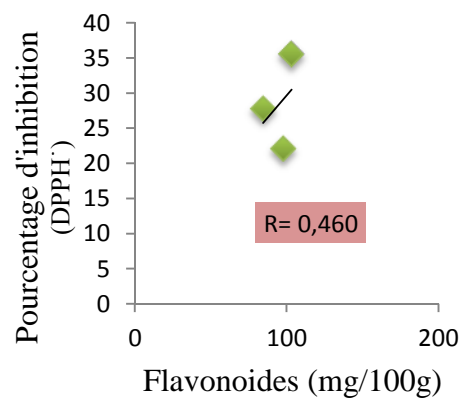
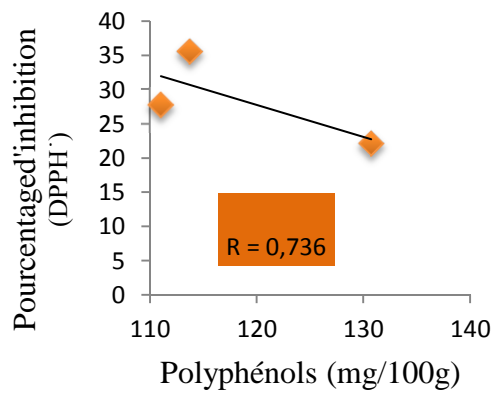


4. Avec l'A. Ascorbique du miel étudié.

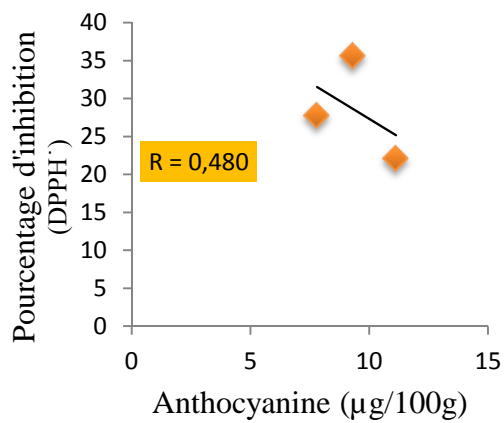


5. Avec les Anthocyanines du miel étudié.

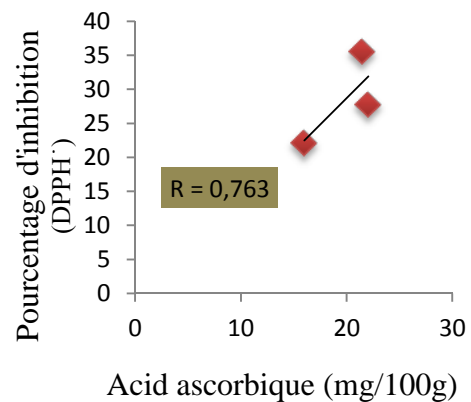
**Annexe XIV : Corrélation entre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>·</sup> avec, les Teneurs en antioxydants.**



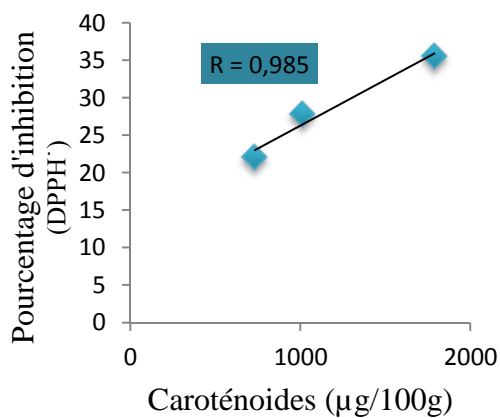
1. Avec les Polyphénols du miel étudié.



2. Avec les Flavonoïdes du miel étudié.



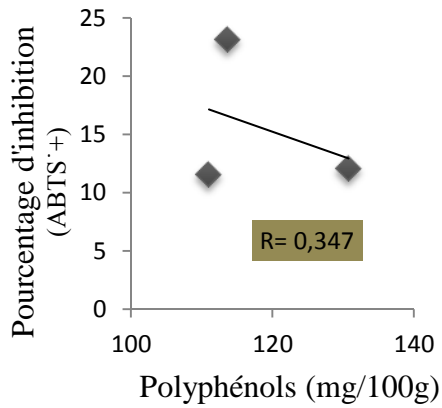
3. Avec les Anthocyanines du miel.



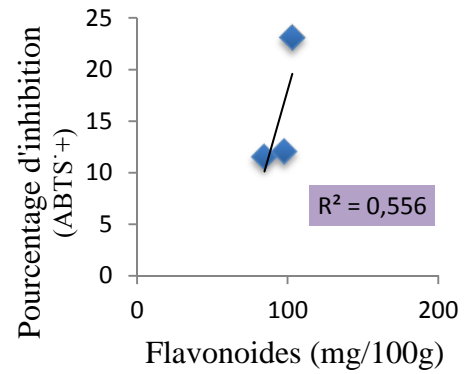
4. Avec l'Acide ascorbique du miel.

5. Avec les Caroténoïdes du miel.

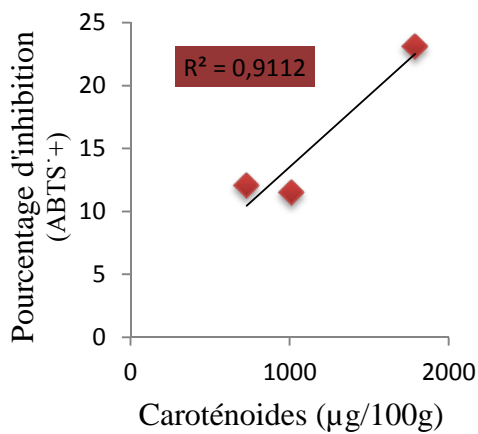
**Annexe XV : Corrélation entre le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>+</sup> avec, les Teneurs en antioxydants**



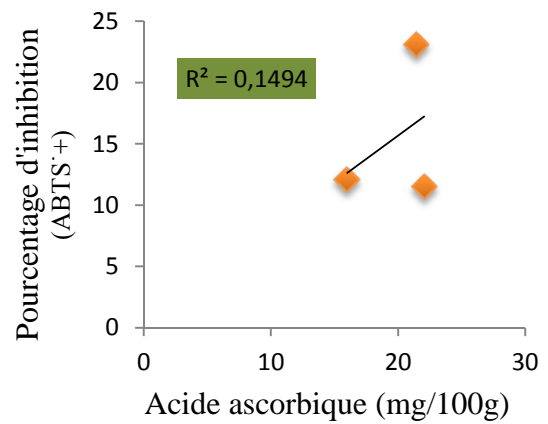
1. Avec les polyphénols du miel étudié.



2. Avec les Flavonoïdes du miel étudié.



3. Avec les caroténoïdes du miel étudié.



4. Avec l'Acide ascorbique du miel.

## Résumé

La présente étude s'intéresse à étudier la modélisation et l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques à partir de trois échantillons du miel, par l'utilisation de la méthode de surface de réponse Box-behnken et l'étude de quelques activités biologiques. Les conditions d'extractions des polyphénols : Concentration du solvant, la puissance, le temps et le rapport (solvant/matière) ont été optimisés en appliquant le plan expérimental Box-Behenken.

Une quantification des antioxydants (polyphénols, falavonoids, anthocyanines, caroténoïdes et vitamine C) et une évaluation des activités antioxydantes (réduction du  $FeCl_3$  et phosphomolybdate), anti-radicalaire (DPPH $^{\cdot}$  et ABTS $^{\cdot+}$ ), et antibactérienne vis-à-vis trois souches à savoir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* des échantillons du miel étudié.

**Mots clés :** Miel, optimisation, Box-behenken, composés phénoliques, activitésBiologiques, activité antibactérienne.

## Abstract

This study focuses on studying the modeling and optimization of the extraction of phenolic compound from three samples of honey, by using the method of surface Box- Behnken response and the study of some activities organic. The extraction of polyphenols conditions: Concentration of the solvent, the power, the time and the ratio (solvent / material) have been optimized by applying experimentally Box Behenken.Quantification of antioxidants (polyphenols, falavonoids, anthocyanins, carotenoids and vitamin C) and evaluation of antioxidant activities (reduction of  $FeCl_3$  and phosphomolybdate), anti-free radical (DPPH and ABTS $^{\cdot+}$ ), and antibacterial vis-à-vis three strains namely *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* honey samples studied.

**Keywords:** Honey, optimization, Box behenken, phenolic compounds, activities Biological antibacterial activity.