

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**UNIVERSITE DE TLEMCCEN**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT DE CHIMIE**



**LABORATOIRE DE CHIMIE ORGANIQUE, SUBSTANCES NATURELLES ET ANALYSES**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE**

**FILIERE : CHIMIE**

**SPECIALITE : CHIMIE BIO ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE**

## **MEMOIRE DE MASTER**

# **ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE ET EVALUATION BIOLOGIQUE DE LA PROPOLIS DE PLUSIEURS REGIONS DE TLEMCCEN (ALGERIE)**

**SOUTENU PAR BAGHDAD Hicham LE 14 JUIN 2017**

**DEVANT LE JURY COMPOSE DE :**

**MR BENDIABDELLAH DJAMAL**

**PRÉSIDENT**

**MR KAJIMA MULENGI JOSEPH**

**EXAMINATEUR**

**MME ASSIA KENICHE**

**ENCADREUR**

**ANNEE 2016-2017**

## ABSTRACT:

**Keywords :** propolis, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Propolis is a natural substance sticky resinous that is harvested by the honey bees, which was determined its composition in polyphenols and flavonoids for five samples; four of Tlemcen and one of Chlef. Its chemical composition depends on harvest area (botanic origins) and it gives it antioxidant property. For the antimicrobial activity it has proved to be very low in comparison with the other propolis in the world. Then, we studied the impact of the complexation of our extracts by  $\beta$ -cyclodextrin, in terms of antioxidant and antimicrobial activities.

## RESUME :

**Mots clés :** propolis, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

La propolis est une substance naturelle collante, et résineuse récoltée par les abeilles ouvrières, dont on a déterminé sa composition en polyphénols et flavonoïdes pour cinq échantillons ; quatre de Tlemcen et une de Chlef. Sa composition chimique dépend de la zone de récolte (source botanique) ce qui reflète la différence de leur activité antioxydante. Pour l'activité antimicrobienne elle s'est révélée très faible par rapport aux autres propolis du monde. De plus nous avons étudié l'impact de la complexation de nos extraits par la  $\beta$ -cyclodextrine, sur le plan des activités antioxydante et antimicrobienne.

## ملخص :

كلمات مفتاحيه : عكبر، بوليفينولات ، فلافونويدات، فعالية مضادة للأكسدة، فعالية مضادة للميكروبات.

العكبر هي مادة لاصقة وصمغية ينتجها النحل العامل، وقد قمنا بتحديد كمية البوليفينولات والفلافونويدات في خمس عينات، أربع عينات من ولاية تلمسان وعينة واحدة من ولاية الشلف. إن تركيبته الكيميائية تتعلق بمكان جنيه (المصدر النباتي) وهي التي تمنحه فعاليته المضادة للأكسدة. أما فيما يخص فعاليته ضد الميكروبات فقد كانت ضعيفة جدا مقارنة بعكبر المناطق الأخرى من العالم. درسنا تأثير مركب بيتا-سيكلوديكسترين مع عيناتنا على الفعالية المضادة للأكسدة والمضادة للميكروبات.

# *DÉDICACE*

*A tous ceux que j'aime*

# *REMERCIEMENTS*

**A tous ceux qui m'ont aidé.**

**Et à Mm KENICHE Assia qui avait l'honneur de m'encadrer.**

Je remercie l'ensemble des membres de mon jury de mémoire qui ont l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie l'équipe de Biologie du laboratoire de microbiologie de l'université de Tlemcen, pour l'évaluation de l'activité biologique de nos extraits, et spécialement Mesdames ; Bellifa Samia et Nass Fatéma.

Je remercie, l'apiculteur Mr.Ghouti et Mr.Slimani pour l'octroi de la propolis gratuitement de plusieurs régions de Tlemcen et celle de Chlef.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**A** : Absorbance UV.

**AA** : activité antioxydante.

**Ar** : Aryle.

**CAPE** : phényléthylique d'acide caféique.

**CCM** : chromatographie sur couche mince.

**CD** : cyclodextrine

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

**EC 50** : Concentration Effective médiane.

**EEP** : Extrait éthanolique de propolis.

**ESI** : Electro- Spray Ionisation (Ionisation par électro-nébuliseur)

**FCR** : réactif de Folin-Ciocalteu

**HPLC** : Chromatographie Liquide de Haute Performance

**IC 50** : Concentration Inhibitrice médiane

**IR** : Spectroscopie infrarouge

**GC** : chromatographie gazeuse

**LC** : chromatographie liquide

**LD 50** : dose létale médiane.

**MIC** : concentration inhibitrice minimale.

**MS** : Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse)

**PDA** : détecteur à barrette de diodes

**pH** : Potentiel Hydrogène

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire.

**TEAC**: Trolox equivalent antioxidant capacity (capacité antioxydante en équivalent trolox)

**UV** : ultraviolet.

## Sommaire :

### Partie bibliographique

I.	INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
	A. C'est quoi la propolis ? : .....	1
	B. Problématique : .....	1
	C. Objectifs : .....	1
II.	Chapitre 1 : Généralité sur la propolis .....	1
	A. Généralité : .....	1
	1. Un peu d'histoire sur la propolis .....	1
	2. Origine de la propolis: .....	2
	3. Utilisation par l'abeille : .....	2
	B. Intérêts biologiques et thérapeutiques de la propolis : .....	2
	1. Propriétés antioxydantes : .....	3
	2. Activité antibactérienne : .....	3
III.	Chapitre II : Les différentes études sur la propolis .....	4
	A. Introduction : .....	4
	B. Etude chimique : .....	4
	1. Composés non volatiles de la propolis : .....	4
	2. Composés volatiles : .....	6
	C. Etudes sur la propolis algérienne : .....	7
	1. Etude chimique .....	7
	2. Etudes biologiques : .....	8
IV.	Conclusion général .....	9

### Partie expérimentale

I.	Travail effectué : .....	10
II.	Matériels et méthodes : .....	10
	A. Extraction de la propolis : .....	10
	B. Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale des EEP : 11	
	C. Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des EEP : 11	
	1. Quantité totale en polyphénols : .....	11
	2. Quantité totale en flavonoïdes : .....	11
	D. Evaluation de l'activité antioxydante de chaque EEP : ....	11
	1. Activité antioxydante DPPH : .....	12
	2. Méthode FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) : .....	12

3.	<b>Activité antioxydante par l'oxydation de l'acide linoléique :</b> .....	13
	E. Evaluation de l'activité antimicrobienne des EEP :.....	13
1.	<b>Préparation des suspensions des germes test :</b> .....	13
2.	<b>Protocole de l'activité antimicrobienne par la technique des disques en papier :</b> .....	13
	F. Extraction et estérification des acides gras de la propolis :14	
1.	<b>Extraction des acides gras de la propolis :</b> .....	14
2.	<b>Estérification des acides gras :</b> .....	14
III.	Résultats et discussions :.....	14
	A. La longueur d'onde d'absorption maximale des EEPs: ....	14
	B. Quantité totale en polyphénols et flavonoïdes :.....	15
1.	<b>Quantité totale en polyphénols :</b> .....	15
2.	<b>Quantité totale en flavonoïdes :</b> .....	16
	C. Evaluation de l'activité antioxydante :.....	17
1.	<b>Activité antioxydante par DPPH :</b> .....	17
2.	<b>Activité antioxydante par la méthode FRAP :</b> .....	20
3.	<b>Activité antioxydante par la méthode d'oxydation de l'acide linoléique :</b> .....	21
	D. Evaluation de l'activité antimicrobienne :.....	23
	E. Extraction et estérification des acides gras :.....	25
	F. Etude comparative des EEP et les esters méthyliques avec CCM :	25
	G. Détermination de pH des EEP :.....	26
IV.	Conclusion générale :.....	27
	Perspectives:.....	27
	Références :.....	29
	Anexes :.....	33

### I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### A. C'est quoi la propolis ? :

La propolis est une substance naturelle, collante et résineuse, récoltée par les abeilles ouvrières (*Apis mellifera*), à partir des bourgeons de différents d'arbres. Elles les mélangent avec ses propres enzymes (ex :  $\beta$ -glucosidase) [1], de la cire et de pollen formant ainsi la propolis [mot grecque, *pro*=défense et *polis*=cité] [2,3,4]. D'où, son utilisation par les abeilles comme un moyen de défense contre les micro-organismes pathogènes, et pour embaumer les intrus qui peuvent entrer dans la ruche en empêchant leur décompositions [1,5]. En plus, elle est utilisé pour sceller la ruche et pour la laver, la propolis peut être appelée une "arme chimique" des abeilles [6,7,8].

#### B. Problématique :

La résistance médicamenteuse est de plus en plus prononcée dans notre monde actuel, de plus l'émergence de nouvelles épidémies dues à la mutation des virus et bactéries, est une urgence pour nous les chimistes à développer et trouver de nouvelles molécules actives.

#### C. Objectifs :

Dans le cadre d'explorer le règne naturel, afin de trouver de nouvelles substances actives, nous avons choisi l'étude de la propolis, de plusieurs régions de Tlemcen avec objectif ultime de trouver celle qui correspond au meilleur emplacement, via l'étude de la composition chimique et l'évaluation de l'activité biologique.

### II. Chapitre 1 : Généralité sur la propolis

#### A. Généralité :

##### 1. Un peu d'histoire sur la propolis

Par sa biodiversité, elle se révèle aseptisante pour le logis des abeilles. Un corps étranger introduit dans la ruche est tué par le venin, et enduit de propolis. Elle servait autrefois comme anti-infectieux externe, contre les tuméfactions, les indurations et les plaies qui cicatrisent mal [9].

## 2. Origine de la propolis:

La composition de la propolis est issue de trois sources :

a) **Végétal** : des exsudates de la plante rassemblé par les abeilles, les résines secrétés par les bourgeons de peuplier, pin, bouleau, châtaigne, érable, et les substances lipophiliques secrétés par les lésions des plantes (des résines ou des colles) [10].

b) **Animal** : Substances secrétés par les abeilles (la cire, la salive) [10].

c) **Matières secondaires** : introduites pendant la production de la propolis (le pollen, le nectar ou le miel). Selon la source de la plante rassemblée par les abeilles [10].

**Tableau (1) : Relation entre le genre des plantes et la région géographique de la propolis.**

Genre/espèce arbre ou plante	Région géographique	Référence
<i>Populus Nigra, Populus Italique</i> et <i>Populus Tremula</i>	Mongolie et Bulgarie	[11]
<i>Betula, Populus, Pinus, Acacia</i> et <i>Aesculus</i>	Hongrie	[12]
<i>Caducs Populus</i> et <i>Betula</i>	Russie	[13]
<i>Baccharis</i> spp	Brésil	[14]
<i>Clusia minor</i> et <i>Clusia major</i>	Le Venezuela	[15]
<i>Populus Trichocarpa</i> et <i>Populus Tremuloides</i>	Canada	[16]

## 3. Utilisation par l'abeille :

Les abeilles sont d'excellentes chimistes car elles transforment en permanence des résines en propolis pour: le scellement des fissures dans la ruche, création d'une surface lisse pour la fixation des rayons de miel, l'embaumement des parasites [17].

### B. Intérêts biologiques et thérapeutiques de la propolis :

La composition chimique précise de la propolis est complexe et influencée par plusieurs facteurs tel que : l'origine phytogéographique, la période de récolte (saison), et le type d'abeilles (espèces) qui fourragent [18].

## 1. Propriétés antioxydantes :

La propolis possède une activité antioxydante, cependant, il y a peu d'études sur le rapport entre cette activité et les composés chimiques dans la propolis. Elle est déterminée essentiellement par l'inhibition d'oxydation d'acide linoléique et la méthode DPPH [18].

L'activité antioxydante a une relation directe avec la quantité totale des flavonoïdes dans les EEP. Yamauchi et al. (1992) ont isolé la cafféate du benzyle comme un des antioxydants de propolis Chinoise, et ont décrit que des composants autre que les flavonoïdes contribuent aussi à l'activité antioxydante de propolis [19].

## 2. Activité antibactérienne :

Beaucoup d'études ont montré que, la propolis est généralement active contre la plupart des bactéries gram-positives et quelques champignons, le niveau d'activité dépend de la zone géographique, sûrement dû à la différence dans la composition chimique [20].

La propriété antimicrobienne de la propolis a été largement étudiée, et plusieurs auteurs ont démontré son activité antibactérienne, comme le montre le tableau suivant [21,22].

**Tableau (2) : L'activité antibactérienne de la propolis de plusieurs zone géographique vis-à-vis plusieurs bactéries.**

zone géographique	Produit à tester	Activité antibactérienne MIC(mg/L)	Genre de bactérie cible	Référence
Royaume unie	EEP	MIC< 250mg/L	<i>S.aureus, S.t. pyogene, B.cereus</i>	[20]
Camerone	EEP	MIC< 32mg/L	<i>S.aureus, S.epidermidis, St.pyogenes, E.faecalis, B.subtilis, B.cereus.</i>	
Tanzanie	EEP	MIC< 16mg/L	<i>S.aureus S.epidermidis, St.pyogenes, E.faecalis, B.subtilis, B.cereus.</i>	
Chine	EEP	MIC<125mg/L	<i>S.aureus, S.epidermidis, St.pyogenes, E.faecalis, B.subtilis, B.cereus.</i>	
Etats unis	EEP	MIC< 250mg/L	<i>S.aureus, S.epidermidis, St.pyogenes, E.faecalis, B.subtilis, B.cereus.</i>	
Grèce	EEP	MIC<2.5mg/L	<i>S. aureus, S. epidermidis, B. cereus, L. monocytogenes et L.fermentum</i>	[23]

- D'autres activités sont détectées comme : anticancéreuse [24], hépatoprotective [25] et immunorégulatrice [26].

### **III. Chapitre II : Les différentes études sur la propolis**

#### **A. Introduction :**

Il existe des différences significatives de composition entre les propolis, selon le lieu géographique de la ruche, les végétaux employés, les espèces d'abeilles et la disponibilité des végétaux nécessaires à l'élaboration de la propolis.

#### **B. Etude chimique :**

On ne peut pas standardiser la composition chimique de la propolis pour tous les échantillons car elle dépend de plusieurs facteurs.

#### **1. Composés non volatiles de la propolis :**

pinobanksin 3-(2-méthyl)butyrate (1), pinobanksin 3-isobutyrate (2), pinobanksin 3-hexanoate (3), pinobanksin 3-butanoate (4), pinobanksin 3-propanoate (5), pinobanksin 3-acétate (6), pinobanksin 3-acetoxy-7-méthyl éther (3-acetylalpinone) (7), pinobanksin 5-méthyl éther (8), pinobanksin (9), pinostrobin(10), pinoembrin(11), chrysin (12), tectochrysin (13), chrysin 5-méthyl éther (14), galangin (15), izalpinin (16), kaempferol (17), éther 3-méthyl quercetin (18), acide p-coumarique (19), acide cafféique (20), acide 3,4-diméthoxycinnamique (21), acide cinnamylideneacétique (22), 2-méthyl-2-butenyl p-coumarate (23), 2-méthyl-2-butenyl ferulate (24), 3-méthyl-3-butenyl ferulate (25), benzyl p-coumarate (26), benzyl ferulate (27), phenyléthyl cafféate (28), cinnamyl cinnamate (29), cinnamyl p-coumarate (30), cinnamyl cafféate (31), cinnamyl isoferulate (32), cinnamyl 3,4-diméthoxycinnamate (33), 2-Acétyle-1-coumaroyl-3cinnamoylglycérol (34), 2-Acétyle-1-feruloyl-3-cinnamoylglycérol (35) 2-Acétyle-1,3-dicinnamoylglycérol (36), 2-acétyle-1,3-dicafféoylglycérol (37), 2-acétyle-1-cafféoyl-3coumaroylglycérol (38).

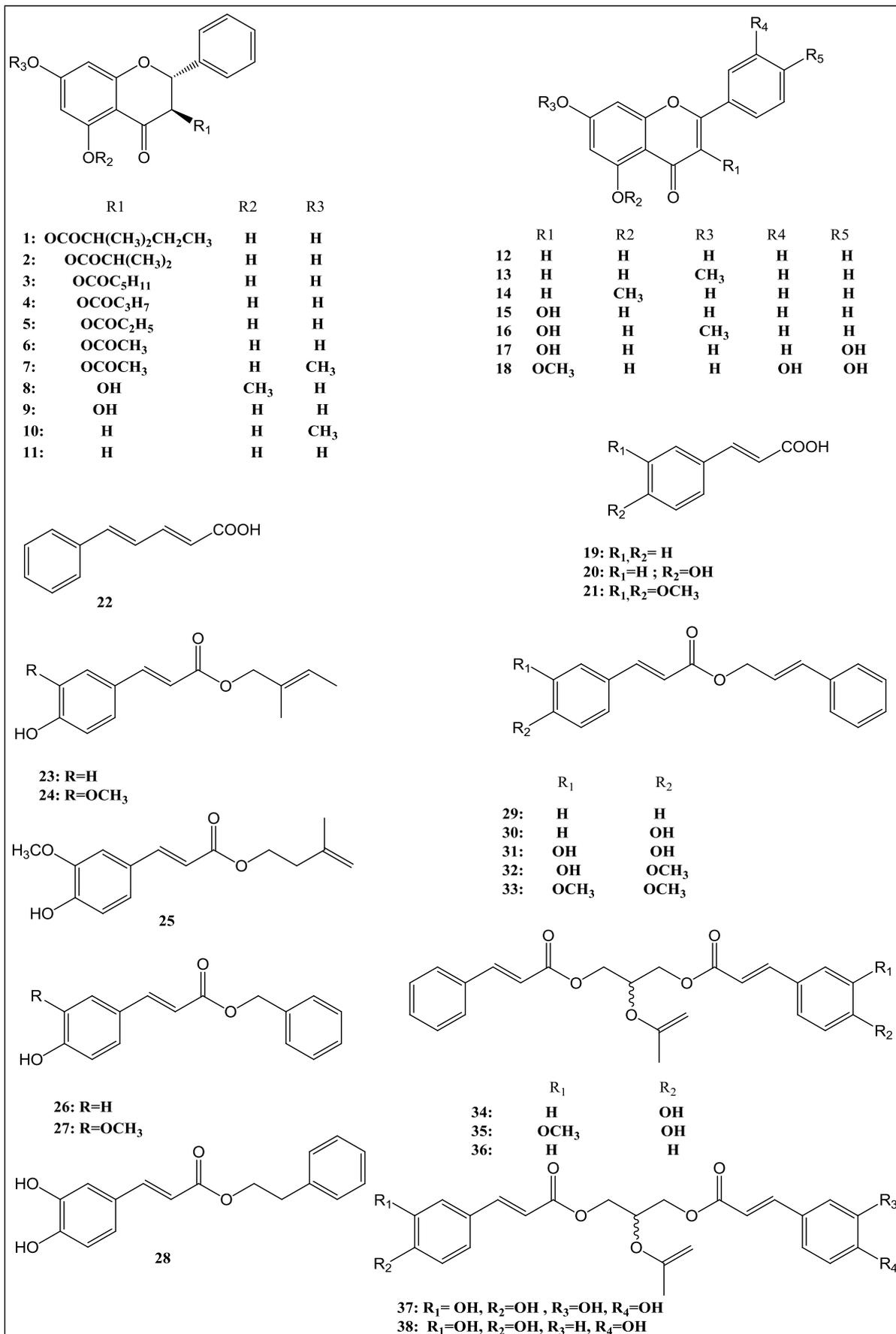


Figure (1) : principaux composés dans les différents échantillons de la propolis dans le monde.

**Tableau (3) : composition chimique des échantillons de la propolis du monde ( non volatile).**

Origine de la propolis	Méthodes d'analyse	Composés chimiques	Références
Portugal	LC-MS	1-33 ; dérivés glucuroniques de quercetine.	[27]
Uruguay	HPLC , RMN <sup>1</sup> H <sup>13</sup> C, IR.	1-33.	[28]
Chine	LC-MS, RMN <sup>1</sup> H <sup>13</sup> C.	8,11,19,20,21,34-38,(+)-2-acetyl-1-(E)-feruloyl-3-(E)-cinnamoylglycerol, 2-acetyl-1,3-diferuloylglycerol	[29]
Propolis rouge(Brésil)	ESI(+)-MS/MS	6-Acetyl-2,2-dimethyl-3-hydroxychroman ; 2-Hydroxy-4-methoxychalcon ; Liquiritigenin ; Formononetin ; Medicarpin ; Biochanin A ; Retusapurpurin B ; Hesperetin 7-rhamnoglucoside.	[30]
Corée du Sud	HPLC-MS , HPLC-PDA.	6 ,8,9,11-13,15,17,19-22,28,31	[31]
Grèce	GC-MS	Glycérole, acide malique, acide oléique, emodine, D-fructose, 4,6,9-12,15,17,19-21,27-29,31.	[23]

## 2. Composés volatiles :

Les éléments constitutifs volatils de la propolis jouent un rôle important en contribuant à son arôme agréable et son activité biologique, surtout l'activité antibactérienne [32]. Voici un tableau qui résume quelques substances volatiles de la propolis:

**Tableau (4) : quelques composés volatiles dans la propolis du monde.**

Origine	Composés volatiles	Référence
Grèce	trans-caryophyllène, géranyl d'acétone, caryophyllène, Aristolone, $\alpha$ -Amyrine, Thymol, Menthol,Thunbergol, Acide Pimarique, Totarol, Phytol,AcideDehydroabietique, acide Abiétique, acide Isopimarique	[23]
France	$\beta$ -eudesmol ,guaïol, benzoate de benzyle.	[32]
Brésil	longipinene, $\alpha$ -eudesmol, $\beta$ -eudesmol , $\beta$ -caryophyllene, $\alpha$ -pinene, $\beta$ -pinene.	
Chine	acide acétique, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-benzène, 1,2,3,4, 4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-diméthyl-2-(1-méthyléthényl)-naphthalène, alcool benzylique.	
Turkie	$\alpha$ -terpinene, $\alpha$ -terpineol, junipene, alcool cinnamique, $\beta$ -cariophyllène.	

### C. Etudes sur la propolis algérienne :

Il n'y a pas beaucoup d'études sur la propolis Algérienne, on retrouve quelques articles sur la composition chimique et l'activité biologique mais il n'existe pas d'études botaniques concernant la provenance de la propolis Algérienne.

#### 1. Etude chimique

Des composés polyphénols et terpènes sont identifiés dans la propolis du nord de l'Algérie avec principalement deux méthodes d'analyses : HPLC-MS/MS et RMN [33].

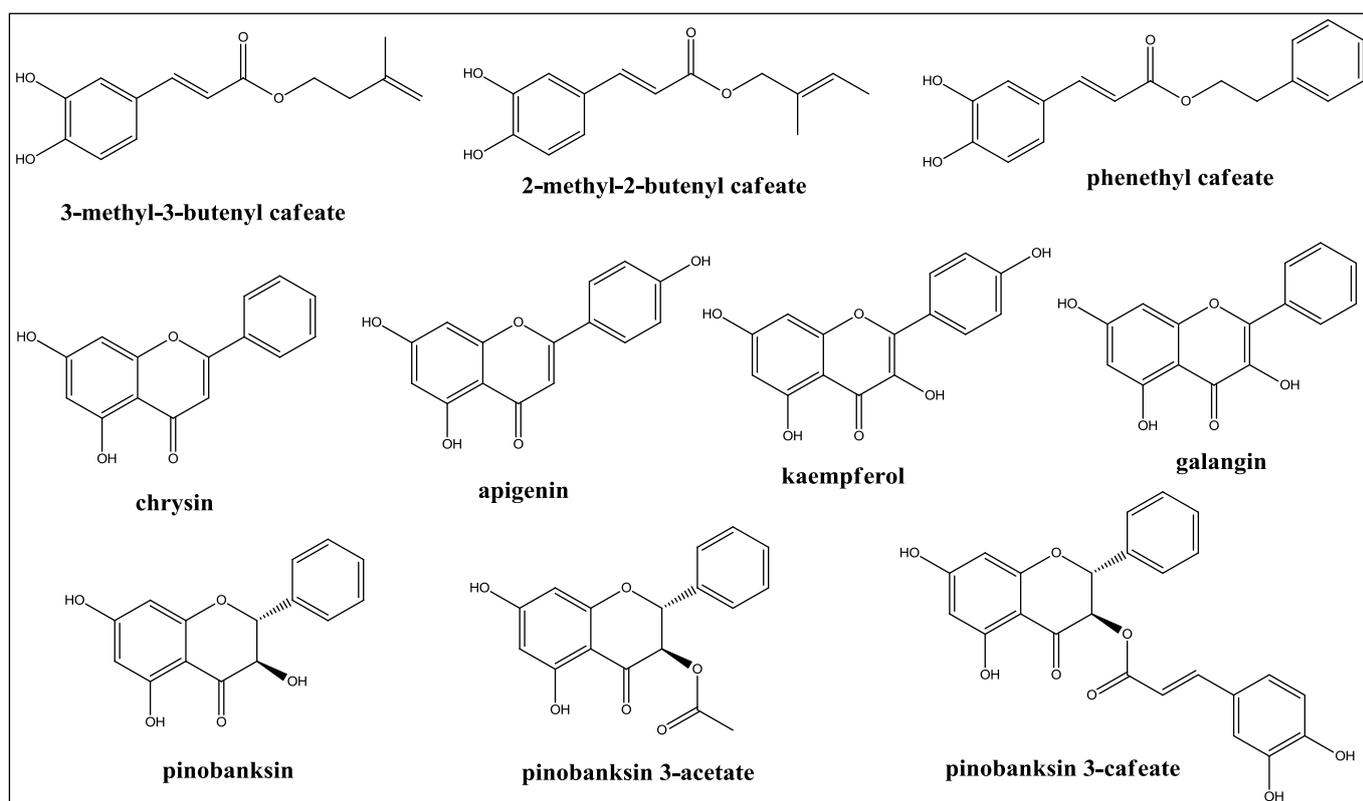


Figure (2) : Les principaux polyphénols détectés dans la propolis algérienne

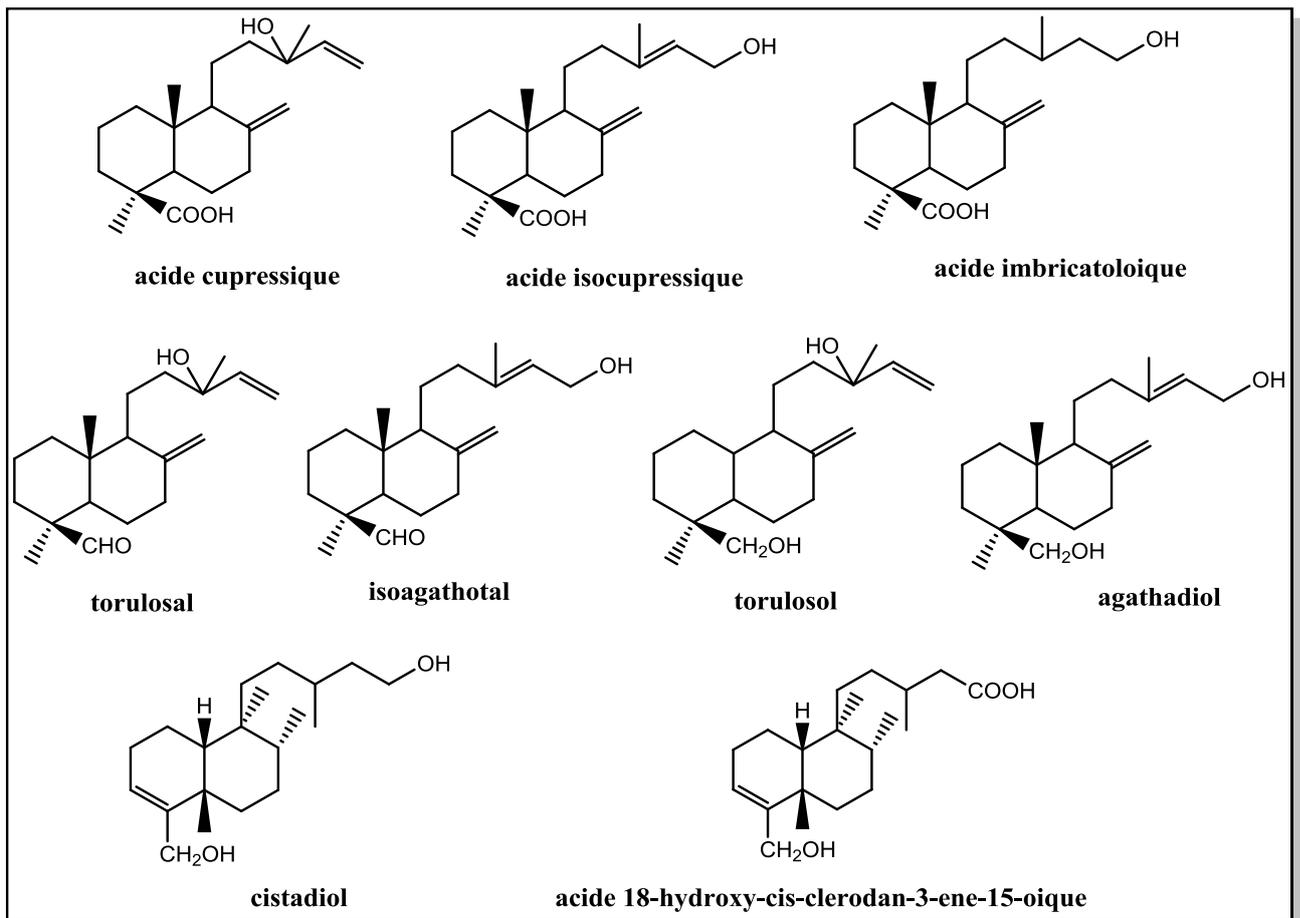


Figure (3) : Les principaux terpènes détectés dans la propolis algérienne

## 2. Etudes biologiques :

### Activité antimicrobienne :

Comme tous les autres types de la propolis du monde la propolis Algérienne possède une bonne activité antimicrobienne surtout contre les bactéries gram-positifs et moindre contre les gram-négatifs et cette activité est due principalement aux composés terpéniques.

Tableau (5) : activité antimicrobienne de la propolis algérienne.

microbes testés	Zone d'inhibition/ MIC (mg/ml)	Référence
<i>S. aureus</i>	16/0.80	[34]
<i>S. epidermidis</i>	15/0.96	
<i>P. aeruginosa</i>	12/1.75	
<i>E. cloacae</i>	12/1.78	
<i>K. pneumoniae</i>	15/0.98	
<i>E. coli</i>	16/0.74	
<i>S. mutans</i>	16/0.69	
<i>S. viridans</i>	17/0.65	
<i>C. albicans</i>	10/1.38	
<i>C. tropicalis</i>	11/1.47	
<i>C. glabrata</i>	12/1.54	

#### **IV. Conclusion général**

La propolis est une substance naturelle collante que les abeilles la produisent et qui est utilisée par eux essentiellement comme un moyen d'hygiène contre les différentes pathogènes, et les études scientifiques ont confirmés la présence d'une activité antibactérienne, antifongique et antivirale. La propolis a montré aussi d'autres activités comme antioxydante, antitumorale, anti-inflammatoire, et cicatrisante.

La composition chimique de la propolis diffère selon plusieurs facteurs, l'espèce d'abeille et la source des résines des plantes, ce qui influe les propriétés chimique, physique et biologique de différents échantillons de la propolis. Alors une standardisation concernant les effets biologiques ou la composition chimique de la propolis est impossibles et peu fiable.

## Partie expérimentale :

---

### I. Travail effectué :

#### Indications générales :

#### UV-Visible :

Les analyses UV, réalisées lors de cette étude ont été effectuées au laboratoire (COSNA) sur un spectrophotomètre Thermo-Scientific Helios  $\gamma$ .

#### Les CCM :

Chromatographie sur Couche Mince (CCM), réalisée sur des plaques d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254</sub>.

#### Expérience :

Notre étude expérimentale se tourne autour de cinq échantillons de la propolis algérienne, quatre échantillons de Tlemcen de différentes régions Sidi abdlli, Beni snous, Chouli et Chetouane et un échantillon de la ville de Chlef, qui va nous servir comme référence de comparaison.

Notre travail va se focaliser aux étapes suivantes :

- ✓ Macération des propolis dans l'éthanol.
- ✓ Déterminer le  $\lambda_{\max}$  de chaque extrait éthanolique.
- ✓ Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes dans chaque extrait éthanolique de la propolis (EEP).
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante des EEP par trois méthodes différentes.
- ✓ Evaluation de l'activité antimicrobienne de chaque EEP.
- ✓ Extraction et estérification des acides gras de la propolis.

Dans le but, d'évaluer l'effet de la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) sur les différents EEP, on a réalisé les mêmes processus pour les complexes d'inclusion CD+EEP comme pour les EEP seules.

### II. Matériels et méthodes :

#### A. Extraction de la propolis :

Les cinq échantillons de la propolis ont été extraits par macération pendant trois semaines dans l'éthanol, ensuite l'extrait est filtré sous vide et le solvant est évaporé par

évaporateur rotatif. L'extrait résultant était de couleur marron foncée pour EEP de Chlef, et de marron clair pour EEP des régions de Tlemcen et d'apparence liquide visqueuse.

## **B. Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale des EEP :**

On a mesuré l'absorbance des différents échantillons de la propolis dans le domaine de l'ultraviolet et les résultats sont représentés sous forme des graphes (**voir figure.5**). La longueur d'onde maximale d'absorption de la propolis se trouve dans le domaine de l'UV et elle est due principalement aux flavonoïdes et aux acides phénoliques [35].

## **C. Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des EEP :**

### **1. Quantité totale en polyphénols :**

La quantité totale en polyphénols est déterminée par la méthode de Kumazawa *et col* (2002) avec quelques modifications [36]. (0.5) ml de EEP est mélangé avec (0.5 ml) de réactif de Folin-Ciocalteu et (0.5 ml) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% et on ajoute 1 ml d'eau pour diluer le mélange. L'absorbance est mesurée à 760 nm après 1 h d'incubation à température ambiante et le blanc utilisé est le mélange réactionnel sans échantillon.

L'échantillon des propolis est évalué à une concentration finale de 40 µg/ml et la quantité en polyphénols est déterminée en mg/g (équivalent d'acide gallique).

### **2. Quantité totale en flavonoïdes :**

La quantité totale en flavonoïdes est estimée par un dosage colorimétrique en suivant la méthode de Woisky et Salatino (1998) avec une petite modification [37].

Au (0,5ml) d'EEP on ajoute 0,5ml d'une solution méthanolique de AlCl<sub>3</sub> 2% et 1,5ml de méthanol. Après 1 h d'incubation à température ambiante on mesure l'absorbance à 420 nm. La concentration finale d'EEP est de 200 µg/ml.

La quantité des flavonoïdes est déterminée comme équivalent de rutine mg/g à partir d'une courbe d'étalonnage.

## **D. Evaluation de l'activité antioxydante de chaque EEP :**

L'activité antioxydante des EEP exprimée par trois méthodes différentes pour trois aspects : la neutralisation des radicaux libres par la méthode DPPH, la puissance réductrice des ions Fe<sup>3+</sup> par la méthode FRAP et la diminution de l'auto-oxydation des acides gras insaturés par la méthode acide linoléique/β-carotène.

## 1. Activité antioxydante DPPH :

### a) Principe de la méthode :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha, \alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [38].

Dans le cas des composés phénoliques (Ar-OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors il se transforme en une molécule stable DPPHH [39].

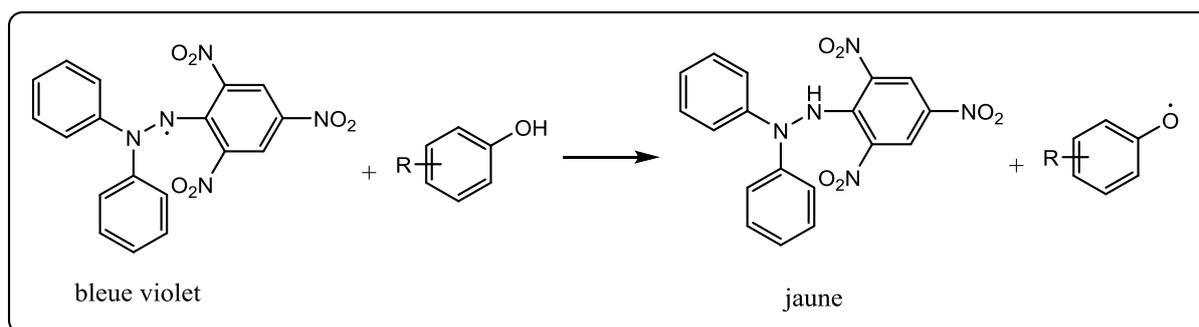


Figure (4) : mécanisme d'action de DPPH avec les polyphénols.

### b) Expérience :

Le mélange de réaction contient 2,5 ml de méthanol, 125  $\mu$ M DPPH, et les échantillons à tester. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été enregistrée à 517 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de diminution par rapport aux valeurs témoins [40].

Les EEP ont été évalués à la concentration finale de 400, 200, 100, 66.67 et 20  $\mu$ g/ml.

L'activité antioxydante est calculée par la relation suivante :

$$AA\% = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

## 2. Méthode FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) :

La puissance de réduction de la solution éthanolique de la propolis et le complexe CD+ propolis a été déterminée selon la méthode de Lugasi(2003) avec certaines modifications [41]. L'échantillon dilué 1mg/ml (1 ml) a été mélangé avec du tampon phosphate (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml ferricyanure de potassium 1% ; le mélange est incubé à 35°C pendant 20 min. L'acide trichloracétique (2,5 ml, 10 %) a été ajouté au mélange qui est ensuite centrifugé à 1500 t/min. Par la suite, (2.5 ml) de la solution a été mélangée avec de l'eau distillée (2,5 ml) et une solution fraîchement préparée de FeCl<sub>3</sub> (0,5 ml, 0,1 %).

L'absorbance a été lu à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique que la puissance de réduction est élevée. La puissance de réduction est donnée en équivalent de trolox (TEAC.  $g^{-1}$ ) qui indique la quantité de trolox exprimé en mg qui a le même pouvoir réducteur que celle de 1 g d'échantillon [42].

### **3. Activité antioxydante par l'oxydation de l'acide linoléique :**

Cette expérience a été réalisée par la méthode d'Emmons, Peterson et Paul (1999) avec quelques modifications [43]. Le  $\beta$ -carotène (3 mg) a été dissous dans 30 ml de chloroforme et 3 ml a été ajouté à 100  $\mu$ l d'acide linoléique et 1 ml de Tween 20. Le chloroforme a été retiré sous un flux d'azote gazeux. L'eau distillée (100 ml) a été ajoutée et bien mélangée. Une proportion (3 ml) de l'émulsion de l'acide linoléique/ $\beta$ - carotène était mélangée avec 200  $\mu$ l de solution d'EEP et incubées dans un bain d'eau à 40 °C. L'oxydation de l'émulsion a été suivie par spectrométrie en mesurant l'absorbance à 470 nm après une période de 60 minutes. L'échantillon de contrôle contenu 200  $\mu$ l de solvant à la place de l'extrait.

L'activité antioxydante est exprimée en % par rapport à l'inhibition de contrôle après 60 min d'incubation en utilisant l'équation suivante :  $AA = 100(RDC - DRS)/RDC$  où AA est l'activité antioxydante, la RDC est le taux de dégradation de contrôle ( $=\ln(a/b)/60$ ), les DRS est le taux de dégradation en présence de l'échantillon ( $=\ln(a/b)/60$ ), **a** est l'absorbance initiale au temps 0, et **b** est l'absorption à 60 min. les échantillons EEP ont été évalués à la concentration finale de 62,5  $\mu$ g/ml.

### **E. Evaluation de l'activité antimicrobienne des EEP :**

L'activité antimicrobienne de chaque extrait a été évaluée par la technique des disques en papier (Khanna et al., 2011) vis-à-vis 8 germes de références (2 bactéries à Gram positif, 3 bactéries à Gram négatif et 3 levures) [44].

#### **1. Préparation des suspensions des germes test :**

A partir des cultures de 18 à 24 heures de microorganismes test sur leurs milieux appropriés, des suspensions en eau physiologique stérile sont préparées. La densité optique de chaque suspension est ajustée entre 0,08 et 0,1 à la longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm pour les bactéries et entre 0,12 et 0,15 à la longueur d'onde  $\lambda = 530$  nm pour les levures (turbidité équivalente à 0,5 McFarland).

#### **2. Protocole de l'activité antimicrobienne par la technique des disques en papier :**

Des disques stériles de papier Wattman N° 3 (6 mm de diamètre) reçoivent 30  $\mu$ L de chaque extrait et des disques témoins reçoivent 30  $\mu$ L du solvant pure (DMSO) (par des

dépôts successifs de 10  $\mu\text{L}$  tout en évitant les débordements). Après leur séchage, les disques en papier sont déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés, Muller-Hinton (pour les bactéries) et PDA (pour les levures), préalablement ensemencés par écouvillonnage, selon la technique CLSI (2010), avec les suspensions des micro-organismes test. Les boîtes de pétri sont laissées pendant 2 heures à 4°C (pour une bonne diffusion de l'extrait), puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures.

## F. Extraction et estérification des acides gras de la propolis :

### 1. Extraction des acides gras de la propolis :

Les acides gras sont extraits de la propolis avec l'hexane à l'aide d'un montage à reflux avec le soxhlet [45]. L'opération est terminée quand on remarque la disparition de la couleur au cours d'un reflux d'environ 4 h, puis on évapore le solvant et on procède à la séparation des acides gras de l'extrait. Ceci est réalisé par le traitant en premier lieu avec une solution alcoolique basique KOH 2.25% dans l'éthanol. Le mélange est extrait avec de l'eau distillée, et on récupère la phase aqueuse qui est ensuite acidifiée et extraite avec de l'hexane.

Ce traitement nous permet d'éliminer les substances non acides qui sont insolubles dans l'eau mais peut entraîner des molécules indésirables comme les polyphénols.

### 2. Estérification des acides gras :

L'estérification des acides gras est faite en suivant la méthode de James (1959) avec certaines modifications [46].

On évapore l'hexane de la phase organique traitée et séchée et on réalise une réaction d'estérification avec le méthanol comme solvant et en milieu acide HCl 0.8N. La réaction se déroule dans un montage à reflux pendant 20 min après solubilisation totale, et le mélange est extrait avec un mélange eau-hexane, ensuite la phase organique est séchée et évaporée sous vide. Ce protocole donne que des esters méthyliques qui sont analysés par IR.

## III. Résultats et discussions :

### A. La longueur d'onde d'absorption maximale des EEPs:

Les longueurs d'ondes de l'absorption maximale pour ces échantillons sont :

**Tableau (6) : valeur des  $\lambda_{\text{max}}$  pour chaque EEP.**

Propolis	chetouane	Sidi abdlli	Chlef	Beni snous	Chouli
$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	290	289	279	290	283

La longueur d'onde maximale n'a pas de signification sur le plan caractérisation des différentes propolis mais en mesurant l'absorbance spécifique des EEP à cette longueur d'onde on obtient un paramètre physicochimique qui caractérise chaque propolis et peut nous renseigner sur sa composition chimique [18].

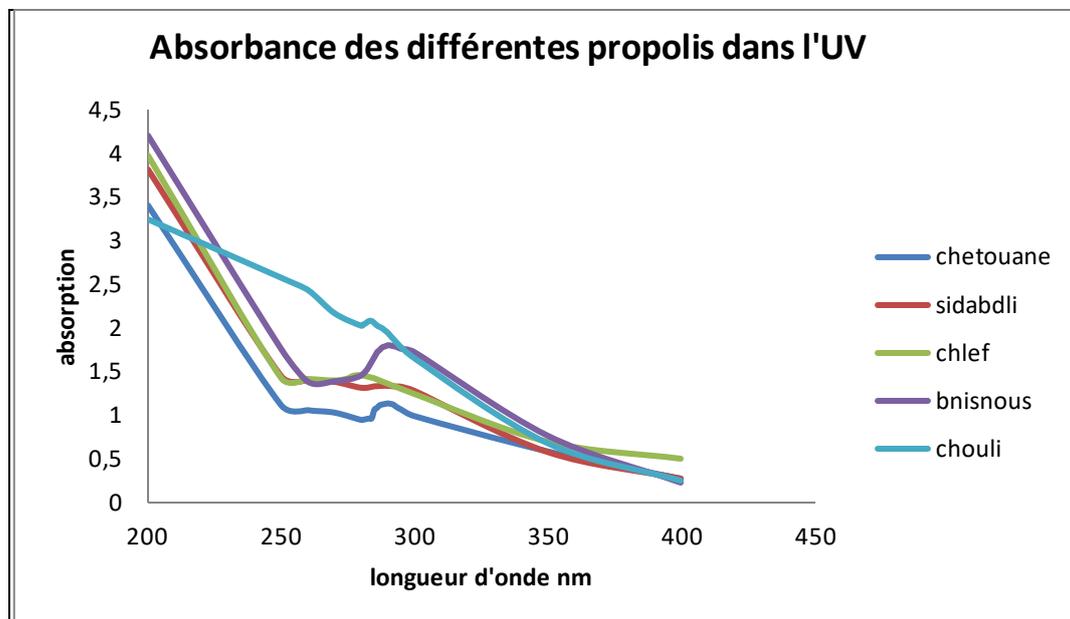


Figure (5): Spectre d'absorption UV des EEPs

- ❖ Pour la complexe CD + propolis il avait donné la même allure du graphe avec la même longueur d'onde maximale que la propolis seule. Ceci peut être expliqué, en premier lieu qu'il n'y a pas eu d'inclusion spécifique aux composés des EEPs des différents régions. Mai il est important à noter, que l'effet de la concentration n'a pas été étudié, généralement la complexation aura lieu à partir d'un ratio spécifique pour chaque type de molécule invitée.

## B. Quantité totale en polyphénols et flavonoïdes :

### 1. Quantité totale en polyphénols :

Après la mesure de l'absorbance de chaque EEP+FCR on a obtenu les résultats suivants :

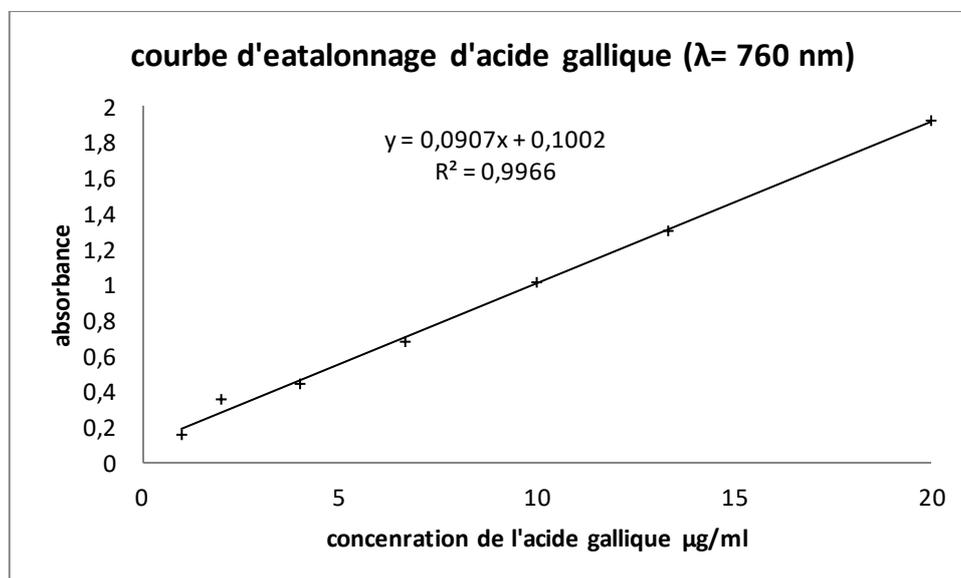
Tableau (7) : absorbance des EEP+ FCR.

propolis	chetouane	Sidi abdli	Chlef	Beni snous	Chouli
A	0,425	0,31	0,193	0,321	0,421

Nous avons préparé une série de solution d'acide gallique de différentes concentrations soumis aux analyses de leur absorbances. L'ensemble est regroupé dans le tableau suivant :

**Tableau (8) : Absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations :**

[a. gallique] µg/ml	20	13,33	10	6,67	4	2	1
A	1,922	1,302	1,013	0,679	0,442	0,355	0,156



**Figure (6) : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.**

A partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, on déduit la quantité en polyphénols.

**Tableau (9) : quantités en polyphénols des EEP en équivalent d'acide gallique.**

Propolis	chetouane	Sidi abdlli	Chlef	Beni snous	chouli
quantité en polyphénols mg/40 mg	3,58	2,31	1,02	2,43	3,54
quantité en polyphénols mg/g	89,53	57,83	25,58	60,86	88,42

## 2. Quantité totale en flavonoïdes :

L'absorbance des cinq échantillons est regroupé dans le tableau suivant :

**Tableau (10) : absorbance des EEP+AlCl<sub>3</sub>.**

Propolis	chetouane	Sidi abdlli	Chlef	Beni snous	Chouli
A	0,762	0,197	0,472	0,453	0,406

Afin d'établir notre courbe d'étalonnage, nous avons préparé une série de solution de la rutine à différente concentration et on a déterminé leur absorbance, les résultats sont comme suit :

**Tableau (11) : absorbances de la rutine à différentes concentrations**

[rutine] µg/ml	100	50	20	10	5	2
A	2,598	1,544	0,601	0,314	0,134	0,04

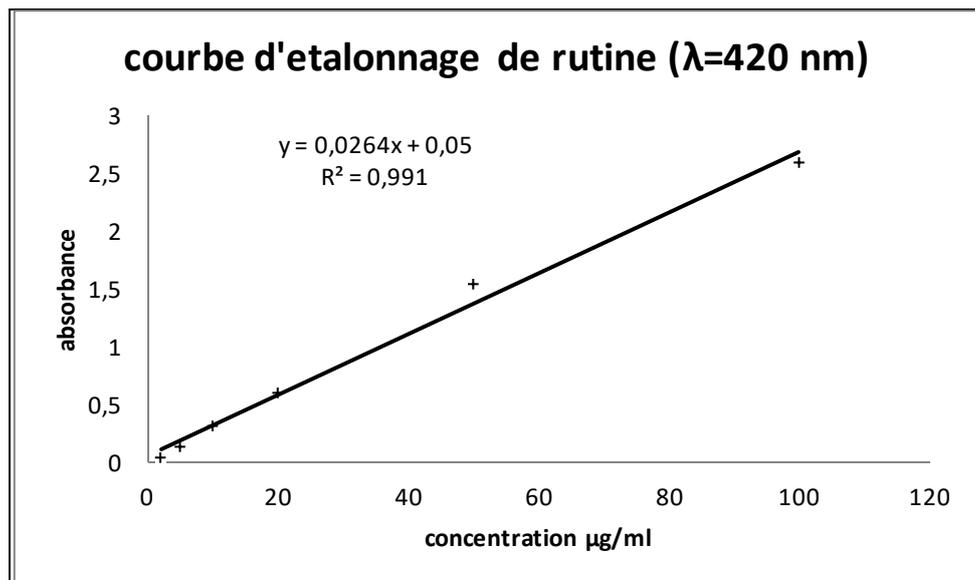


Figure (7) : Courbe d'étalonnage de la rutine.

D'après la courbe d'étalonnage on déduit la quantité des flavonoïdes dans chaque propolis en équivalent de rutine.

**Tableau (12) : quantité de flavonoïdes en équivalent de rutine pour chaque EEP.**

Propolis	chetouane	Sidi abdli	chlef	Beni snous	Chouli
quantité en flavonoïdes mg/g	134,8	27,8	79,9	76,3	67,4

### C. Evaluation de l'activité antioxydante :

#### 1. Activité antioxydante par DPPH :

La méthode de mesure de l'activité antioxydante DPPH, a donné les résultats suivants :

##### a) Pour les EPP seules :

**Tableau (13) : valeurs d'activité antioxydante DPPH pour les EEP seules.**

[EEP] $\mu\text{g/ml}$	400	200	100	66,67	20	Contrôle
A (chetouane)	0,085	0,093	0,12	0,212	0,536	0,738
A (sidiabdlli)	0,104	0,256	0,422	0,528	0,676	0,731
A (benisnous)	0,08	0,102	0,115	0,216	0,54	0,704
A (chouli)	0,096	0,145	0,225	0,347	0,568	0,692
A (chlef)	0,191	0,164	0,313	1,067	1,271	1,526
AA % (chetouane)	88,48	87,4	83,74	71,27	27,37	*
AA % (sidiabdlli)	85,77	64,98	42,27	27,77	7,52	*
AA % (benisnous)	88,64	85,51	83,66	69,32	23,3	*
AA % (chouli)	86,13	79,05	67,49	49,86	17,92	*
AA % (chlef)	87,48	89,25	79,49	30,08	16,71	*

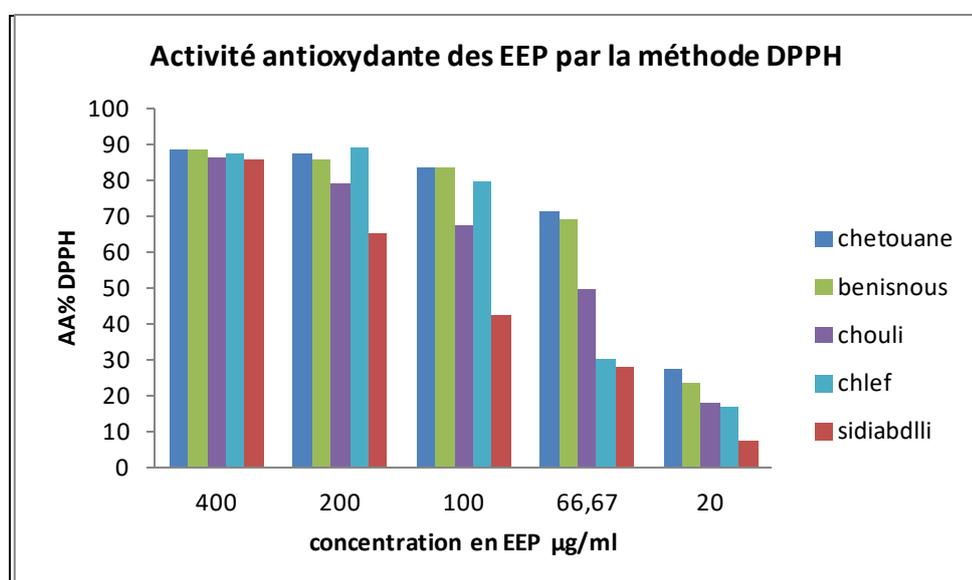
Et la concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50}$ ) pour chaque extrait est regroupée dans le tableau suivant :

**Tableau (14) : concentration inhibitrice médiane ( $IC_{50}$ ) pour chaque EEP.**

Propolis	chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	Chouli	Chlef
$IC_{50}$ $\mu\text{g/ml}$	35,6	142,7	50,8	70,1	72,7

L'activité antioxydante de la propolis dépend essentiellement de la quantité totales en flavonoïdes et polyphénols, et les résultats obtenus par notre étude confirme cette relation ; plus la quantité en polyphénols augmente plus l'activité antioxydante est élevée.

D'après nos résultats, l'EEP de Chetouane présente la plus grande quantité en polyphénols 134 mg et en flavonoïdes 89 mg, ce qui prouve bien la meilleure activité antioxydante obtenu.



**Figure (8): Histogramme de l'activité antioxydante par DPPH.**

**b) Pour le complexe CD+EEP :**

**Tableau (15) : absorbance et activité antioxydante par DPPH des EEP+CD.**

[EEP+CD] $\mu\text{g/ml}$	400	200	100	66,67	20	Contrôle
A (chetouane)	0,094	0,121	0,219	0,384	0,608	0,748
A (sidiabdlli)	0,246	0,313	0,497	0,587	0,701	0,735
A (benisnous)	0,103	0,195	0,287	0,468	0,609	0,709
A (chouli)	0,144	0,226	0,354	0,506	0,647	0,704
A (Chlef)	0,177	0,473	0,865	1,289	1,43	1,528
AA % (chetouane)	87,43	83,82	70,72	48,66	18,72	*
AA % (sidiabdlli)	66,53	57,41	32,38	20,14	4,63	*
AA % (benisnous)	85,47	72,5	59,52	33,99	14,1	*

AA % (chouli)	79,55	67,9	49,72	28,13	8,1	*
AA % (chlef)	88,42	69,04	43,39	15,64	6,41	*

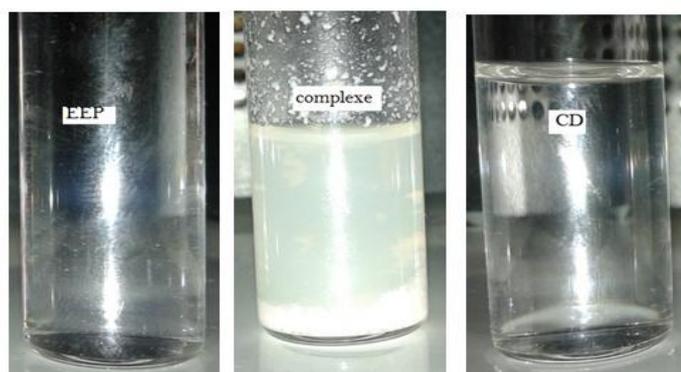
Les concentrations inhibitrices médianes pour chaque complexe CD+EEP sont comme suite:

**Tableau (16) : concentrations inhibitrices médianes pour chaque complexe CD+EEP.**

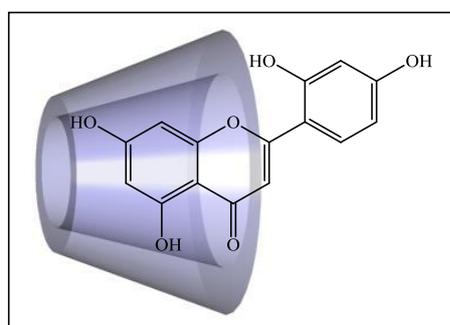
EEP+CD	chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	chouli	Chlef
IC <sub>50</sub> µg/ml	99	169	112	138	183

L'activité antioxydante de la complexe CD+EEP est plus faible que celle de l'EEP seule, et ça peut être expliqué par le faite que la cyclodextrine forme des complexes d'inclusion avec les entités réactives responsables de cette activité (flavonoïdes et polyphénols) [47].

Ce qui conduit, à leur élimination de la solution sous forme de précipité et c'est ce qu'on a remarqué lors de la formation du complexe (**voir figure.9**), donc on aura une diminution de l'activité antioxydante.



**Figure (9): Formation d'un précipité suite à la complexation des composés d'EEP avec la CD.**



**Schéma 1 : Proposition du processus de complexation.**

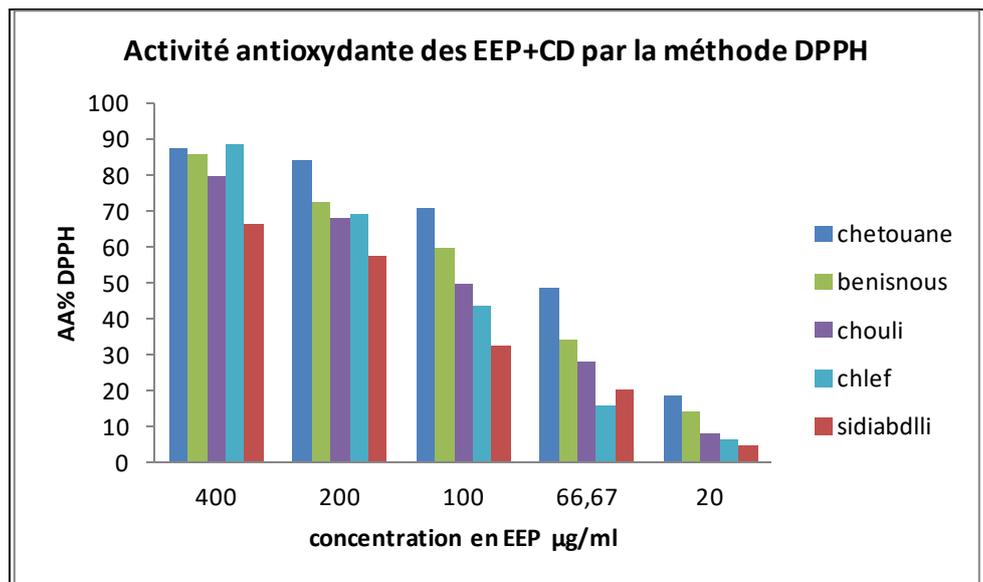


Figure (10) : AA des complexes EEP+CD par la méthode DPPH

## 2. Activité antioxydante par la méthode FRAP :

- On obtenus les résultats suivantes par cette méthode :

Tableau (17) : absorbance des EEP et des EEP+CD.

échantillon	chlef	chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	Chouli
A (propolis)	0,820	0,758	0,500	0,742	0,437
A (propolis + CD)	0,456	0,378	0,249	0,369	0,216

- La courbe d'étalonnage du trolox, présente les différentes solutions avec des concentrations de [0,5 -0,02] et leur absorbance. Le tous est regroupé ci après :

Tableau (18) : absorbance de trolox à différentes concentrations.

[trolox] mg/ml	0,5	0,25	0,1	0,08	0,04	0,02
absorbance	1,360	0,660	0,257	0,166	0,087	0,040

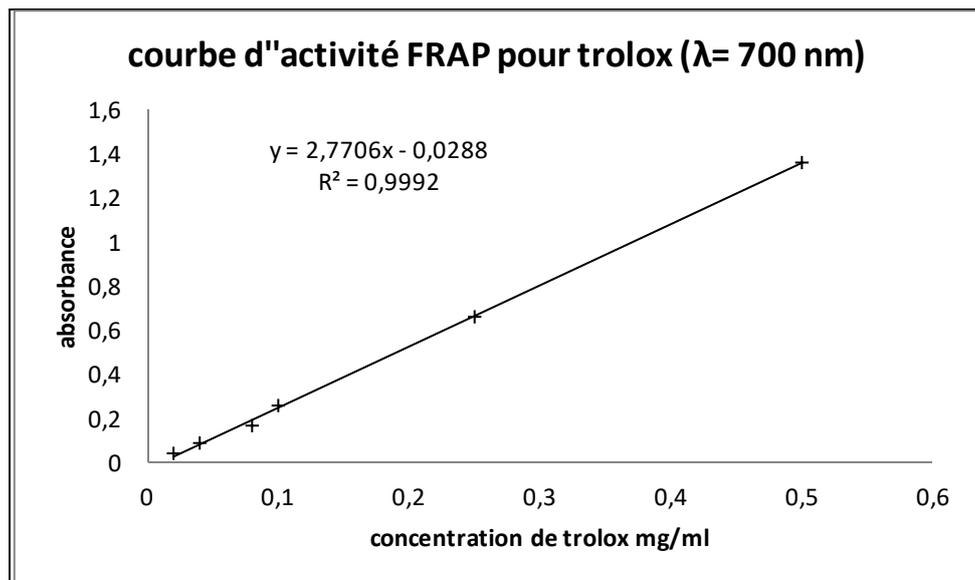


Figure (11) : Courbe d'étalonnage Trolox.

- D'après les valeurs de cette courbe d'étalonnage on a obtenu :

**Tableau (19) : capacité antioxydante en équivalent trolox mg/g.**

Echantillon	chlef	Chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	Chouli
TEAC <sub>propolis</sub> mg/g	306	284	191	278	168
TEAC <sub>propolis+CD</sub> mg/g	175	147	100	143	88

Cette méthode donne des résultats qui ne sont pas en corrélation totale avec la méthode de DPPH, car il ne prend pas en considération les mêmes paramètres et en plus cette méthode est connue comme étant moins précise que la DPPH ou l'oxydation de l'acide linoléique [48].

### 3. Activité antioxydante par la méthode d'oxydation de l'acide linoléique :

Pour cette méthode on a obtenu les résultats suivants :

**Tableau (20) : absorbance et activité antioxydante des EEP et des EEP+CD.**

EEP						
échantillon	Contrôle	chlef	chetouane	sidi abdli	beni snous	Chouli
A (0 min)	1,294	1,359	1,120	1,098	1,065	1,028
A (60 min)	0,847	1,155	0,995	0,879	0,902	0,851
AA %	*	61,6	72,1	47,5	60,8	55,4
EEP+CD						
A (0 min)	1,285	1,298	1,245	1,208	1,181	1,134
A (60 min)	0,836	0,998	0,965	0,879	0,892	0,84
AA %	*	38,9	40,7	26	34,7	30,2

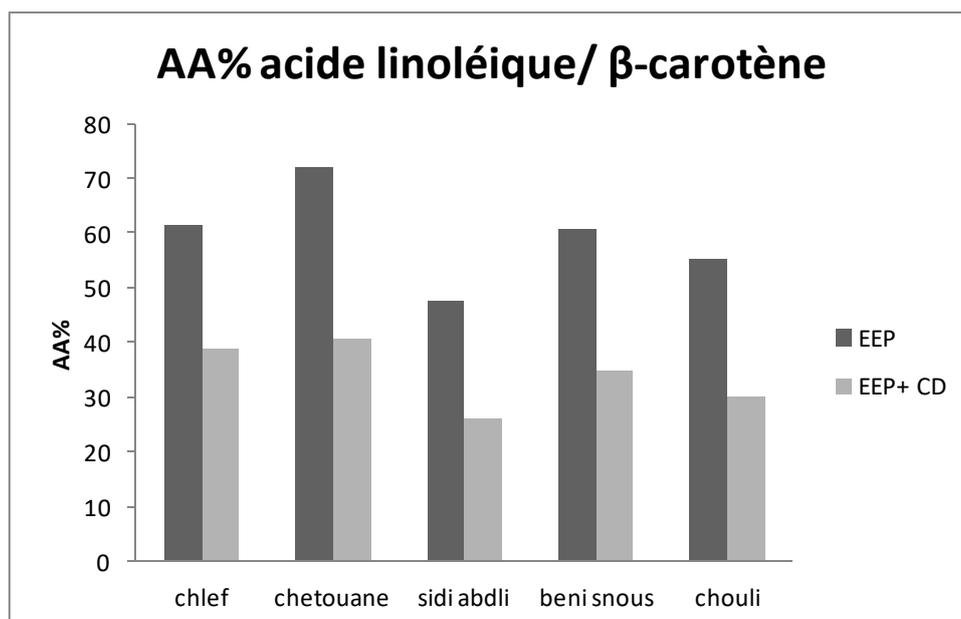


Figure (12) : activité antioxydante des EEP et EEP+CD par la méthode acide linoléique.

Pour les résultats de cette méthode ils sont en bonne corrélation avec les résultats obtenus par DPPH. Pour ça elles sont les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante d'un produit pur ou d'un mélange des produits qui ont une activité antioxydante.

Les meilleures activités sont obtenus, pour l'EEP de Chetouane, suivie par celle de Benisnousse et Chlef, ensuite Chouli et en final celle de Sidi abdeli.

A ce niveau, nous pouvons dire que la propolis de Chetouane est la meilleure par rapport aux autres étudiés. Il est nécessaire de déterminer la flore botanique de cette région, pour cela nous nous somme dirigé vers l'apiculteur ; qui d'après ces dires les ruches qui sont au niveau de Chetouane que leurs abeilles tombent rarement malade, présentent une bonne production au niveau du miel au niveau quantité et qualité, et que la mauvaise production se trouve au niveau de Sidi Abdli, ce qui est en accord avec nos résultats.

Mais, puisque nous disposons de la propolis issue de la même espèce d'abeille, la différence évidemment réside dans la flore botanique de chaque région. Avec des arbres de pistachiers, organiers et caroubier pour la région de Chetouane et essentiellement d'oliviers pour la région de Sidi Abedelli.

Tandis pour l'activité antioxydante pour les EEPs en présence de CD, abaissent nettement l'activité, qu'on peut expliquer par la complexation des molécules les plus actives. Ceci est un excellent résultat, c'est une méthode de séparation de certaines molécules, parmi tant d'autre compétitives, qui mérite une étude par RMN approfondie pour caractériser la structure de ces édifices, dont malheureusement nous n'avons pas eu l'opportunité de la réaliser, vue la non disponibilité de la RMN.

#### D. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'étude de l'activité antimicrobienne des EEP a révélé une activité très faible ou on peut dire qu'elle est inexistante en comparant avec les autres propolis citées précédemment dans la partie bibliographique (tableau 2) [20]. L'exception pour l'EEP de Chlef, qui présente la meilleure inhibition vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, cela due sûrement à sa composition chimique différente par rapport aux EEP de Tlemcen.

Quant à l'activité antifongique, tous les EEP présentent une faible inhibition vis-à-vis l'ensemble des *Candida albicans*.

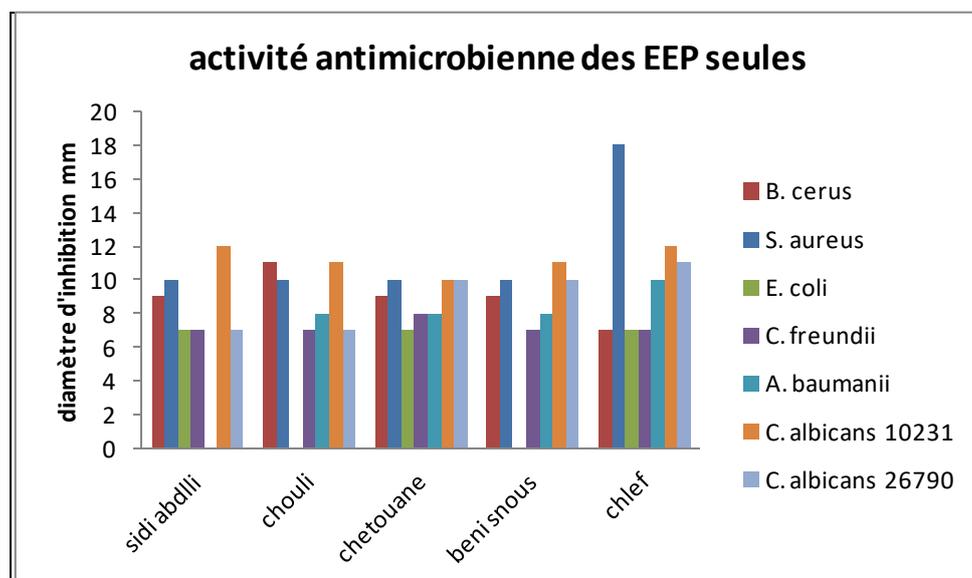
Les résultats pour les EEP seules sont regroupés dans le tableau suivant :

**Tableau (21): diamètre d'inhibition en mm des EEP.**

Extrait	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i> 444	<i>Candida albicans</i> 10231	<i>Candida albicans</i> 26790
1	09	10	07	07	-	-	12	07
2	11	10	-	07	08	-	11	07
3	09	10	07	08	08	-	10	10
4	09	10	-	07	08	-	11	10
5	07	18	07	07	10	-	12	11

1 : sidi abdlli 2,67mg/ml ; 2 : Chouli 3,4mg/ml ; 3 : Chetouane 2mg/ml ;

4 : Beni snous 2,2mg/ml ; 5 : Chlef 2,8mg/ml



**Figure (13) : activité antimicrobienne des EEP.**

Pour les propolis avec la CD on remarque qu'il n'ya pas une grande amélioration de l'activité de façon globale. Mais nous remarquons que le diamètre d'inhibition de l'EEP de

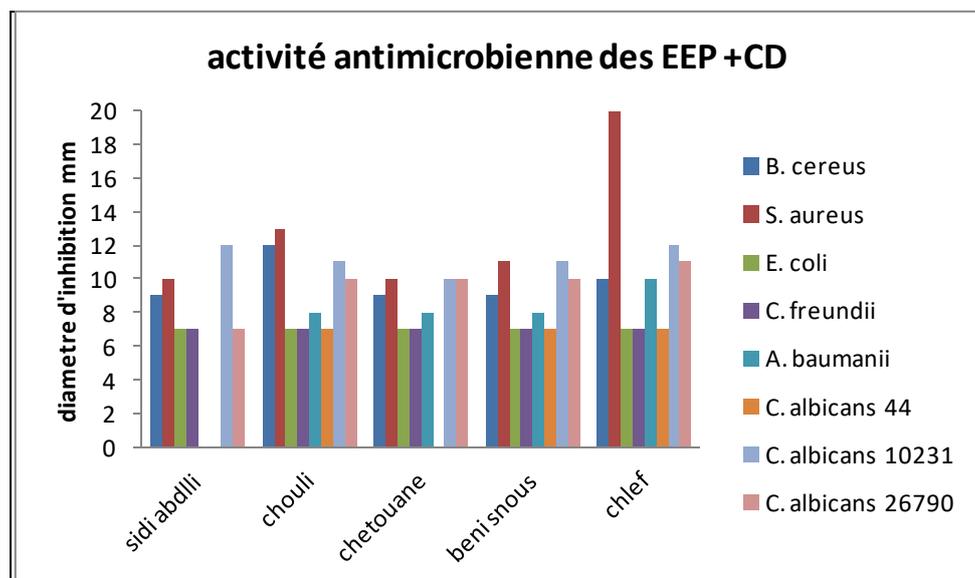
Chlef est le plus intense même en présence de la CD vis-à-vis *S.aureus*, cette dernière est connue pour sa résistance et son implication dans les infections nosocomiales. A ce niveau nous pouvons conclure, que l'apport de la cyclodextrine joue un rôle dans le mode d'action de L'EEP envers la bactérie *S.aureus*, que nous ne pouvons établir à notre niveau.

Un résultat surprenant, concernant l'activité antifongique envers *Candida albicans 444*, la cyclodextrine a amélioré l'activité car le diamètre d'inhibition a viré depuis 0 à 7, pour les EEP de Chouli, Beni snous et Chlef. Ce résultat, méritera une explication approfondie de ce qui a amplifié cette activité, sur le plan d'une étude par RMN du complexe formé entre EEP et la CD, mais aussi au niveau biologique le rôle de la CD à véhiculer un composé sélective, vue son caractère amphiphile.

Et pour la propolis avec la CD voici les résultats :

**Tableau (22) : diamètre d'inhibition en mm des EEP+CD.**

Extrait	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans 444</i>	<i>Candida albicans 10231</i>	<i>Candida albicans 26790</i>
1	09	10	07	07	-	-	12	07
2	12	13	07	07	08	07	11	10
3	09	10	07	07	08	-	10	10
4	09	11	07	07	08	07	11	10
5	10	20	07	07	10	07	12	11



**Figure (14) : activité antimicrobienne des EEP+CD.**

### E. Extraction et estérification des acides gras :

Après extraction et évaporation de solvant on a obtenu un extrait pâteux de couleur marron foncée pour tous les échantillons de la propolis. L'estérification de ces acides gras a donné un mélange des produits dont il contenait des esters qui sont analysés par spectroscopie IR et les résultats sont révèlent, une similitude pour les bandes caractéristiques des esters pour toutes les propolis, sauf celle de Sidi abdlli, qui présente en plus une bande vers les 1634, correspondante aux élongations des liaisons C=C.

**Tableau (23) : Analyse IR des esters méthyliques de la propolis des différentes régions.**

Esters	Chlef	Sidi abdlli	Chetouane	Chouli	Beni snous
Bandes caractéristiques $\text{cm}^{-1}$	CH (2917, 2849), C=O (1741)	CH (2920, 2850), C=O(1707), C=C (1634)	CH (2917, 2849), C=O (1736), C-O (1260)	CH (2921, 2850), C=O (1693),	CH (2917, 2849), C=O (1741),

Bien que IR, n'est pas la bonne méthode pour déterminer la composition de nos EEP, mais reste une méthode comparative fiable pour les groupes fonctionnels. D'après les bandes caractéristiques du tableau (24), on note qu'il y a une similitude dans la nature des groupes fonctionnels, à savoir le groupe hydroxyle, les doubles liaisons aromatique et les carbonyles.

**Tableau (24) : Analyse IR des EEP des différentes régions.**

EEP	Chlef	Sidi abdlli	Chetouane	Chouli
Bandes caractéristiques $\text{cm}^{-1}$	O-H (3384), CH (2925, 2851), C=O (1701) C=C (1607, 1454)	O-H (3381), CH (2925, 2852), C=O(1696), C=C (1632, 1514)	O-H (3333), CH (2925, 2852), C=O (1694), C=C (1696, 1514)	O-H (3362), CH (2924, 2852), C=O (1694), C=C (1634, 1513)

### F. Etude comparative des EEP et les esters méthyliques avec CCM :

L'étude des EEP et des esters méthyliques est effectué par CCM sur gel de silice en utilisant le système d'éluion (acétate d'éthyle : hexane) (8 :2) dans le but de comparer la composition chimique des cinq différentes échantillons et les résultats des Rf sont regroupés dans le tableau.

**Tableau (25): Valeur des Rf des différentes propolis.**

Echantillon	Chlef	Chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	Chouli
EEP	0.93, 0.85	0.93, 0.85, 0.69, 0.62	0.93, 0.85, 0.69, 0.62	0.93, 0.85, 0.62	0.93, 0.85
Esters Me	0.9	0.9	0.9, 0.57	0.9	0.9, 0.84, 0.78, 0.58

Pour les EEP ils contiennent les mêmes produits majoritaires pour les cinq échantillons ( $R_f = 0.93; 0.85$ ) ce qui confirme que la source de ses composés est la même pour tous les échantillons.

Pour les esters méthyliques, présente aussi le même produit majoritaire  $R_f = 0.9$  pour les cinq échantillons de la propolis.

Limité par le temps, nous n'avons pas pu faire une colonne pour l'isolement des ces composés.

#### G. Détermination de pH des EEP :

On a mit la propolis dans de l'eau distillée et on a chauffé pour solubiliser l'échantillon, et la valeur des pH est lue pour cette solution à l'aide d'un pH mètre.

**Tableau (26) : les pH des différents extraits éthanoïques de la propolis.**

Echantillon	Chlef	Chetouane	Sidi abdlli	Beni snous	Chouli
PH	6.9	6.89	6.9	6.9	6.9

#### **IV. Conclusion générale :**

En conclusion, nous avons contribué par ce modeste travail, à avoir un impact sur l'industrie de l'apiculteur qui nous a fait confiance, en déplaçant ces ruches de sidi abedelli à la région de Chetouane pour améliorer la multiplication des abeilles et la production du miel. Vue nos résultats qui sont en accord parfaitement avec les faits réelles.

La quantité en polyphénols et flavonoïdes est en relation avec l'activité antioxydante de la propolis et elle dépend de la source botanique de celle-ci. La propolis avec des quantités grandes en eux montrent une grande activité antioxydante et vice versa.

L'étude de l'activité antimicrobienne a montré une très faible activité pour les EEP de Tlemcen qui peut être expliqué par la faible constitution en huiles essentielles qui contribuent cette activité, mais ça reste à confirmer avec une étude approfondie de ces propolis. Ce n'est pas les mêmes résultats observés avec l'EEP de chlef, l'activité antimicrobienne est nettement meilleure.

Globalement l'activité antifongique est médiocre pour les différents EEP, par contre la complexation avec la CD a amplifié l'activité pour les EEP de trois régions.

La CD a amélioré moyennement, l'activité antibactérienne des EEP des différentes régions, mais surtout celle de chlef. Ceci nous ouvre plusieurs questions, dont on va continuer nos recherches pour y trouvez les bonnes réponses.

*Ce travail expérimental contient du n'importe quoi, que des mensonges, des tricheries et des discussions qui n'ont pas aucunes sens. J'ai fait ça pour faire plaisir à mon encadreur qui veut que tous soit parfait même si ce n'est pas la vérité.*

*Qui veut la vérité ne contacte car c'est que moi qui la sache.*

#### **Perspectives:**

Ceci n'est qu'une initiation d'un gros travail qui reste à faire ; nous projetons dans le futur proche, vers une étude détaillée de la composition chimique de la propolis, en utilisant les différentes méthodes d'analyse : RMN 1D et 2 D, CPG...etc

Comme notre objectif ultime est l'isolation d'un produit et faire de l'hémisynthèse, une purification des différents extraits est primordiale à l'identification complète de la composition chimique.

D'autre part, l'utilisation de la CD à isoler un produit de l'EEP, reste à achever en présence de l'analyse adéquate.

Les résultats obtenus avec la CD, nous mène à utiliser d'autres types de CD sélectivement modifiée (CD amphiphiles – peptidoCD - lipidoCD) au sein de l'équipe de synthèse de notre laboratoire, et à y déterminer leur apport et étudier leur interaction.

Nous projetons aussi, vers une étude comparative sur le plan chimique et biologique entre le miel et la propolis de chaque région.



## Références :

- [1] M. Marcucci, "Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity," *Apidologie*, **1995**; 26(2), 83–99.
- [2] V. S. Bankova, S. L. de Castro, and M. C. Marcucci, "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*; **2000**; 31(1),3–15..
- [3] E. L. Ghisalberti ; "Propolis: a review," *Bee World* ; **1979**; 60; 59–84.
- [4] W. Greenaway, T. Scasbroock, and F. R.Whatley ; "The composition and plant origins of propolis. A report of work at Oxford," ;*Bee World* ; **1990**; 71 ; 107–118.
- [5] V. S. Bankova, S. L. De Castro, and M. C. Marcucci ; "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie* ; **2000** ; 31(1); 3–15.
- [6] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, and S. Popov ; "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin," *Journal of Ethnopharmacology* ; **1999** ; 64(3); 235–240.
- [7] T. Urushisaki, T. Takemura, S. Tazawa et al ; "Caffeoylquinicacidsaremajor constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract ;" *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ; **2011** ; 7 pages.
- [8] M. D. Simone-Finstromand M. Spivak ; "Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees?" ;*PLoS ONE* ; **2012**; 7 pages.
- [9] K. Ghedira, P. Goetz, R. Le Jeune ;" Propolis", *Phytotherapie* ; **2009** ; 7 ; 100–105.
- [10] L. AlMsrghitaş, D. S. Dezmirean, and O. Bobiş ; "Important Developments in Romanian Propolis Research " *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ; **2013** ; 9 pages.
- [11] V.Bankova,A.Dyulgerov,S.Popovetal., "Propolis produced in Bulgaria and Mongolia :phenolic compounds and plant origin," *Apidologie*, **1992**; 23(1); 79–85.
- [12] E. Nagy, V. Papay, G. Litkei, and Z. Dinya, "Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoids components of propolis andPopuli gemma by GC/MS method," in *Flavonoids and Bioflavonoids* ; **1985**; 233-240
- [13] V.Bankova, M.Popova, S.Bogdanov, and A.Sabatini, "Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results," *Zeitschrift fürNaturforschungC*, **2002**; 57(6); 530–533.
- [14] M.C.Marcucciand V.Bankova, "Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis," *Current TopicsinPhytochemistry*, **1999**; 2 ; 115–123

- [15] B. Trusheva, M. Popova, H. Naydenski, I. Tsvetkova, J. G. Rodriguez, and V. Bankova, "New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis," *Fitoterapia*, **2004** ; 75( 7-8) ; 683–689
- [16] R. Christov, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, and M. Bertrand , "Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin," *Nat. Prod. Res*, **2006** ; 75( 7-8) ; 531–536.
- [17] M. S. Finstrom<sup>1</sup>, M. Spivak ; "Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees", *Apidologie* ; **2010** ; 41; 295–311.
- [18] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama ; "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins", *Food Chemistry* ; vol 84 ; **2004**; 84; 329–339.
- [19] R. Yamauchi, K. Kato, S. Oida, J. Kanaeda, & Y. Ueno ; "Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*; **1992** ; 56; 1321–1322.
- [20] V. Seidel, E. Peyfoon, D. G. Watson and J. Fearnley ; "Comparative Study of the Antibacterial Activity of Propolis from Different Geographical and Climatic Zones ", *J. Phytother. Res*; **2008**; 22; 1256–1263.
- [21] J. M. Sforcin ; "Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis", *J. Phytother. Res*; **2016**; 30; 894–905.
- [22] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Yu. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov ; "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin", *Journal of Ethnopharmacology* ; **1999** ; 64 ; 235–240.
- [23] N. Kalogeropoulos, S. J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinos, V. T. Karathanos ; "Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus", *Food Chemistry*; **2009** ; 116; 452–461.
- [24] V. Benkovic et al ; "Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice", *Biomedicine & Pharmacotherapy*; **2007** ; 61; 292–297.
- [25] A. H. Banskota, Y. Tezuka, I. K. Adnyana, E. Ishii, K. Midorikawa, K. Matsushige<sup>1</sup> and S. Kadota ; "Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis", *Phytomedicine* ; **2001** ; 8(1); 16–23.
- [26] G. Fischer and all ; "Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5", *Vet. Immunol. Immunopathol* ; **2007** ; 6 pages.

- [27] S. I. Falcão, N. Vale, P. Gomes, M. R. M. Domingues, C. Freire, S. M. Cardoso and M. Vilas-Boas; "Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides", *Phytochem. Anal.*; **2013**; *24*; 309–318.
- [28] S. Kumazawa, K. Hayashi, K. Kajiya, T. Ishii, T. Hamasaka, T. Nakayama; "Studies of the Constituents of Uruguayan Propolis", *J. Agric. Food Chem.*; **2002**; *50*; 4777–4782.
- [29] H. Shi, H. Yang, X. Zhang, Y. Sheng, H. Huang, and L. Yu; "Isolation and Characterization of Five Glycerol Esters from Wuhan Propolis and Their Potential Anti-Inflammatory Properties", *J. Agric. Food Chem.*; **2012**; *60*; 10041–10047.
- [30] C. O. S. Frozza, C. S. C. Garcia, G. Gambato, M. D. O. Souza, M. Salvador, S. Moura, F. F. Padilha, F. K. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, O. A. Dellagostin, J. A. P. Henriques, M. Roesch-Ely; "Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis"; *Food and Chemical Toxicology*; **2013**; *52*; 137–142.
- [31] M-R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.S. Bang, and T. Nakaya; "Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea", *J. Agric. Food Chem.*; **2004**; *52*; 7286–7292.
- [32] V. Bankova, M. Popova and B. Trusheva; "Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review", *Chemistry Central Journal*; **2014**; 8-28.
- [33] A. L. Piccinelli, T. Mencherini, R. Celano, Z. Mouhoubi, A. Tamendjari, R. P. Aquino and L. Rastrell; "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis", *J. Agric. Food Chem.*; **2013**; *61*; 5080–5088.
- [34] K. Graikou, M. Popova, O. Gortzi, V. Bankova, I. Chinou; "Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?", *LWT - Food Science and Technology*; **2016**; *65*; 261-267.
- [35] H. Myataka and al; "Evaluation of Propolis (II) : Effects of Brazilian and Chinese Propolis on Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cells Induced by Compound 48/80 and Concanavalin A"; *biological and pharmaceutical bulletin*, **1998**, *21*, 723-727.
- [36] S. Kumazawa Nakayama and al; "Studies of the constituents of Uruguayan propolis"; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, *50*; 4777–4782.
- [37] R. G. Woisky, A. Salatino; "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control"; *Journal of Apicultural Research*; **1998**; *37*; 99–105.
- [38] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset; "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity"; *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*; **1995**; *28*; 25-30.

[39] C. Sanchez-Moreno, A. Larrauri Jose, F. Saura-Calixto; ‘‘A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols’’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **1998**; 76 (2); 270-276.

[40] H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama & H. Taniguchi ; ‘‘Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds’’ *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; **2002** ; 50 ; 2161– 2168.

[41] A. Lugasi ‘‘The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases’’, *Acta Biologica Szegediensis* , **2003**, 47, 119-125.

[42] K. I. Berker and al ; ‘‘Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents’’, *Talanta* ; **2007** ; 72 ; 1157–1165.

[43] C.L Emmons, D.M Peterson, & G.L Paul ; ‘‘Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants’’ ; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ; 1999, 47 ; 4894–4898.

[44] M .Khanna and al ; ‘‘Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds’’ *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* ; **2011** ; 2(3) ; 357-375.

[45] J.M. Luque-Rodríguez , M.D. Luque de Castro, P. Pérez-Juan ; ‘‘ Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane’’ *talanta* ; **2005** ; 5 pages

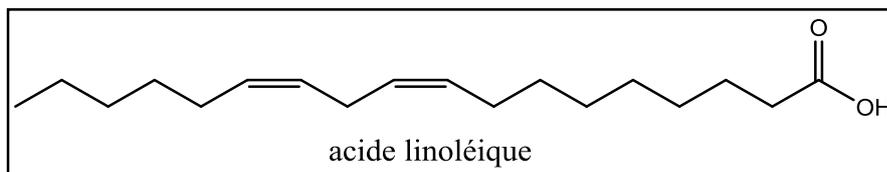
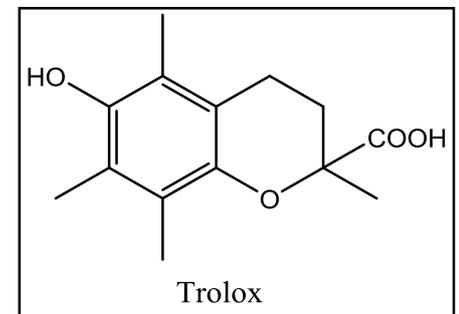
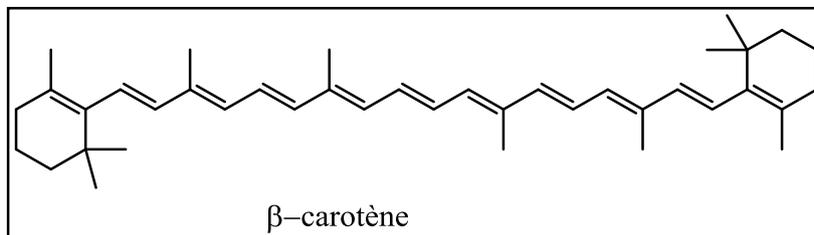
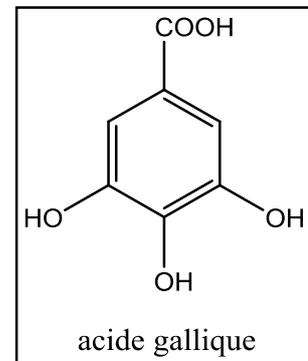
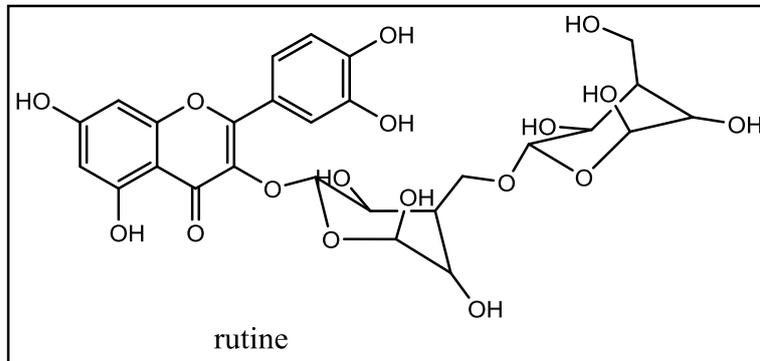
[46] A. T. JAMES; ‘‘ determination of the degree of unsaturation of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography’’, *journal of chromatography*; **1959** ; 2; 552-561.

[47] A. mohamed and al ; ‘‘cyclodextrin-enclosed substances of brasilian propolis’’, *Chem. Pharm. Bull*; **2003**; 51(8); 984-985.

[48] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby and al ; ‘‘ Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts’’, *Journal of Food Composition and Analysis* ; **2006** ; 19 ; 669–675.

## Annexes :

### Annexe 1 : Les réactifs utilisés :



Annexe 2 : Activité antimicrobienne et antifongique :(boîtes pétries)

