



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

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEN
MÉMOIRE



Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : **CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Par :

M^{lle} BOUZID DOUAA

Sur le thème

ETUDE PAR RMN DE LA PROPOLIS ALGERIENNE ET DE SES COMPLEXES D'INCLUSION AVEC LA CYCLODEXTRINE

Soutenu publiquement le 25 juin 2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr. SELLES CHAOUKI	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr. BOUFELDJA TABTI	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Dr. KENICHE ASSIA	Maître de conférences B	Centre Universitaire de Maghnia	Encadrante

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)
Tlemcen- Algérie
ANNÉE 2018 – 2019

DÉDICACE

Je dédié affectueusement ce mémoire :

A mes très chers parents avec toutes mes reconnaissances.

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que
j'atteigne ce niveau.*

A mon cher papa qui a su se montrer patient et courageux.

*A mon encadreur M^{me} Keniche Assia pour son aide précieuse et ses conseils
éclairés dans la direction de mon travail et qui n'a jamais cessé de me
soutenir et de m'encourager.*

A m'adorable Sœur Radjaa.

A tous mes amis qui m'encourager à poursuivre ce mémoire.

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, la patience et la volonté d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier nos parents qui par leurs prières et leurs encouragements .On a pu surmonter tous les obstacles.

Nous tenons tout d'abord à exprimer nos chaleureux remerciements à M^{me} ASSIA KENICHE pour l'encadrement et ainsi le temps qu'elle a partagé avec nous, ses conseils et ses encouragements durant la période de notre projet. Cela m'a permis de développer une véritable autonomie dans la recherche au laboratoire. Merci une autre fois !

Je remercie professeur JOSEPH KAJIMA MULENGI pour la formation solide qui nous a inculquer.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur en acceptant de juger mon travail :

J'exprime ma reconnaissance au Pr. CHAOUKI SELLES chef département de chimie de l'université de Tlemcen, d'avoir honoré ce travail en acceptant de le présider. Aussi, un remerciement assez spécial au Pr.CHAOUKI SELLES pour l'agréable sortie scientifique pour participer à la journée mondiale de l'eau le 8 Mai 2018 au centre universitaire de Maghnia, Tlemcen.

Je voudrais également remercier Pr. BOUFELDJA.TABTI d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier tous mes collègues de laboratoire du COSNA Sarra. Jasmine. Amina pour leurs participations et leurs aides.

Je remercié également les deux doctorantes Dr. Benyamina Samia, Dr .Imene .Mami pour leur aide.

D'autres personnes en dehors du laboratoire, je remercié également Dr. Bellifa Samia de m'avoir réalisé les tests de l'activité antibactérienne.

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Absorbance UV.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CD : cyclodextrine

EEP : Extrait éthanolique de propolis.

GC : chromatographie gazeuse

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

UV : ultraviolet.

β-CD : la cyclodextrine

PC : propolis commerciale.

P.E : propolis éthanolique

RMN : résonance magnétique nucléaire.

LC –MS : chromatographie liquide couplé avec spectrométrie de masse

PC- CD : propolis commerciale + β cyclodextrine

AlCl₃, H₂O : Chloraluminite (hydrate).

Al³⁺ : les ions aluminium.

Ar-OH : phénols

Abs : absorbance.

ACOET : acétate d'éthyle.

CHCl₂ : dichlorométhane.

EAG : extrait acide gallique

ABSTRACT:

Propolis is a sticky, resinous natural substance harvested by worker bees. Its chemical composition depends on the harvesting area (botanical source) which reflects the difference in their therapeutic activity. The literature is poor, concerning the study of the chemical composition of Algerian propolis. This led us to take an interest in an NMR study to determine the characteristic compounds of Algerian propolis. Then we are interested, in the following to study the stability of β -cyclodextrin inclusion complexes with propolis.

Keywords: propolis, cyclodextrin, inclusion Complex, NMR Spectroscopy.

RESUME :

La propolis est une substance naturelle récoltée par les abeilles ouvrières. Sa composition chimique est variée dépend de la zone de récolte (source botanique) ce qui reflète la différence de leur activité thérapeutique. La littérature est pauvre, concernant l'étude de la composition chimique de la propolis Algérienne. Ceci nous amène à s'intéresser à une étude par RMN- ^1H afin de déterminer les composés caractéristiques de la propolis Algérienne. Puis nous sommes intéressés, dans la suite D'étudier la stabilité des complexes d'inclusion B-cyclodextrine avec la propolis.

Mots clés : propolis, cyclodextrine, complexe d'inclusion, spectroscopie ^1H -RMN.

ملخص :

العكبر هي مادة طبيعية لزجة وراثنجية تحصدتها النحل العامل. يعتمد تركيبها الكيميائي على منطقة الحصاد (المصدر النباتي) الذي يعكس الفرق في نشاطها العلاجي. الأعمال العلمية قليلة فيما يتعلق بدراسة التركيب الكيميائي للعكبر الجزائري. فادنا هذا إلى الاهتمام بدراسة الرنين المغناطيسي النووي لتحديد المركبات المميزة للعكبر الجزائري. ثم قمنا في ما يلي بدراسة استقرار مركبات إدراج بيتا-سيكلوديكسترين مع العكبر.

الكلمات المفتاحية: العكبر، سيكلوديكسترين، مركبات الإدراج، الرنين المغناطيسي.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	01
1. Définition de propolis	01
2. Problématique	01
3. Objectifs :	02
Chapitre 1 : L'étude par ¹H-RMN la composition Chimique de la propolis	02
I. La composition de la propolis :	03
Etude de la Propolis Algérienne	03
III.1. Propolis de la région de l'est de l'Algérie (Sétif)	03
III.2. Propolis d'une autre location de l'est de l'Algérie (Djijel)	04
III.4. Propolis Saharienne située en Sud de l'Algérie (Ain Oussara)	08
IV. Exemple d'étude de la Propolis du Reste du Monde	11
Chapitre 2 : Etude de l'inclusion de l'extrait de la propolis avec le β-cyclodextrine	13
I. Propriétés pharmacologiques de la propolis	13
II. Inclusion de la propolis avec la β -cyclodextrine	13
III. Formation de nanoparticule de Propolis de la Roumanie avec β -CD pour améliorer l'extraction	13
II.2. Préparation de complexes d'inclusion Propolis « PE » de la Grèce /CD	13
2. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des composés de la propolis	14
Conclusion chapitre 2	15
Partie expérimentale	
III. Travail effectué	16
IV. Objectifs à réaliser :	16
V. Matériels et méthodes :	17
III-1- Récolte et origine	17
2. L'extraction et préparation des extraits bruts de la propolis	17
2.3 Etude de complexe d'inclusion Propolis et CD	18
2.4 Préparation des complexes d'inclusions	18
3. Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des extraits de propolis PC et PC-CD	18
3. Evaluation de l'activité antioxydante DPPH de PC et PC-CD:	209
4. Séparation chromatographique par CCM	21
5. La séparation des composés de la propolis par la chromatographie sur colonne	21
6. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la PC	21
VI Résultats et discussions	20
1. Etude par RMN des extraits de propolis :	22
2. Etude par LC-MS l'extrait de propolis de la région de Chetouane (Tlemcen)	23
3. Discussion des rendements selon les différentes méthodes d'extraction	23
4. Les fractions récupérées de chaque propolis	23
5. Quantité totale en polyphénols :	25
6. Quantité totale en ... flavonoïdes	24
7. Evaluation de l'activité antioxydante de chaque (PC-CD) et PC	24
8. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la PC	25
9. Est-ce que le complexe d'inclusion propolis avec β -cyclodextrine est-il formé ?	25
Conclusion Générale	26

Partie bibliographique

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Définition de propolis: La propolis est une matière botanique lipophile extrêmement complexe, elle est fabriquée par les abeilles à partir de leurs sécrétions en utilisant, par exemple, l' β -glucosidase¹, et d'autres substances, d'origines résineuses. Depuis les temps les plus anciens la propolis était moins connue que le miel, issue d'un mot grec pro=défense et polis=cité², elle est utilisée en médecine depuis des siècles par les romains et grecs.



Figure 1 : Les abeilles colmatent le trou dans la ruche avec la propolis ; Méthode de récolte de la propolis par l'apiculteur.

Elles recueillent sur certains bourgeons des arbres, des palmiers, pins, et les plantes. La présence de chaque essence dépend étroitement de la saison, de la géographie, du climat et de l'espèce d'abeilles récoltantes².



Figure 2 : La propolis de couleur différentes.

2. Problématique :

Dans l'industrie pharmaceutique, il existe une panoplie de médicaments, qui s'attaquent à un groupe de bactéries, ou sur les virus et les champignons. Leur utilisation répétée et exagérée a créé une sorte de résistance. La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus grandes menaces pesant sur la santé mondiale, ce qui nous a incités en tant que chimiste à rechercher et à découvrir de nouvelles molécules bioactives de source naturelle.

¹ M. Marcucci, "Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity," *Apidology*, **1995**, 26, 83-99.

² Lotti, C., C. M. Fernandez, A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. Márquez Hernández, L. and Rastrelli. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem.*, 2010, 58, 2209-2213.

3. Objectifs :

Notre objectif , est l'étude des substances actives de la propolis de plusieurs régions de l'Algérie comme suit :

- Etude par RMN et LC-MS la composition chimique de la propolis algérienne de plusieurs régions.
- Purification et isolation des composés majoritaires.
- Etude des complexes d'inclusion de la propolis avec la β -cyclodextrine β -CD.

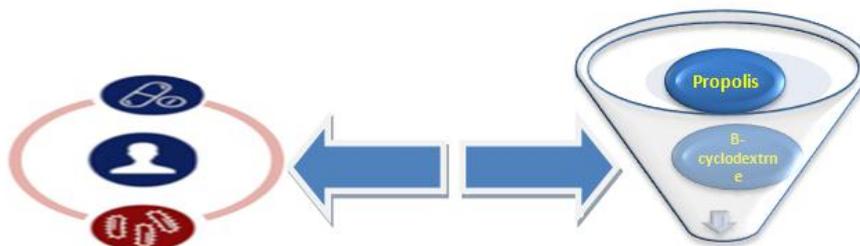


Figure 3 : Modèle de Complexe d'inclusion cible.

Le plan de ce mémoire s'articule autour de deux grandes parties, dont la première est une synthèse bibliographique, tandis que la deuxième nommée «Travail effectué » qui détaillera nos résultats obtenus au sein du laboratoire ainsi que les données expérimentales relatives à chaque synthèse.

Pour la première partie ; **La synthèse bibliographique** s'étendra sur deux chapitres :

Lors du premier chapitre, nous verrons en premier lieu l'étude de la composition chimique par RMN de la propolis algérienne de plusieurs région et celle du reste du monde.

Le second chapitre, quand à lui, dresse la synthèse des recherches bibliographiques concernant la formulation de la propolis par la cyclodextrine (CD). Nous terminons ce manuscrit par une conclusion contenant les perspectives qui s'ouvrent pour la poursuite de notre recherche.

Chapitre 1 : L'étude par ^1H -RMN la composition Chimique de la propolis

Introduction :

Il existe dans la littérature plusieurs recherches concernant l'étude de la propolis Algérienne, mais peu ceux qui s'intéresse à l'étude par RMN de la composition chimique. Dans ce chapitre nous passons en revue les travaux qui englobe l'étude par RMN de la composition chimique de la propolis Algérienne et quelques exemples concernant la propolis du reste du monde.

I. La composition de la propolis :

La composition de propolis, varie qualitativement et quantitativement d'une région à l'autre, selon la collecte, le climat et la diversité botanique³.

II. Classification de la propolis selon la composition :

D'après le groupe de *Saltino et Col.*, sur la carte du monde, il est bien élucidé les différentes classifications de la propolis des différents continents. Il est malheureux de voir, que la propolis Algérienne n'est pas comptabilisée !! Ceci a été un objectif dans notre groupe, d'où l'installation d'un projet national pour l'étude de la composition de la propolis algérienne de plusieurs régions de l'Algérie, dont notre mémoire fait partie.

La classification selon la distribution géographique de la propolis :

- **I : type propolis** de peuplier des zones tempérées riche en flavonoïdes (chryisine, 1) et des esters hydroxycinnamiques [caféate de phényléthyle 2].

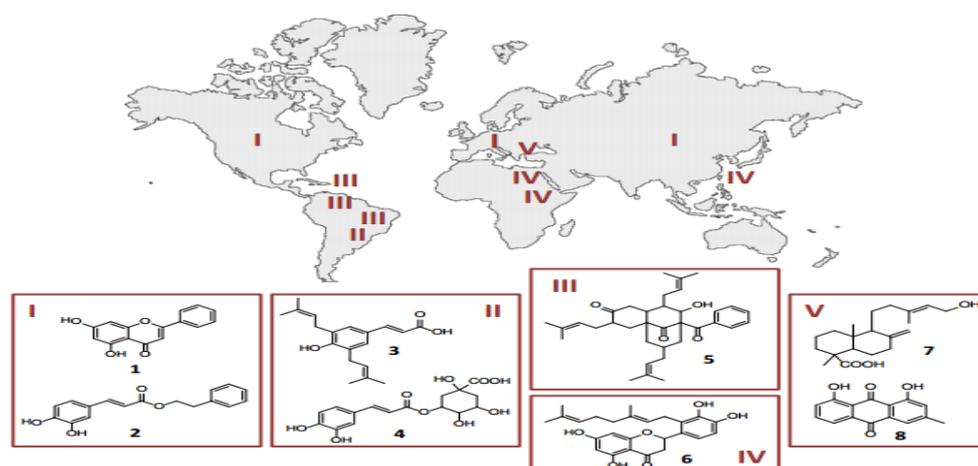


Figure 1 : Distribution géographique des cinq types de propolis.

- **II : type propolis** verte du Brésil qui renferme ; des dérivés prénylés d'acides p-coumariques (artépilline C, 3) et des acides caféoylquiniques (4) .
- **III : propolis type** Clusia avec des benzophénones polyprénylées (némorosone, 5) .
- **IV : propolis type** Macaranga avec des flavonoïdes géranylés (6) .
- **V : propolis type méditerranéen** (Grèce, Chypre, Crête, Turquie) avec soit des diterpènes (acide isocupressique, 7) et, des anthraquinones (chrysophanol, 8).

III. Etude de la Propolis Algérienne :

III.1. Propolis de la région de l'est de l'Algérie (Sétif) : L'étude des échantillons bruts de propolis Algériens ont été prélevés sur différents sites de la région de Setif, cette dernière contient la

³ Huang, S. ; Zhang ,C ; Wang,K. ; 1, George Q. Li 2 ; Liang Hu ,F ; Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis, *Review Journal of Molecules*,**2014**, 19610-19632.

même teneur en polyphénols qui existe dans la propolis brésilienne, les tannins, les sucres et les flavonoïdes⁴.

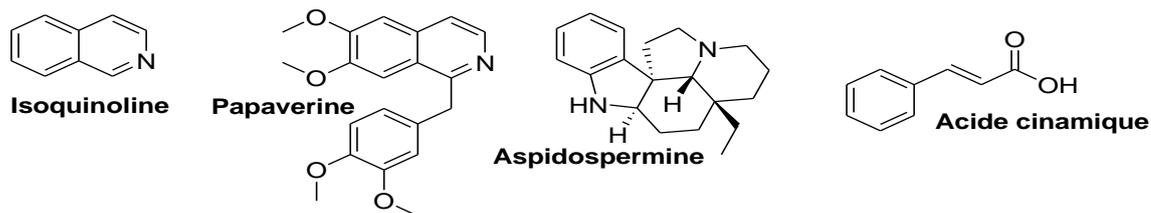


Figure 2 : Structure de quelques composés de la propolis de Sétif (Est de l'Algérie)⁵.

III.2. Propolis d'une autre location de l'est de l'Algérie (Djijel) :

Lahouel et Col⁶., ont démontré que la propolis de cette région possède une propriété protectrice de l'hépatotoxicité de certains traitements du cancer. L'étude de sa composition chimique a démontré qu'elle contient cinq dérivées flavonoïdes identifiés par RMN 1D et 2D⁷.

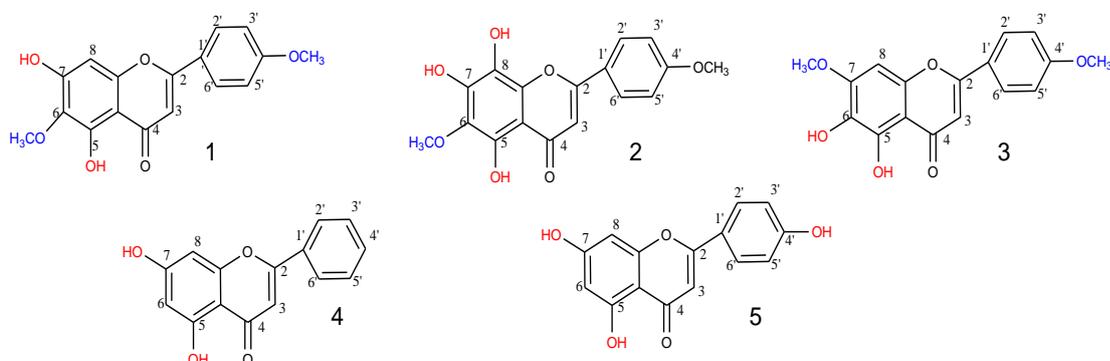


Figure 3 : Structures des Flavonoïdes de la propolis de Djijel (Est de l'Algérie).

L'élucidation de la structure chimique des composés 1 et 2 : les composés 1 et 2 ont été identifiés par RMN ¹H et RMN ¹³C, Dept, COSY, HMQC et HMBC.

- **Analyse du Composé 1** : l'analyse RMN ¹H a démontré que le composé 1 qui est C₁₇H₁₄O₆ contient :

RMN-H (300 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 13,01 (1H, s, 5-OH), 10,67 (1H, s, 7-OH), 8 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-20 et H-60), 7,08 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-30 et H-50), 6,83 (1H, s, H-3), 6,59 (1H, s, H-8), 3,84 (3H, s, OMe), 3,75 (3H, s, OMe).

⁵ EL-Khamsa, S ; Cerezuela ,R ;N, Charef; Mezaache-Aichour ,S. ; Angeles Esteban ,M ;Mihoub Zerrou,M ; Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses, *2017*, 57-67.

⁶ Lahouel, M., Boukour, S., Segueni, N., Fillaste, J.P., 2004. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie* 52, 314-322.

⁷ Segueni, S. ; Zellagu, A.; Moussaoui, F.; Lahouel, M. ; Rhouati, S. ; Flavonoids from Algerian Propolis , *Arabian Journal of Chemistry* . *2011*, 1-5.

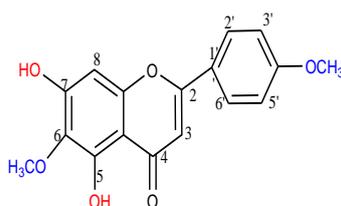


Figure 4: Structure du Composé 1.

Le spectre $^1\text{H-RMN}$ du composé **1** montrait un système A_2X_2 , 7,08 et 8 ppm qui correspondant à 7,08 (2H, d, $J = 8,9$ Hz) $\text{H}^{\prime}\text{-3} / \text{H}^{\prime}\text{-5}$) et $\text{H}\text{-2}^{\prime}$, $\text{H}\text{-6}^{\prime}$ (d , $J = 8$ ppm, $J = 8,9$ Hz). De plus on note, deux protons aromatiques donnant deux pics singulets de (6,59 et 6,83 ppm) qui pourraient être attribués aux protons **C-8** et **C-3**, car il n'y a pas de protons voisins. Tandis pour les deux groupes hydroxyles, résonnent sous forme de singulets (10,67 et 13,01 ppm). L'analyse du spectre $^{13}\text{C-RMN}$, a montré 17 signaux de carbone, y compris deux carbones du méthoxy (55,80 et 60,40 ppm), 14 atomes de carbone aromatiques et un groupe carbonyle (182,60 ppm). L'analyse des cartes, HSQC et HMBC a montré la corrélation entre C10-H8, C6- H8 et C6 - les protons méthoxyles et entre C7-H8 et C9-H8 a attribué la substitution sur C-6 par le groupe méthoxyles (d, 3,84 ppm, C = 60,4 ppm). La substitution sur C-4' par le deuxième groupe méthoxy (d = 3,75 ppm, C = 55,8 ppm) . De plus la corrélation entre C4' -H3' et C4' -méthoxyles comme montré ci après :

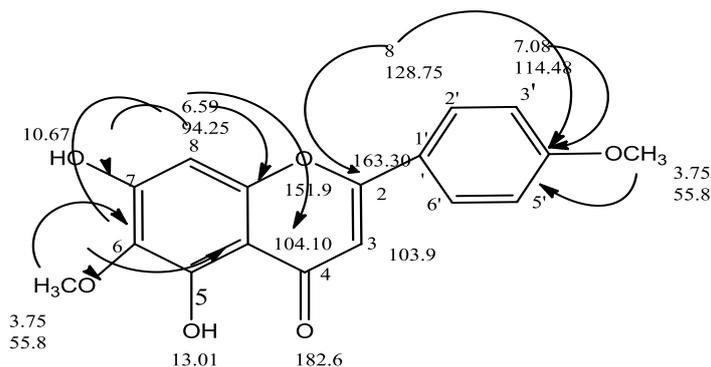


Figure 5 : Corrélation longue distance C – H trouvée dans HMBC.

Tableau 1 : Analyse de composé 1 par $^{13}\text{C-RMN}$.

Carbone	Déplacement chimique ppm		
C-2	163,30	C-9	151.9
C-3	103.9	C-10	10.10
C-4	182,60	C-1'	123.70
C-5	152,15	C-2' et C-6'	128.75
C-6	131,29	C-3' et C-5'	11.48
C-7		4-OMe	55.80
C-8	94.25	6-OMe	60.40

Le composé 1 a été identifié comme étant la **5,7-dihydroxy-6,4-diméthoxyflavone**.

- **Analyse du composé 2 :** Les spectres RMN 1H et 13C du composé 2 ont montré des résultats similaires, des signaux du composé 1 sauf en l'absence du signal H-8 et la présence du signal du carbone

à 129,7 ppm au lieu de 94 ppm au composé 1, ce qui a confirmé la substitution du groupe hydroxyle en C8⁸.

RMN 1H (300 MHz, DMSO-d6), d (ppm): 12,8 (1H, s, 5-OH), 8,02 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-2 et H-6), 7,08 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-3' et H-5'), 6,83 (1H, s, H-3), 3,84 (3H, s, OMe), 3,75 (3H, s, OMe).

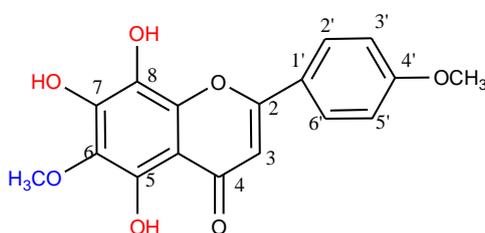


Figure 6 : Structure du Composé 2.

Tableau 2 : ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d6).

Carbone	Déplacement chimique ppm		
C-2	162.74	C-9	151.9
C-3	102.2	C-10	103.9
C-4	182,60	C-1'	123.70
C-5	146.84	C-2' et C-6'	128.75
C-6	136.7	C-3' et C-5'	115.02
C-7	153.18	4'-OMe	55.99
C-8	129.7	6'-OMe	60.45

Le composé 2 était identifié comme étant : **5, 7, 8- trihydroxy – 6 , 4 diméthoxyflavone (pilosine)**.

- **Analyse composé 3 :** C₁₇H₁₄O₆

Le déplacement chimique du C-6 à 131,78 ppm, a confirmé la présence d'un groupe hydroxyle sur C-6. Par contre ce groupe est inexistant dans les autres composés⁹.

⁸ Bankova, V., Decastro, S.L., Marcucci, M.C., 2001. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31, 3–15.

⁹ Toth, E., Toth, G., Mathe, I., Blumden, G., 2007. Biochem. System Ecol. 35, 894–897.

RMN 1H (250 MHz, CDCl₃), (ppm): 12,88 (1H, s, 5-OH), 10,94 (1H, s, 6-OH), 8,03 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-2' et H-6'), 7,10 (2H, d, J = 9 Hz, H-30 et H-5'), 6,91 (1H, s, H-3), 6,8 (1H, s, H-8), 3,90 (3H, s, OMe), 3,84¹⁰ (3H, s, OMe).

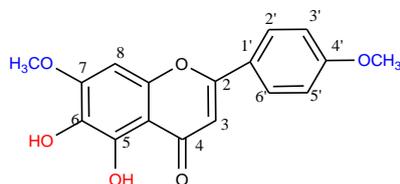


Figure 7 : Structure du Composé 3.

Tableau 3 : RMN 13C (62,5 MHz, DMSO-d₆).

Carbone	Déplacement chimique ppm		
C-2	163	C-9	152.84
C-3	103.38	C-10	104.53
C-4	182.54	C-1'	123.19
C-5	151.88	C-2' et C-6'	128.69
C-6	131.78	C-3' et C-5'	114.98
C-7	157.73	4'-OMe	55.94
C-8	194.72	7-OMe	60.45

Conclusion : Le composé 3 a été identifié comme : **6,7-dihydroxy-7,4'- diméthoxyflavone**.

- **Analyse du composé 4** (C₁₅H₁₀O₄) :

L'analyse RMN ¹H et le ¹³C a marqué l'absence du groupe méthoxy dans sa structure par rapport aux autres composés **1**, **2** et **3** (voir tableau 4). De plus, les protons aromatiques résonnent sous forme de massif, ce qui implique l'absence de substituant sur le cycle.

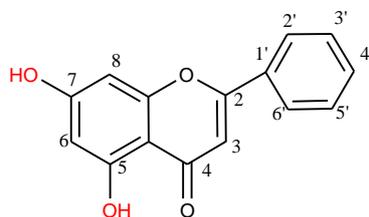


Figure 8 : Structure du composé 4.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 12,81(1H, s, 5-OH), 10,92 (1H, s, 7-OH), 8,05 (2H, dd, J = 7,6 et 1,6 Hz, H-20 et H-6'), 7,57 (3H, m, H-30, H-4' et H-5'), 6,93(1H, s, H-3), 6,50 (1H, d, J = 2,09 Hz, H-8), 6,20 (1H, d, J = 2,09 Hz, H-6)¹¹.

Tableau 4 : RMN 13C (62,5 MHz, DMSO-d6), (ppm)

Carbone	Déplacement chimique ppm		
C-2	163.61	C-9	157.9
C-3	104.38	C-10	105.10
C-4	182,31	C-1'	131.13
C-5	161.88	C-2' et C-6'	126.85
C-6	99.57	C-3' et C-5'	129.58
C-7	164.9	5-OH	0
C-8	94.57	7-OH	0

Le composé 4 a été identifié comme étant : **5,7-dihydroxyflavone**.

Analyse du composé 5 (C₁₅H₁₀O₅) : La structure du composé **5** est semblable à celle du composé 4, mais il a un groupe hydroxyle dans la position en C- 4', Ceci est confirmé, par l'allure des signaux aromatiques, qui résonnent sous forme de doublet à 8 et 7.06 ppm. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d6), d (ppm): 13,01(1H, s, 5-OH), 10,67 (1H, s, 7-OH), 8 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-2'et H-6'), 7,08 (2H, d, J = 8,9 Hz, H-3'et H-5'), 6,83 (1H, s, H-3), 6,59 (1H, s, H-8), 3,84 (3H, s, OMe), 3,75 (3H, s, OMe)¹².

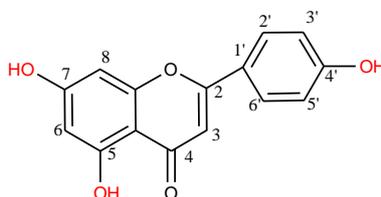


Figure 9 : Structure du composé 5.

Le composé 5 a été identifié comme : **5,7,4-trihydroxyflavone (apigénine)** .

III.3. Propolis de l'Ouest de l'Algérie (Mascara): *Debab et Col.*, ont réalisé une étude de la propolis de l'Ouest Algérien sur neuf régions de la ville de Mascara : La propolis de Mascara est la plus riche en tannins est de 27mg /g , et la teneur en polyphénols 180.30mg/g de l'extrait de propolis .

III.4. Propolis Saharienne située en Sud de l'Algérie (Ain Oussara): L'étude par RMN de la propolis Saharienne issue de l'abeille « *Apis Mellifica sahariensis* », donne deux spectres

¹¹ Chen, L.J., Games, D.E., Jones, J., 2003. J. Chromatogr. 988, 95–105.

¹² Nagao, T., Abe, F., Kinjo, j., Okabe, H., 2002. Biol. Pharm. Bull. 25 (7), 875–879.

qui sont réalisés dans l'éthanol 70 %, le spectre à chaud et froid par macération. Les deux spectres présentent, des signaux avec différentes intensités.

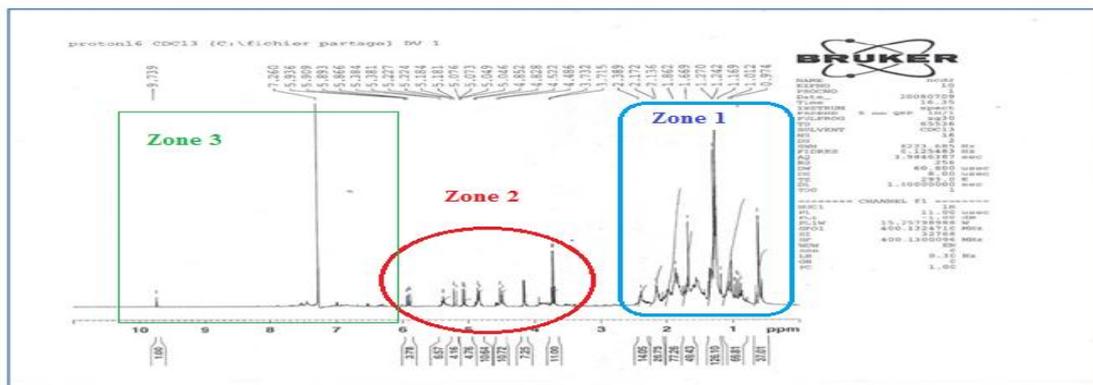


Figure 10: Spectre ^1H -RMN la propolis Saharienne, l'extraction par macération dans l'éthanol (70%).

Les deux spectres montrent une zone aliphatique allant de 0.63 à 1.89 ppm pour l'extraction à chaud et une autre pour l'extraction à froid de 0.97 à 2.38 ppm. Donc les composés aliphatiques sont bien extraits à froid de l'éthanol (70 %). La zone 2; (3.7-6 ppm), relatives aux protons éthyléniques. Tandis que, pour l'extraction à chaud ; les signaux sont plus faibles dans la zone des doublets qui ont été détruit à cause de la chaleur. Ainsi les 3 zones qui se situe (6-10 ppm) correspond aux signaux des aromatiques complexes¹³ presque absente .

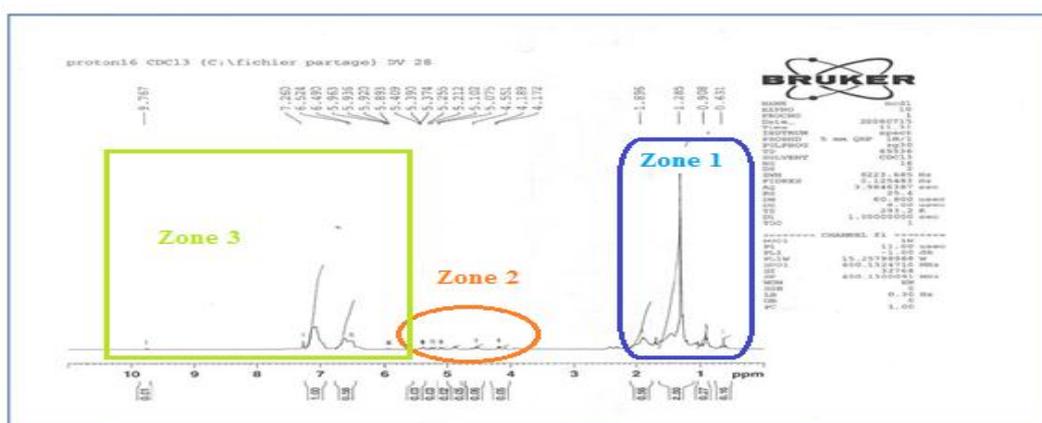


Figure 11 : spectre RMN-H la propolis Saharienne, l'extraction au chaud dans l'éthanol (70%).

¹³ Farhoum,F; Mémoire de Magister Analyses physico-chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis **2010**,1-122.

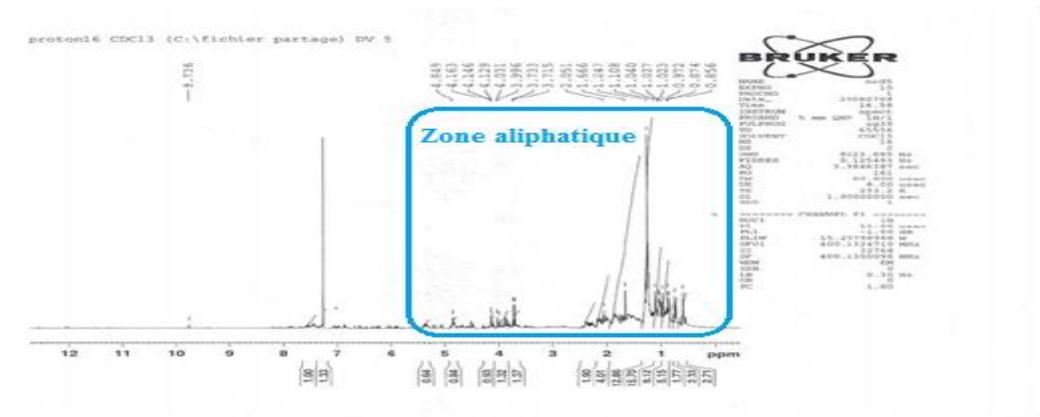


Figure 14 : Spectre ^1H -RMN de l'extraction éthanolique de la propolis (Ykourene 2007).

IV. Exemple d'étude de la Propolis du Reste du Monde: Plusieurs travaux existent sur la propolis, de plusieurs régions du monde¹⁵.

IV.1. Spectre RMN des composés de la propolis de France : Boisard et Col., ont analysé par RMN ; indique la présence d'un motif dihydroflavonol (2 doublets de constante de couplage $J=11.7$ Hz à δ 4.40 et 5.03 ppm), et d'un groupement méthoxyles (s à δ 3.85 ppm).

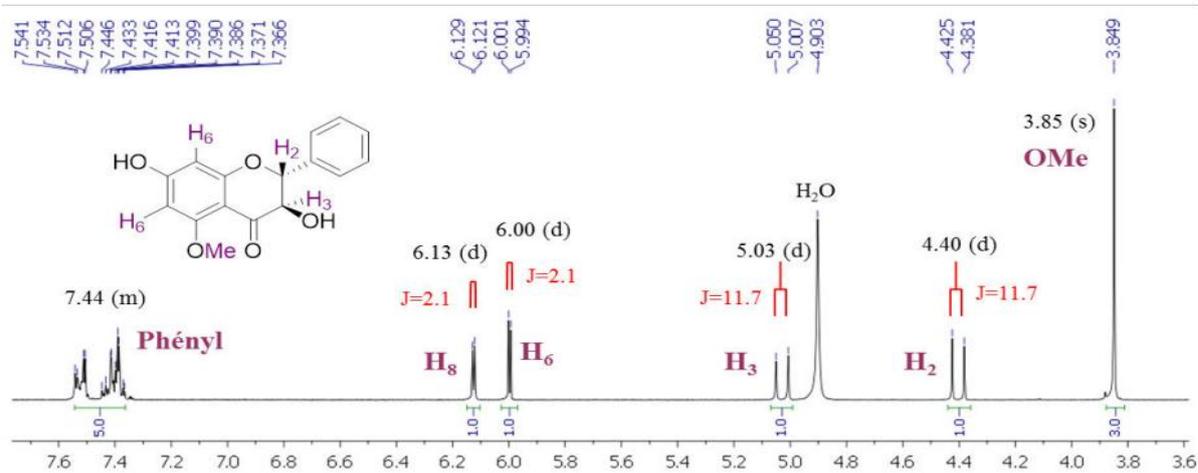


Figure 15 : Spectre RMN ^1H (zone δ 3.6- 7.6 ppm) ; (270 MHz, CD_3OD).

Parmi les composés acides, le spectre RMN ^1H indique la présence d'un groupement phényle et d'un motif $\text{CH}_2\text{-C}2$ confirmés en RMN ^{13}C (respectivement 6 signaux dans la zone δ 127- 143 ppm et deux signaux à δ 32 et 37 ppm) avec en plus un signal d'un carbonyle d'une fonction acide carboxylique à δ 174 ppm.

¹⁵ Salatino, A.; Fernandes- Silva, C. C.; Righi, A. A.; Salatino, M. L. F. Propolis Research and the Chemistry of Plant Products. *Natural Product Reports* **2011**, 28, 925-936.

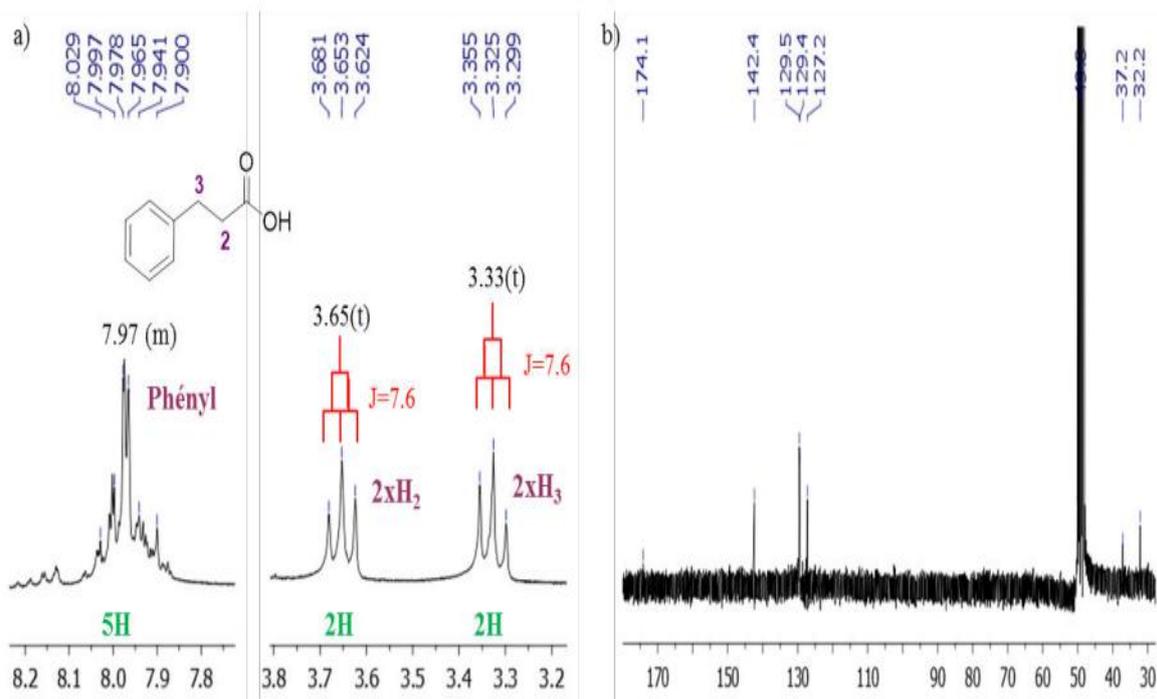


Figure 16 : Spectres ^1H -RMN (zones δ 3.2- 3.8 et 7.8 - 8.2 ppm) (a) et ^{13}C ; (b) (270 MHz (^1H) / 67,5 MHz (^{13}C), CD 3OD)¹⁶.

Conclusion Chapitre 1 :

Plusieurs travaux existent dans la littérature concernant la propolis, mais très peu ont été consacré à l'étude de la composition chimique de la propolis Algérienne.

Ceux déjà réalisé sur plusieurs régions, Sétif, Mascara, Djijel, Tizi Ouzou et Saraha, illustre une différence de composition chimique, due à la différence de l'espèce de l'abeille et de la flore botanique de chaque région.

De plus, le choix du solvant et la méthode d'extraction à froid ou à chaud influence considérablement sur le type de composé analysé.

La RMN, reste une méthode d'analyse la plus judicieuse pour l'étude de la composition de la propolis.

¹⁶ Servine Boisard, Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis, Université de Nante, 2014.

Chapitre 2 : Etude de l'inclusion de l'extrait de la propolis avec le β -cyclodextrine.

Introduction :

Dans ce chapitre, nous allons passer en revue les propriétés biologiques de la propolis, qui sont liées à sa composition chimique. Donc l'extrait de propolis est un agent médicinal naturel qui peut être administré sous une forme pharmaceutique appropriée. Nous avons choisi de réaliser une étude de complexation à base de la cyclodextrine, d'où l'objectif de cette deuxième partie.

I. Propriétés pharmacologiques de la propolis :

I.1 Activité Antimicrobienne et antibactérienne : *Nedji et Col.*, ont évalué l'activité biologique, sur la propolis algérienne à partir des échantillons relevés de différentes régions, qu'elle présentait une riche activité antimicrobienne, et antibactérienne. L'activité contre toutes les bactéries testées avec des propriétés antimicrobiennes élevées les bactéries à gram négative et gram positif¹⁷.

I.2 Activité Anti-tumorale : Les résultats indiquent que l'EEP Algérien était plus toxique contre les cellules cancéreuses que beaucoup d'autres propolis, et que l'inhibition de la cellule cancéreuse peut être liée à la croissance de la teneur en flavonoïdes¹⁸.

I.3 Propriété antioxydant : *Boufadi et Col.*, ont réalisé une étude biochimique des tissus pulmonaires, qui a montré que l'EEP réduit considérablement le stress oxydatif. Les extraits de Propolis, riche en polyphénols, flavonoïdes et acide ascorbique, présentent des meilleures propriétés antioxydants^{19,20}.

II. Inclusion de la propolis avec la β -cyclodextrine : Très peu d'études sont réalisées dans la littérature sur l'interaction cyclodextrine-propolis. Et à notre connaissance aucune étude par UV de complexe d'inclusion à base de CD-Propolis Algérienne a été décrite jusqu'à maintenant. Ceci nous a motivé plus pour entreprendre cette recherche.

III. Formation de nanoparticule de Propolis de la Roumanie avec β -CD pour améliorer l'extraction : *Gafitanub et Col.*, ont réalisé des complexes d'inclusions de la propolis

¹⁷ Nedji,N ; Loucif-Ayad,W . ;Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens its quantitative chemical composition *,Journal of Tropical Disease*, **2014**; 4 (6), 433-437.

¹⁸ Brihoum ,H . ; Maiza,M. ; Sahali, H. ; Boulmeltout, M . ; Barratt ,G. ; Benguedouar ,L ; Lahouel ,M ;Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor chemopreventive effects involving antioxidant activity *,Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* .**2018**,1-12.

¹⁹ Boufadi ,Y.M. ; Soubhye ,J . ; Riazi, A. ; Rousseau ,A . ; Vanhaeverbeek ,M . ; Neve ,J . ; Zouaoui Boudjeltia, K ; Van Antwerpen ,P. ;Characterization and antioxidant properties of six Algerians Propolis extracts: inhibitors of ethyl acetate extracts Myeloperoxidase activity, *International Journal of Molecular Sciences*. **2014**, 15, 2327-2345.

²⁰ Gharbi ,M. ; Les produits de la ruche: Origines - Fonctions naturelles – Composition Propriétés thérapeutiques. Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire, *Thèse de doctorat*. **2011** ,1-247.

d'origine de l'ouest de la Romani (2006) avec la β -CD²¹. Ces complexes d'inclusion ont amélioré le rendement de l'extraction des composés hydrophobes de la propolis. Grâce à la formation d'un complexe d'inclusion hydrosoluble.

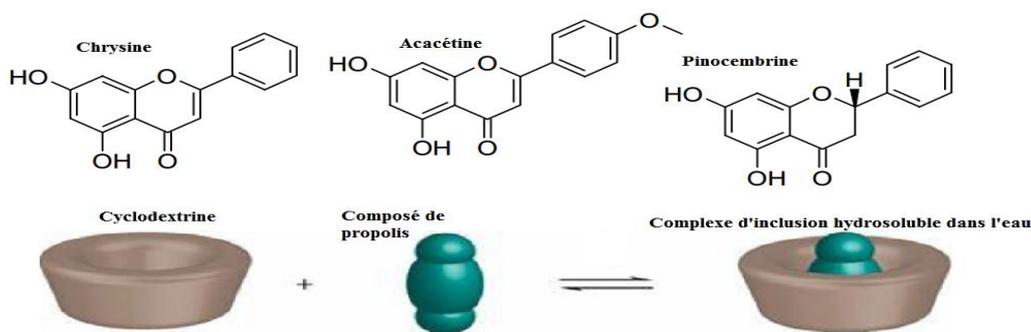


Figure 1 : L'extraction des composés de la propolis De la Roumanie par β -CD.

II.2. Préparation de complexes d'inclusion Propolis « PE » de la Grèce /CD :

L'augmentation de la solubilité des constituants de la propolis en raison de la formation de complexes d'inclusion avec la CD a été estimée par l'augmentation de la quantité de certains composants dissoute dans l'eau en présence de CD. L'acide abiétique qui était l'un des principaux extraits de propolis constituants (comprenant 34,5% p / p) est normalement presque insoluble dans l'eau.

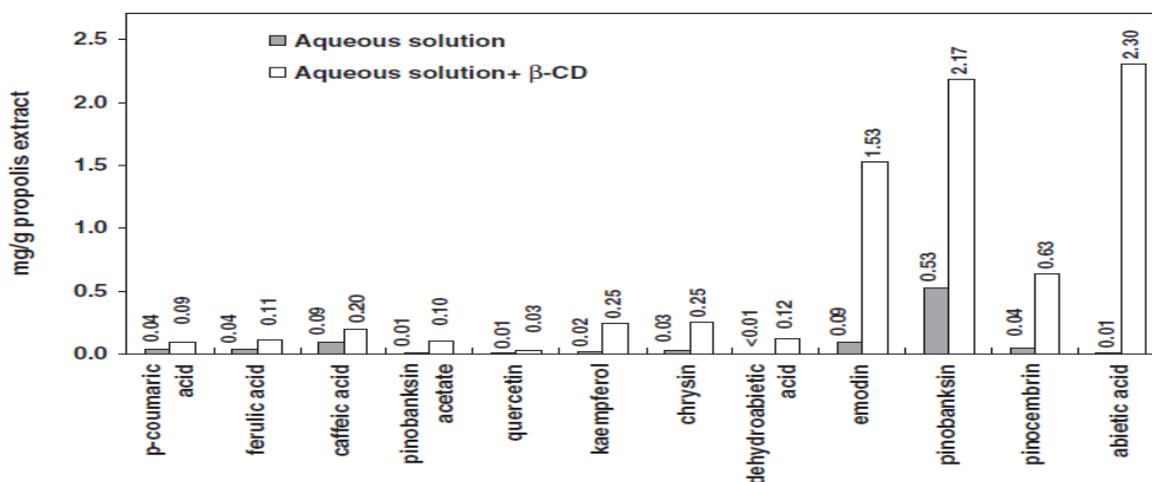


Figure 2 : Solubilité dans l'eau (mg/ g 1 d'extrait de propolis) des constituants de la propolis en l'absence et la présence de β -CD.

2. Détermination de l'efficacité d'encapsulation des composés de la propolis :

La propolis est composée de diverses propriétés physiques et chimiques et donc avec différentes capacités d'interaction et de liaison au sein de la cavité de la CD. Un critère

²¹ Gafițanub,E ; Nicoleta G. Hădărugăc, D ;Coneaca ,G ; Adrian Rivișc,H ; Bandurd, Iulia ,G ; Gerlinde Rusu,P . ; Urșicaa,L Păunescue, V ; Gruiaie, A ; Sebeșan,M ; Grozescu, I ; Lazu, C ; Sfirloagă, P ; Propolis extract / β -cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physicochemical and multivariate analyzes, *Journal of Agroalimentary Processes and technologies* . **2008** ,58-70.

principal pour l'inclusion d'une molécule invitée dans la cavité, sa taille puis d'autres facteurs tels que l'ajustement strict, les interactions de van der Waals, l'hydrogène, ainsi les polarités relatives à des groupes caractéristiques ; décident quelle extrémité de la molécule l'invité va dans la cavité hydrophobe, il est préférable que la partie non polaire soit incluse à l'intérieur de la cavité²².

Les rendements d'encapsulation pour les principaux constituants bioactifs de l'extrait de propolis sont différents ; il est évident que les petits composés aromatiques comme le cinnamique et le benzoïque, les acides sont liés plus efficacement dans la cavité -CD, par rapport aux molécules plus complexes et plus grandes comme flavonoïdes, anthraquinones et acides terpéniques, pour lesquels la formation de complexes d'inclusion semble être moins efficace.

L'étude des composés d'inclusion de caféique et acides férulique et a montré qu'ils entrent en partie dans la cavité de CD avec la partie phénol et le carboxyle reste à l'extérieur.

Dans le cas de la quercétine, il a été proposé qu'une grande partie du flavonoïde est incluse dans la cavité CD et la stabilité du complexe est due à la formation de la liaison l'hydrogène intermoléculaire.

Conclusion chapitre 2 :

L'encapsulation dans CD peut augmenter la solubilité de la PE, constituant d'une manière liée à leurs structure, tandis que la quantité de substances libérées dépendra à la fois de leurs propriétés chimiques et leur abondance relative dans la matrice.

La taille et produit chimique jouent un rôle important dans la classe des molécules invitées affectant à la fois leur encapsulation efficacité et biodisponibilité .

Les petites molécules phénoliques encapsulées ont été libérées de la cavité CD avec plus de difficulté, tandis que le l'inverse était vrai pour les flavonoïdes, les anthraquinones et terpènes. La libération nette de composés spécifiques de PE encapsulé dépendra non seulement de leur produit chimique mais aussi sur leur abondance relative.

La composition de la propolis varie, considérablement selon plusieurs facteurs : flore botanique, année de la récolte, l'espèce de l'abeille et la méthode d'extraction.

Les seuls travaux trouvés qu'on a trouvé dans la littérature concernant l'inclusion des composés de la propolis avec la CD, à pour objectif d'amplifier le rendement d'extraction des composés hydrophobes.

²² Kalogeropoulos, N. ; ,Konteles,S ; Mourtzinos,I. ; Troullidou, E. ; Chiou,A. ; Vaios T. Karathanos. ; Encapsulation of complex extracts in -cyclodextrin: Application to propolis ethanolic extract, *Journal of Microencapsulation*. . 2009 ,26 (7) , 603-613

Partie expérimentale :

III. Travail effectué :

Introduction : Notre partie expérimentale comporte, un chapitre nommé Travail effectué est divisé en deux parties Matériels et méthode ; pour expliquer les protocoles puis Résultats et discussions pour les graphes, résultats obtenus, courbe d'étalonnage et explications.

I. Indications générales :

1. UV-Visible : Les analyses UV, réalisées lors de cette étude ont été effectuées au laboratoire (COSNA) sur un spectrophotomètre Thermo-Scientific Helios γ .

2. Les CCM : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), réalisée sur des plaques d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F₂₅₄.

3. Chromatographie sur colonne :

3.1. Phase stationnaire : La Chromatographie sur colonne, est effectuée sur une colonne de verre remplie de gel .de silice 60.

3.2. Phase Mobile : Afin de choisir le meilleur éluant, on a essayé plusieurs systèmes de séparation, et on a sélectionné ceux qui donnent la meilleure séparation (Voir tableau03).

4. Analyse RMN : Les analyses RMN sont effectuées au CRAPC (Typaza, Algérie) sur les spectromètres (Bruker) à la fréquence de 400MHz pour ¹H. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tetraméthylsilane (TMS) comme référence externe, et les calibrations internes sont effectuées à l'aide du signal résiduel du solvant.

4. Analyse LC-MS : Les analyses LC-MS sont effectuées au CRAPC (Typaza, Algérie) sur Appareil Agilent, en mode gradient en utilisant la phase mobile MeOH-Acide acétique. Et l'identification a été réalisée à l'aide de la base de données NIST.

5. Protocoles des expériences :

1. Echantillon de la propolis : Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet de mobilité national en collaboration avec le Centre de Recherche en Analyse Physico-chimique CRAPC, qui a pour objectif de cartographier la composition chimique de la propolis de plusieurs régions de l'Algérie. Cette composition est très variable, car elle dépend de la flore environnementale, du climat, zone de la collecte et l'espèce de l'abeille.

IV. Objectifs à réaliser :

Notre travail va se focaliser sur des étapes suivantes :

- ✓ Macération, et extraction des matières de propolis (macération à froid).
- ✓ Etude par RMN-¹H et LC-MS la propolis de différentes régions de l'Algérie.
- ✓ Etude des complexes d'inclusions Propolis avec la CD.
- ✓ Etude de l'influence de la (β -CD) sur la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes. des extraits éthanolique de la propolis commerciale (E-P).
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydante de (E-P).
- ✓ Evaluation de l'activité antimicrobienne de (E-P).
- ✓ Purification et isolations par colonne chromatographique des extraits de propolis.

V. Matériels et méthodes :

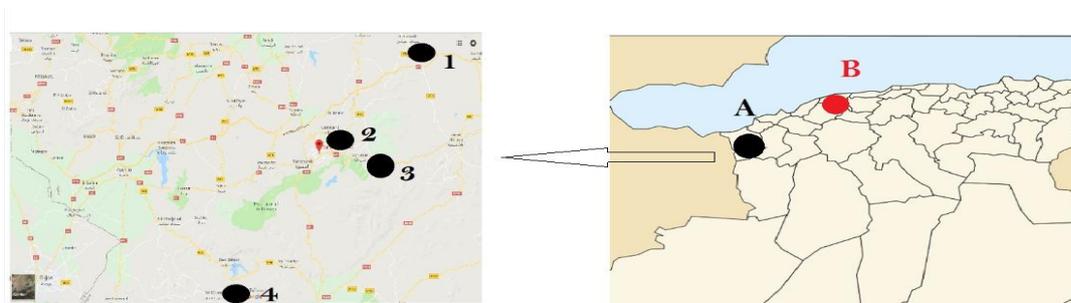


Figure 01 : Site de Collection de la propolis de (A) Tlemcen et (B) Chlef. Avec les sites de collections de Tlemcen (1: SP Sidiabdelli), (2: CP Chetouane), (3: HP Chouli) et (4: BP Benisnouis).

III-1- Récolte et origine :

1. 1 Site de Collection : Notre travail est une contribution à un projet national par une étude expérimentale ; qui se tourne autour de l'analyse par RMN et LC-MS et isolation de produits pur de la propolis issues deux wilayas Chlef et Tlemcen. Afin de vérifier si la flore botanique influence la composition chimique, nous avons choisi quatre extraits de la propolis de plusieurs régions de Tlemcen à savoir : a.) Sidiabdelli ; b) Chetouane ; c) Benisnouis ; et d) Chouli. Afin de distinguer avec précision la composition chimique, nous avons choisi d'étudier aussi la propolis commerciale issus de la région de Tlemcen qui d'après le vendeur c'est un mélange de plusieurs régions de propolis, et de la comparer à celles issus directement de l'apiculteur.

2. L'extraction et préparations les extraits brut de la propolis :

2.1 Macération à froid de la propolis commerciale (PC) : Pour la macération à froid, la masse de 10g de propolis dans un erlenmeyer 500ml emballé avec du papier aluminium, auxquelles on a ajouté 135 ml d'éthanol 96°. Au bout de 7 jours, ce macérât est filtré puis évaporé, et on obtient un liquide d'apparence visqueuse.

2.2. Macération à froid de la propolis commerciale (PC-CD) en présence de cyclodextrine: Selon le même protocole ; 9g de la propolis, sont extraites par 100ml de l'éthanol en présence de 1.g de β -cyclodextrine.

Le rendement d'extraction est calculé comme suit : **Taux d'extraction (%) = [(Pf)/Pi] *100** avec

; **Pf** : Poids de l'extrait sec (g). ; **Pi**: Poids de l'échantillon initial(g).

2.3 Etude de complexe d'inclusion Propolis et CD : Afin d'évaluer l'impact de la cyclodextrine sur les composés de l'extrait de propolis commerciale, sur le plan le rendement des macérations, le taux d'extraction des polyphénols et flavonoïdes, et l'activité antioxydante. Il est important d'abord de vérifier si le processus de **complexation a eu lieu ou non** .Nous avons utilisé la méthode

de Job ou appelée aussi la méthode des variations en continu²³.

2.4. Préparation des complexes d'inclusions : Il existe deux méthodes de préparations des complexes d'inclusions soit à partir d'une phase liquide ou bien d'une phase solide ²⁴ .Nous allons choisir de préparer un complexe en solution.

3. Détermination de la quantité totale en polyphénols et flavonoïdes des extraits de propolis PC et (PC-CD) :

1.Quantité totale en polyphénols :

Pour le dosage des polyphénols totaux on a suivi la méthode de folin -ciocalteu²⁵, dont réactif Folin est constitué par le mélange d'un acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). En présence de phénols le mélange, est réduit en oxyde bleus de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_{23} .²⁶

Protocole expérimentale : Le protocole du dosage est réalisé en prélevant 100 μ l de l'extrait PC, et de l'extrait du complexe P- β CD, auquel on a ajouté 500 μ ml de réactif de folin ciocalteu (0.1N), après 5 min d'incubation à température ambiante. On ajoute, 400 μ l de

²³ P.Job .Compt .Rend.Acad.Sci.Paris.1925, 180, 928 .

²⁴ Ghouari ,A ; Henine ,S ; Yakoube ,K ; Etude de la formation des complexes d'inclusions des sulfonamides par la cyclodextrine , *Thèse de mémoire* .2017 .

²⁵ Benhammou ,N ;Atik Bekkara ,F ; Coustard ,J ,M ; Antioxydant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* (de Noé) and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara ,*Advances in Food Science* .2009 ,(31),194-201 .

²⁶ Benhammou ,N ; Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de L'ouest et Sud-ouest Algérien ,*Thèse de doctorat* .2011 .

carbonate sodium à 7.5 % . Le mélange est incubé à 50°C pendant 5 minutes ; après refroidissement la lecture de l'absorbance à $\lambda=760$ nm, en utilisant la spectroscopie UV visible. La teneur en phénols totaux dans PC est exprimée en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec).

La quantité de polyphénols de chaque extrait est calculée à partir de l'équation :

$$C = \frac{c \times v}{m}$$

C : la teneur en polyphénols totaux (mg d'acide gallique / g d'extrait sec).

V : le volume de l'extrait éthanolique.

c : concentration de l'acide gallique établie à partir par courbe étalonnage.

m : le poids de l'extrait sec (g).

2. Dosage des Flavonoïdes : La quantification des flavonoïdes est effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$. L'objectif de cette méthode est de quantifier les flavonoïdes de la propolis commerciale, en présence de β -CD et en absence de β -CD afin d'évaluer son influence sur le mode d'extraction. . Le principe est basé sur la réaction des ions de Al^{3+} avec les fonctions alcools de 2 cycle aromatique et hétérocycle de flavonoïdes, qui conduit à formation d'un complexe organométallique (flavonoïde- Al^{3+}), et ainsi un changement de couleur dans le milieu réactionnel.²⁷

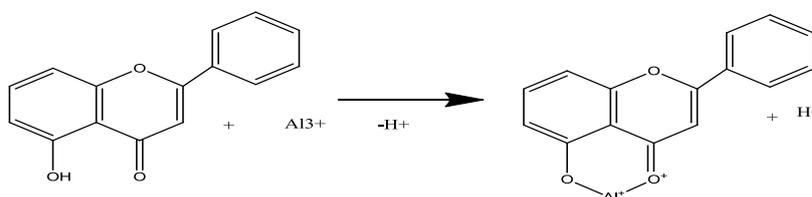


Schéma 1 : réaction de Lamaison, l'addition de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec flavonoïde.

Protocole expérimentale :

On a ajouté à 1ml de chaque échantillons de propolis (PC, et PC- β -CD) 1ml de solution ($AlCl_3$, H_2O) (2% dans éthanol), après 10min d'incubation à température ambiante, puis on passe à la lecture de l'absorbance à $\lambda=430$ nm.

²⁷ Javanmardia, J; Stushnoff, C ; Locke,E ; Vivancob, J. M; Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions *journal of chemistry* . **2003**, 83 ,547-550.

3. Evaluation de l'activité antioxydante DPPH de PC et PC-CD:

3.1. Principe de la méthode :

L'évaluation de l'activité antioxydante de notre PC est réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette, qui est considéré comme un radical stable, ce dernier se réduit à la forme hydrazine (non radical), est transformé à sa forme réduite en couleur jaune (diphényl picryl-hyrazyl), ce qui conduit à la diminution de l'absorbance²⁸.

ABS : absorbance de l'extrait

ABS contrôle : absorbance de radicale DPPH.

$$\text{Activité antioxydant} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}) \times 100\%}{\text{Abs contrôle}}$$

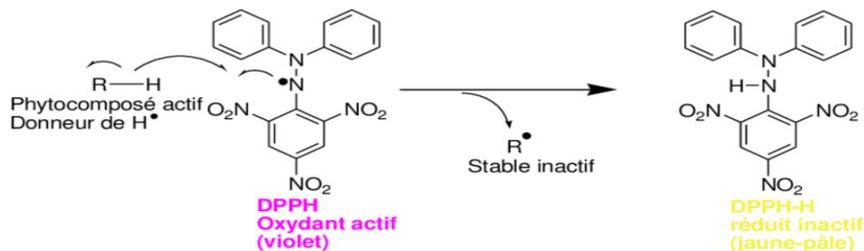


Schéma 2 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Protocole expérimentale : La solution de DPPH est préparée par la solubilisation de 6mg de DPPH, dans 100ml de l'éthanol, et puis on a laissé incuber à l'obscurité pendant 30min. après on est passé à la lecture de l'absorbance à $\lambda=517\text{nm}$; on a pris 1ml d'éthanol +1ml de solution DPPH, pour vérifier l'absorbance de DPPH qui entre $AB=(0.6-0.9)$. On a pesé 0.2 mg/ml de concentration de chaque extrait de propolis commerciale de P.E et P.E- β -CD, puis l'a fait dissoudre dans 4ml de l'éthanol, après on a préparé les solutions filles comme suit : On prépare la solution $S_{1/2}$ on prélève 1ml de solution mère, puis on a rajouté 1ml de l'éthanol, on a fait la même chose pour la Solution $S_{1/3}$ mais en ajoutant cette fois ici 2ml de l'éthanol. Ensuite nous allons diluer les solutions $S_{1/2}$ et $S_{1/3}$, pour obtenir les autres solutions $S_{1/4}$ et $S_{1/6}$, on prélève 1ml de $S_{1/2}$ et $S_{1/3}$, puis on ajoute 1 ml de l'éthanol on obtient $S_{1/4}$ et $S_{1/6}$

²⁸ H.Talbi, A.Boumaza, K.El mostafa, J. Talbi, A.Hilali ; Evaluation de l'activité antioxydante et de la composition physico-chimique d'extraits méthanoliques et aqueux de *Nigella sativa* L. (Évaluation de l'activité antioxydante et de la composition physico-chimique d'extraits méthanoliques et aqueux de *Nigella sativa* L.), 2015 .1111-1117.

.On ajoute 1ml de solution DPPH pour les solutions S1, S2, S3, S4, après incubation pendant 30 min, on passe à la lecture à $\lambda=517\text{nm}$. Tableau 01(voire l'annexe)

On a travaillé avec les mêmes concentrations pour chaque extrait :

Tableau 02 : les concentrations pour les deux extraits de la propolis (PC.PC- β) .

Les solutions	SM	S1	S2	S3	S4
C mg/ml	0.05	0.025	0.0125	$6,25 \times 10^{-3}$	$3,125 \times 10^{-3}$

4. Séparation chromatographique par CCM : Notre objectif est de choisir un bon éluant (phase mobile) pour séparer les différents constituants de chaque échantillon . Afin de trouver le bon éluant, nous avons essayé plusieurs solvants de différentes polarités. A la fin, nous avons choisi le système d'éluions (ACOEt / Hexane). On a remarqué que les chromatogrammes obtenus pour le système 04 et 05 qui présente une bonne migration pour les 5 échantillons de propolis, par conséquent une bonne séparation, ainsi les spots sont bien distincts et montrent une richesse considérable en substances .

Tableau 03: les différents systèmes solvants utilisé pour la CCM.

Systèmes essayés	Phase mobile	Proportions	séparation des composés
Système 01	hexane	1	–
Système 02	CH ₂ Cl /méthanol	9 : 1	–
Système 03	Acétate d'éthyle / diéthyle éther	8 : 2	–
Système 04	Ether de pétrole / acétate d'éthyle	6 : 4	+
Système 05	Hexane / acétate d'éthyle	6 : 4	+

5.La séparation des composés de la propolis par la chromatographie sur colonne : Pour séparer les composés de chaque propolis, on utilise la chromatographie sur colonne et on a pu isoler des composés purs selon le protocole suivant: L'extrait de propolis introduit sur une colonne de gel de silice préparé dans l'hexane. Le système d'éluion (la phase mobile) est réaliser par un gradient de polarité de (ACOET / Hexane).

Evaluation de l'activité antimicrobienne de la PC: L'activité antimicrobienne a été réalisée par Dr.S.Bellifa du laboratoire de biologie et microbiologie (Université de Tlemcen) par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller Hinton agar.²⁹ Le test de l'activité

²⁹ Saffidine ,K ; Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus L.et de Plantago major L* ,Thèse de doctorat . 2015.

antimicrobienne a été effectuée sur 5 souches de micro-organisme 3gram positif (*K.pneumoniae*, *B.subtilis*, *S.aureus*) et 2 gram négatifs (*E.coli*, et *P.aeruginosa*).

VI. Résultats et discussions :

1. Etude par RMN des extraits de propolis : Dans un premier temps, L'analyse comparative par RMN des différents extraits éthanoliques bruts de la propolis des deux localités Chlef et Tlemcen. De plus, les quatre régions de Tlemcen désignées par HP (Chouli), BP (Benisnouse), CP (Chetouane) et SP (sidielabdeli).

1.1. Analyse spectrale : On peut diviser, le spectre en cinq grandes parties générales :

- [0,2 - 2,5 ppm] : Cette région correspond aux signaux relatifs aux groupes aliphatiques.
- [3 - 3,7 ppm] : Cette région reflète les groupes méthoxy, les signaux sont semblables à celui des signaux de la propolis de Saharienne (voir chapitre 1). De plus, cette zone peut inclure des signaux aromatiques des groupes méthoxyles qui apparaissent dans tous les extraits,
- [3,7 – 6.5 ppm] : Cette partie renferme tous les protons associés aux différents hétéroatomes qui possèdent un effet attracteur ; et donc déblindent fortement ces protons. Aussi on note les protons des groupes éthylénique conjugués.
- [6.5 -10 ppm] : Cet intervalle, se trouve dans les différents propolis Algérienne. regroupant tous type de protons aromatiques qui montrent l'existence d'un groupement phényles ; présente des signaux intenses dans les régions de BP, SP , HP, CP , mais elle a donné des signaux faibles dans la régions de Chlef. L'intensité des signaux est relative à la teneur de la composition phénoliques et flavonoïdes

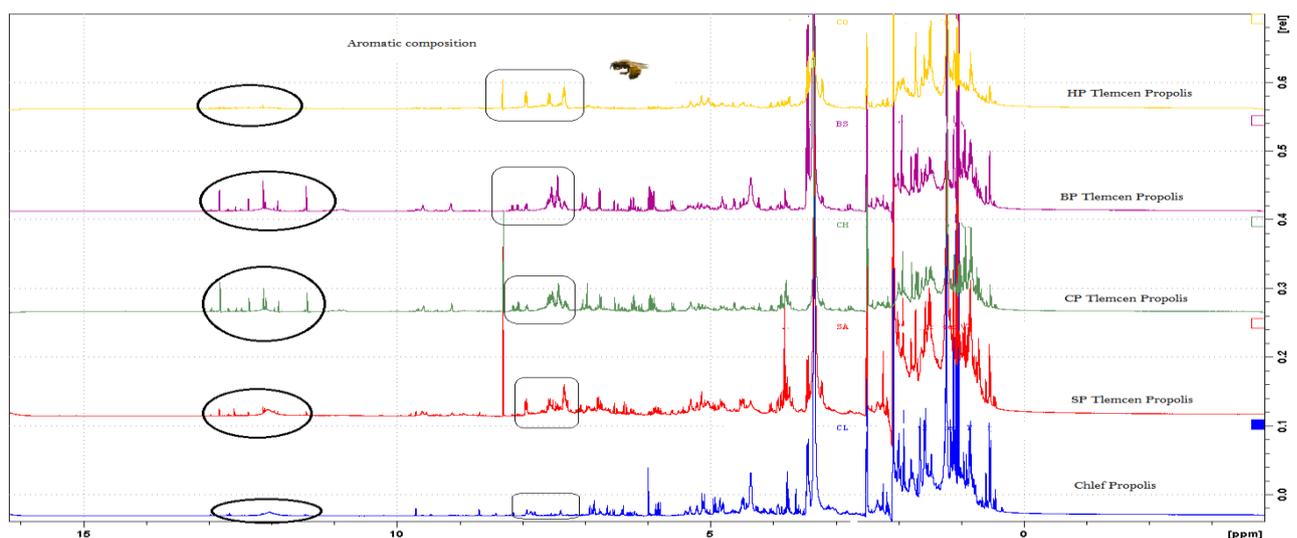


Figure 02 : les spectres RMN-H des extraits de la propolis.

- [10 - 13 ppm] : Cette région, correspond aux structures complexe, tel que les hybrides : polyphénols ou Flavonoïdes associer aux motifs saccharides. Ce qui déblinde fortement les protons jusqu'à cette intervalle.

Cette zone est presque absente dans la propolis de HP, mais des signaux intenses pour les extraits CP et BP, qui présente les mêmes signaux de propolis Tizi ouzou (Yakouren). Pour les extraits de Chlef, et SP, montrent des signaux faibles semblables à celle obtenues par l'extrait éthanolique de la propolis Saharienne (voir chapitre 1).

En comparant les différents spectres, on remarque une similitude des signaux en intensité et déplacement chimique de 0-5 ppm. La différence majeure, réside dans la partie allant de 11-13 ppm, qui correspond aux structures phénoliques et flavonoïdes. Avec des signaux intenses pour les extraits : CP, BP , SP, Chlef puis finalement HP. Une absence quasi-totale des signaux dans l'intervalle de 5-7ppm, pour l'extrait de propolis HP, ce qui se traduit par une faible quantité en composé éthylénique et aromatiques. Déjà à ce niveau, on peut conclure que la composition chimique de la propolis varie considérablement d'une région à l'autre, en se basant sur la forme et l'intensité des signaux selon les différentes parties du spectre $^1\text{H-RMN}$.

2.Etude par LC-MS l'extrait de propolis de la région de Chetouane (Tlemcen) : Afin de déterminer le produit majoritaire de l'extrait de propolis CP, nous avons effectué la HPLC-MS. Ce dernier, a été injecté sous forme de solution méthanolique à l'appareil. Donc il y a eu séparation par HPLC, puis analysé par spectromètre de masse pour donner les composés majoritaires après, comparaison avec la banque de donnée NIST.

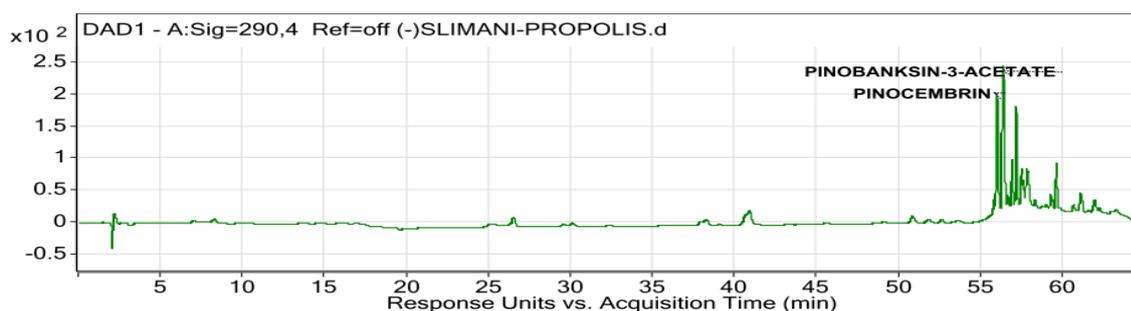
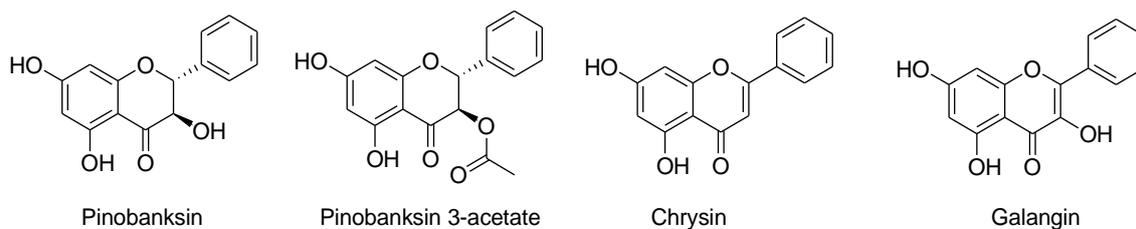


Figure 03 : HPLC de la propolis de Chetouane de Tlemcen à 290 nm.

Par comparaison, les spectres de masse des composés obtenus après séparation avec la base de donnée NIST. Nous avons identifiés les composés majoritaires suivant :



Il est important de noter, que les deux produits majoritaires à savoir ; Pinobanksine et Pinocembrine se retrouvent dans la majorité de la propolis Algérienne et d'autres régions du reste du monde³⁰ (comme la propolis de France), sauf le pourcentage qui est différent, et la chrysin (comme la propolis de Uruguay). On peut expliquer cela, par le fait que l'abeille est la seule espèce qui n'a pas eu de mutation génétique depuis sa création. Chaque propolis produite par l'abeille, n'importe où dans le monde donnera les mêmes composés³¹ à savoir : Pinobanksine, Chrysin, Glangine avec des proportions différentes. Bien sûr plus d'autres composés spécifiques à chaque région.

3. Discussion des rendements selon les différentes méthodes d'extraction : En présence de CD ? la propolis s'est vite solubilisé ce qui implique un rendement meilleur par rapport à celle réalisée en absence de la (β -CD).

Tableau 04 : les rendements de la propolis commerciale après l'extraction.

Extraits	Méthode d'extraction	Solvant	Rendements %.
PC	Froid	EtOH	63.2
PC-CD	Froid	EtOH	80.4

2. Les fractions récupérer de chaque propolis :

³⁰ C.Gurcia-Viguera, F.Ferreres, T.Barberane, Zeitschrift fur Naturforschung, 1993, 731-735.

³¹ Boisard ,S ; Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis ,Thèse de doctorat .2014.

Tableau 05 : les valeurs de RF de différents extraits de propolis.

On remarque que les régions Benisnous et Chetouane contiennent le même produit (RF=0.25, 0.26)

Système 6/4	Rf EP Chlef		Rf EP Benisnous		Rf EP Chetouane
	0.76	0.70	0.25		0.26
Système 4/6	-	-	0.34	0.25	-
Système 8/2	-	-	-	-	0.57

5. Quantité totale en polyphénols :

Le courbe étalonnage **Figure 04** (voire l'annexe) est effectuée, par l'acide gallique à différentes concentrations a été préparé avant le dosage, afin de calculer la concentration de polyphénols, qui sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec). Nous avons préparé une série de solution d'acide gallique de différentes concentrations dont les absorbances sont regroupées dans le tableau **06 (voir annexe)** les résultats sont regroupés dans le tableau, montrent une variabilité du taux de polyphénols, on remarque le teneur en polyphénols de propolis augmente en présence de β -CD, par rapport sans β -CD.

Tableau 07: teneur en polyphénols en (mg EAG/g d'extrait sec).

Propolis	P.E	P.E+ β -Cyclodextrine
Quantité en polyphénols mg/g Extrait sec	0.404	1.47
Quantité en polyphénols mg/100 g Extrait sec	40	147
Absorbance	0.434	0.708

6. Quantité totale en flavonoïdes :

Nous avons préparé une série de solution l'étalon de la rutine de différentes concentrations dont les absorbances sont regroupées dans le tableau **08** (voir annexe).

La quantité des flavonoïdes dans chaque échantillon de la propolis en équivalent de Rutine a été déduite de la courbe d'étalonnage **figure 05** (voir Annexe).

$$X = (A.m0)/(A0.m)$$

X : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent rutine /g d'extrait); A : l'absorption de l'extrait.

A_0 : l'absorption de la solution rutine. ; m : masse de l'extrait (mg) ; m_0 : masse de la rutine dans la solution.

Après la mesure de l'absorbance de la propolis commerciale PC et PC- β -CD on obtient :

Tableau 09: la quantité des flavonoïdes en équivalent en rutine pour chaque extrait de P.E.

Propolis	P.E	P.E+ β -Cyclodextrine
Quantité en flavonoïdes mg/g	0.018	0.032
Quantité en flavonoïdes mg/100 g Extrait sec	1.8	3.2
Absorbance à $\lambda=430\text{nm}$	0.263	0.474

D'après les résultats, la teneur des flavonoïdes et polyphénols totaux varient largement dans nos différents extraits de P.E, l'extrait de P.E + β -Cyclodextrine possède la plus élevée teneur en polyphénols et flavonoïdes. Ceci est en accord avec le pouvoir encapsulant de la CD à extraire plus les composés aromatiques. Résultat similaire a été trouvé par le groupe *Karathanos et Col*³², qui ont même élucidé les composés les plus influencés par l'inclusion de la CD.

7. Evaluation de l'activité antioxydante de chaque (PC-CD) et PC :

Les résultats illustrés dans la figure suivante, montre que pour l'activité antioxydante de PE + β -CD, est supérieure à celle de PE seule. La β -CD influence positivement l'activité antioxydante en l'amplifiant. Ainsi, on peut corréler entre la quantité des polyphénols et flavonoïdes élevées dans

la propolis commerciale + β -CD ce qui exprime l'augmentation de l'activité antioxydante, Et cette méthode pourra être généralisée en substance naturelle pour d'autres extraits végétaux ou bien produits de la ruche.

³² Kalogeropoulos, N. ; ,Konteles,S ; Mourtzinos,I. ; Troullidou, E. ; Chiou,A. ; Vaios T. Karathanos. ; Encapsulation of complex extracts in -cyclodextrin: Application to propolis ethanolic extract, *Journal of Microencapsulation.* , **2009** ,26 (7) , 603-613

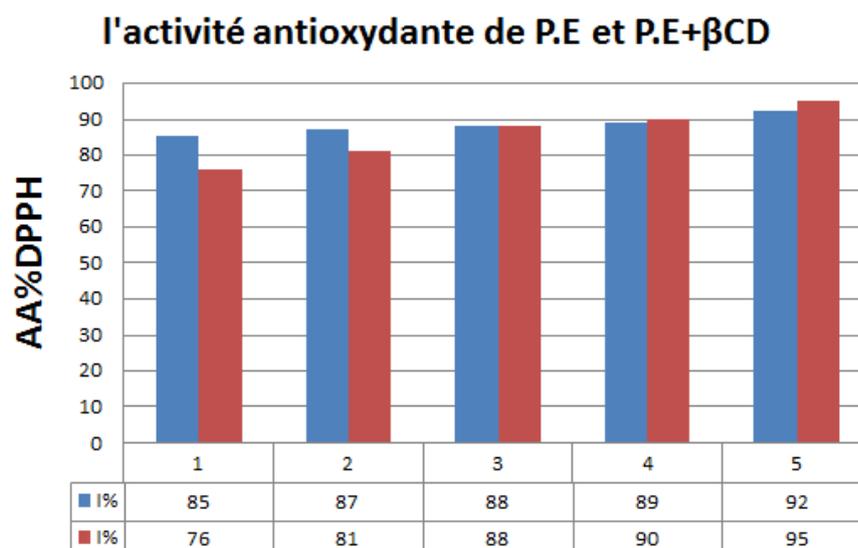


Figure 06 : Histogramme de l'activité antioxydant par DPPH.

8. Evaluation de l'activité antimicrobienne de la PC: On note que l'extrait P.C n'a pas pu inhiber la croissance de toutes les souches, les zones d'inhibition sont extrêmement sensible à l'extrait P.C vis-à vis de la bactérie *B.subtilis* (15 mm). L'inhibition est non sensible pour la bactérie *K.pneumoniae*. Aussi, 'activité antimicrobienne est presque nulle par apport à *E.coli* et *P.aeruginosa* (Tableau 10).

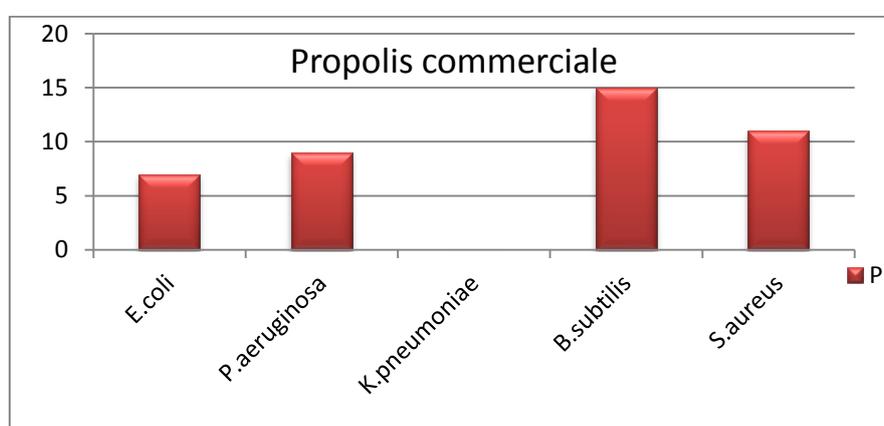


Figure0 7 : L'activité antimicrobienne de PC .

Tableau 11 : les diamètres d'inhibitions en mm de P.C

Bactéries	P
<i>E.coli</i>	7
<i>P.aeruginosa</i>	9
<i>K.pneumoniae</i>	0
<i>B.subtilis</i>	15
<i>S.aureus</i>	11

9. Est-ce que le complexe d'inclusion propolis avec β -cyclodextrine est-il formé ?

Afin de confirmer l'impact de la CD sur l'amélioration des processus de rendement et d'extraction de la propolis, nous devons prouver qu'il y a ou non complexation. Nous allons étudier dans cette partie les complexes d'inclusions par spectroscopie UV visible, puis nous allons déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion avec β -CD. On suivant, cette méthode nous permet de connaître la proportion de la molécule complexée.

9.1-Détermination de la complexation avec spectroscopie UV visible :

Dans cette partie, nous avons préparé deux solutions mères, de A. PE et β -CD avec des concentrations ($PE = 0.03 \times 10^{-3} \text{ M}$, et $\beta\text{-CD} = 2.93 \times 10^{-3} \text{ M}$), puis on a mesuré l'absorbance de chacune dans l'intervalle [190-300] nm.

Cette étape nous permet de repérer la longueur d'onde maximale. On remarque que les valeurs de l'absorbance de **A, complexe** augmente jusqu'à $\lambda(\text{nm}) = 235$, a commencé de diminuer, se qui indique l'encapsulation des composés de la propolis avec β -CD (voir tableau 12 et 13).

D'après les résultats des spectres UV, on a trouvé que la longueur d'onde maximale du complexe est de 235 nm. (Voire annexe)

Tandis pour le spectre d'A-PE- β -CD, montre l'augmentation de l'intensité de l'absorption par apport de spectre PE dans l'intervalle de [190-235nm] et [260-290nm], due à un effet hyperchrome. Alors qu'on note une diminution 235nm, due à un déplacement hypochrome. Ce changement d'absorbance est attribué à un changement de la composition libre ou encapsulé en solution apte à absorber ou non. Car la complexation des composés aromatiques de la P.E (qui absorbent fortement) par la β -CD, fait chuter l'absorbance.

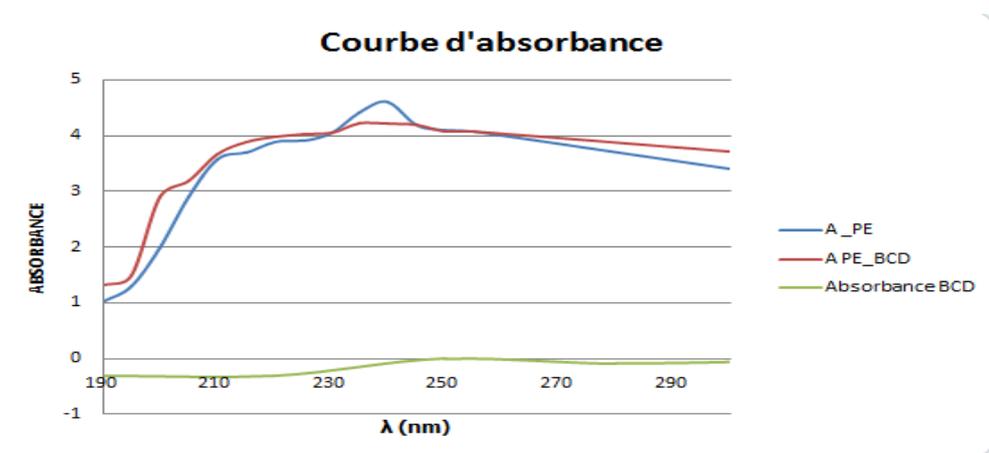


Figure 08 : spectres absorption de A .P.E, A.PE- β -CD et de β -CD.

9.2. Détermination de la stœchiométrie (Courbe de Job) :

La courbe de Job ou la méthode de variation en continu est utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion. Basée sur la courbe qui représente; les valeurs de l'absorbance en fonction des rapports molaires. On prépare 11 tubes contenant la solution du complexe P.E- β -CD de différentes concentrations, puis on mesure l'absorbance. (Voir **tableau 14**)

Un rapport r , compris entre 0 et 1, est calculé pour chaque solution préparée :

$$r = [\text{Propolis}] / [\text{Propolis}] + [\text{CD}]$$

Avec : [Propolis] : Concentration de l'extrait de la propolis commerciale, [CD] : Concentration en CD, r : la fraction molaire de la molécule invitée ($0 < r < 1$).

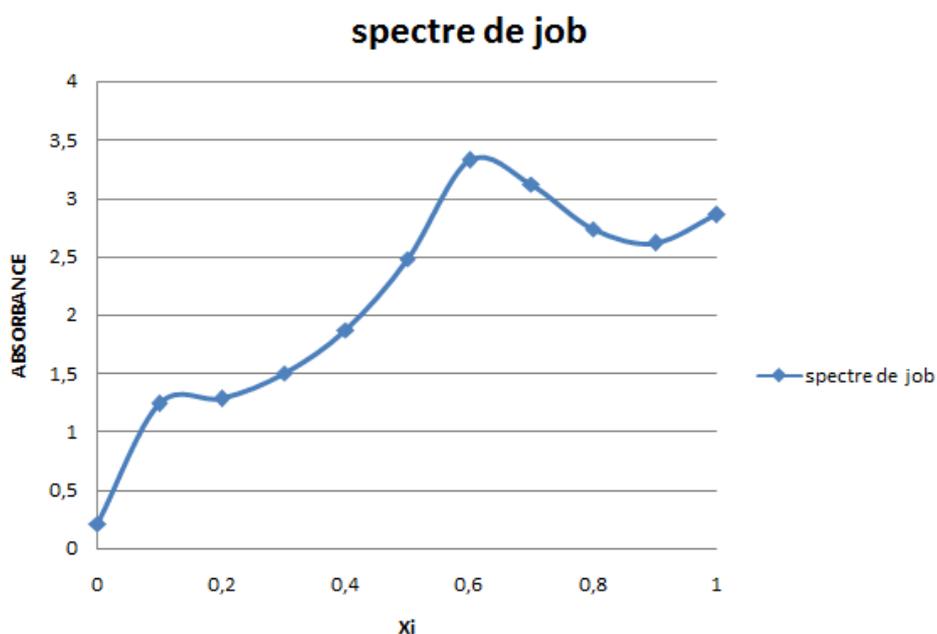


Figure 09: courbe de job du complexe A-PE- β -CD.

Le maximum de la courbe de Job est de 0,6, ce qui montre qu'il y a eu formation d'un complexe d'inclusion de type hôte: invité **2 :1**. Ceci implique l'encapsulation d'une molécule de la propolis par deux molécules de cyclodextrine. Ce qui est logique pour des molécules complexes, ou bien deux molécules de cyclodextrines avec deux molécules différentes, ce qui est possible ; puisque la solution contient plusieurs molécules invitées compétitives. Il est important de noter, que la complexation prend du temps pour atteindre l'équilibre, des fois des jours, des semaines ou bien des mois.

Conclusion générale :

Le travail que nous avons réalisé, dans le but de découvrir des nouvelles molécules bioactives à partir de la propolis l'un des produits les plus complexes de la ruche, car contient différentes substances naturelles. On conclut, d'après les analyses de H-RMN et HPLC-MS, que la propolis de l'Algérie est riche en plusieurs substances naturelles, et varie selon la région. En finale, nous avons étudié l'effet de l'encapsulation par les β -CD avec la propolis, qui ont l'avantage de former des composés d'inclusions de type hôte-invité avec un grand nombre de molécules.

Perspectives :

Dans la continuité de ce travail, l'étude de la composition de la propolis de plusieurs régions d'Algérie. L'analyse des produits isolés par RMN 1D et 2D, ainsi d'approfondir l'impact de l'utilisation de la β -CD dans les différents processus d'extractions.

Nous espérons aussi d'étudier par RMN-H la complexation de la propolis avec plusieurs types de CD (α et γ).

Annexe

Tableau 06 : Absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations :

[a. gallique] mg/ml	0,006	0,01	0,012	0,02	0,05	0,06
A	0,404	0,468	0,503	0,555	0,879	1,01

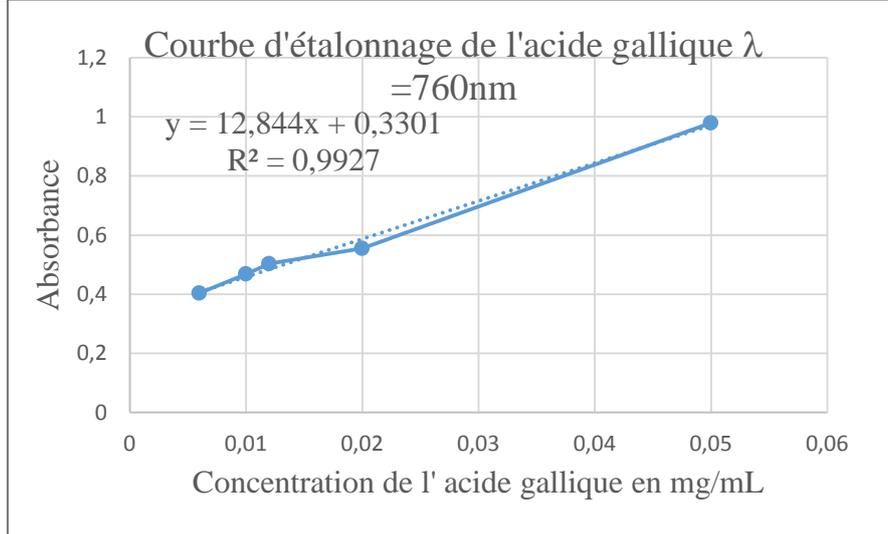


Figure 04 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Tableau (08) : Absorbance de la Rutine à différentes concentrations :

C (mg/mL)	0.002	0.004	0.006	0.010	0.012
A	0.224	0.338	0.404	0.468	0.503

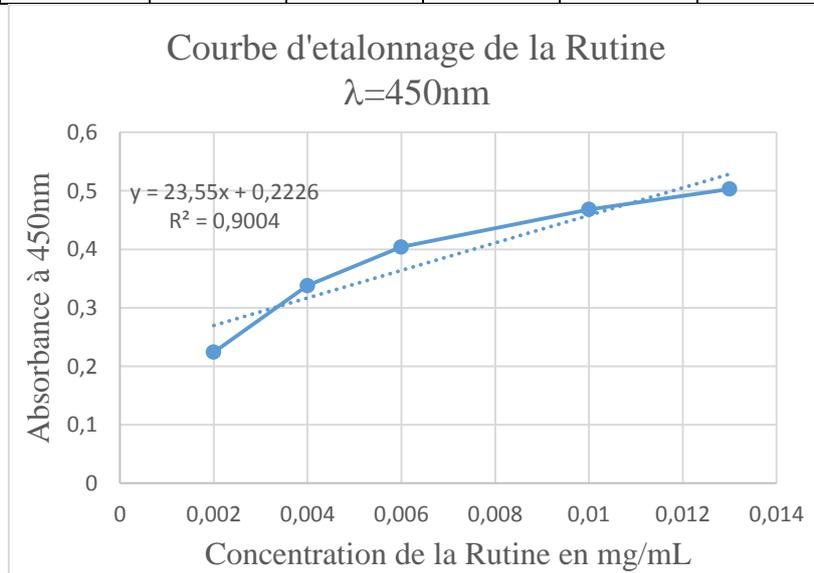


Figure 05 : courbe d'étalonnage de la Rutine.

Tableau 01: l'activité antioxydante de P.C et P.C-β CD .

concentrations	absorbance de P.C	I%	absorbance de P.C –β CD	I%
3,125 ×10-3	0,108	85	0,149	76
6,25.×10-3	0,094	87	0,147	81
0,0125	0,088	88	0,09	88
0,025	0,078	89	0,077	90
0,05	0,056	92	0,036	95

Tableau 12: les absorbances de la β-Cd dans le domaine UV-visible.

λ(nm)	A-β-cyclodextrine
190	-0,3
220	-0,3
250	0
280	-0,09
310	-0,056
340	-0,045
350	-0,038

Tableau 13: absorbance UV de PE, β CD et du complexe PE –β CD.

λ (nm)	Absorbance, PE	A, complexe
190	1,028	1,323
195	1,291	1,483
200	1,993	2,894
205	2,904	3,18
210	3,572	3,67
215	3,693	3,888
220	3,886	3,977
225	3,91	4,027
230	4,051	4,056
235	4,414	4,215
240	4,602	4,201
245	4,18	4,18
250	4,097	4,066
255	4,062	4,061
300	3,394	3,708

Tableau 14: les valeurs de l'absorbance du complexe A-PE-β-CD à différentes concentrations.

N° tubes	V A.P E μl	V A-β-CD μl	[A. –PE] M ×10 ⁻³ mg/ml	[A-β-CD] M ×10 ⁻³ mol/ml	Xi	Absorbance λ=235
1	0	2000	0	2.93	0	0.212
2	200	1800	0.03	2.637	0.1	1.235
3	400	1600	0.06	1.465	0.2	1.281
4	600	1400	0.09	2.091	0.3	1.498
5	800	1200	0.12	1.758	0.4	1.874
6	1000	1000	0.15	0.1465	0.5	2.476
7	1200	800	0.18	0.172	0.6	3.324
8	1400	600	0.21	0.879	0.7	3.118
9	1600	400	0.24	0.586	0.8	2.735
10	1800	200	0.27	0.293	0.9	2.612
11	2000	0	0.03	0	1	2.853



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

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEM

ABSTRACT:

Propolis is a sticky, resinous natural substance harvested by worker bees. Its chemical composition depends on the harvesting area (botanical source) which reflects the difference in their therapeutic activity. The literature is poor, concerning the study of the chemical composition of Algerian propolis. This led us to take an interest in an NMR study to determine the characteristic compounds of Algerian propolis. Then we are interested, in the following to study the stability of B-cyclodextrin inclusion complexes with propolis.

Keywords: propolis, cyclodextrin, inclusion Complex, NMR Spectroscopy.

RESUME :

La propolis est une substance naturelle récoltée par les abeilles ouvrières. Sa composition chimique est variée dépend de la zone de récolte (source botanique) ce qui reflète la différence de leur activité thérapeutique. La littérature est pauvre, concernant l'étude de la composition chimique de la propolis Algérienne. Ceci nous amène à s'intéresser à une étude par RMN – H afin de déterminer les composés caractéristiques de la propolis Algérienne. Puis nous sommes intéressés, dans la suite D'étudier la stabilité des complexes d'inclusion B-cyclodextrine avec la propolis.

Mots clés : propolis, cyclodextrine, complexe d'inclusion, spectroscopie ¹H-RMN.

ملخص :

العكبر هي مادة طبيعية لزجة وراتنجي يحصدها النحل العامل. يعتمد تركيبها الكيميائي على منطقة الحصاد (المصدر النباتي) الذي يعكس الفرق في نشاطها العلاجي. الأعمال العلمية قليلة فيما يتعلق بدراسة التركيب الكيميائي للعكبر الجزائري. مما قادنا هذا إلى الاهتمام بدراسة الرنين المغناطيسي النووي لتحديد المركبات المميزة للعكبر الجزائري. ثم قمنا في ما يلي بدراسة استقرار مركبات إدراج بيتا-سيكلوديكسترين مع العكبر.

الكلمات المفتاحية: العكبر، سيكلوديكسترين، مركبات الإدراج، الرنين المغناطيسي.

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)
Tlemcen- Algérie
ANNÉE 2018 – 2019