



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

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**MASTER EN CHIMIE**

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

**Mme IMANE BELGROUM**

Sur le thème

---

## **Purification, Isolement de Produits et Analyse des Extraits de la Propolis**

---

Soutenu publiquement le 07 Juillet 2021 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr ARRAR Zouheir  
Mme KENICHE Assia  
Mr SELKA Adil  
Mr TALHI Oualid

Professeur  
Maitre de Conférences A  
Maitre de Conférences A  
Maitre de Recherche A

Université de Tlemcen  
Centre Universitaire de Maghnia  
Université de Tlemcen  
Centre de Recherche CRAPC

Président  
Encadrante  
Examineur  
Co-encadrant

*Année Universitaire : 2020 ~ 2021*

## RÉSUMÉ

La propolis est étudiée pour ses propriétés médicinales. C'est une substance naturelle possédant des propriétés pharmacologiques importantes. Ses multiples effets thérapeutiques justifient son potentiel de développement de produits destinés à la santé humaine et même animale. Ce travail consiste en l'extraction, l'isolement, et l'analyse de plusieurs échantillons de propolis de l'ouest algérien afin d'identifier les composés bioactifs présents. Une étude comparative de l'effet antioxydant des différents échantillons a aussi été menée. Enfin, ce travail vise à contribuer au savoir sur la propolis algérienne et à sa valorisation.

**Mots clés:** Propolis algérienne; extraction par ultrasons; composition chimique; activité antioxydante

## ABSTRACT

Propolis is mainly studied for its medicinal properties. It is a natural substance with observable pharmacological properties. Its different therapeutic effects justify its importance for the development of products for human and animal health. This work consists of the extraction, isolation, and analysis of several samples of propolis from western Algeria in order to identify bioactive compounds. A comparative study of the antioxidant effect of the different samples was also carried out. This work aims to contribute to the body of knowledge about Algerian propolis.

**Keywords:** Algerian propolis; antioxidant activity; chemical composition; ultrasound assisted extraction

## ملخص:

تمت دراسة البروبوليس بشكل أساسي لخصائصه الطبية. إنها مادة طبيعية لها خصائص دوائية يمكن ملاحظتها. تبرز آثاره العلاجية المختلفة أهميته في تطوير منتجات لصحة الإنسان والحيوان. يتكون هذا العمل من استخراج وعزل وتحليل عدة عينات من البروبوليس من غرب الجزائر من أجل التعرف على المركبات النشطة بيولوجيا. كما تم إجراء دراسة مقارنة للتأثير المضاد للأكسدة للعينات المختلفة. يهدف هذا العمل إلى المساهمة في جسم المعرفة حول العكبر الجزائري.

**كلمات مفتاحية:** العكبر الجزائري ؛ النشاط المضاد للأكسدة ؛ الاستخراج بمساعدة الموجات فوق الصوتية ؛ تكوين كيميائي

## ***DÉDICACE***

*A mes chers parents,*

*Ma chère fille,*

*Mes chères sœurs,*

*Et mon cher mari,*

*A toute la famille, mes beaux parents, mes amis,*

*A ceux et celles qui m'ont aidé et cru en moi,*

*Ce travail vous est dédié.*

## **REMERCIEMENTS**

*En tout premier lieu, je remercie Allah, le tout puissant, de m'avoir donné la force pour suivre mes études et réaliser ce travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de mémoire, Dr Keniche Assia. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

*Je remercie le directeur du laboratoire COSNA Pr.Djabou Nassim, de m'avoir accueilli dans le laboratoire et tous les doctorantes pour leur aide, spécialement Melle Soltani Yasmine.*

*Je remercie Pr.C.Ziani Cherif du laboratoire LCSO pour les analyses RMN et Pr.S.Ghanem du laboratoire LASNABIO pour les analyses IR.*

*J'adresse mes sincères remerciements à tous mes enseignants qui par leurs paroles, leurs conseils, et leurs critiques m'ont guidé et m'ont montré le chemin.*

*Je remercie mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi.*

*Je remercie mes sœurs pour leurs encouragements.*

*Enfin, je remercie ma petite fille d'avoir veillé à mes côtés, et mon mari.*

## Liste Des Abréviations

**CC** : Chromatographie sur colonne

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**DAD** : Diode array detector

**DPPH** : Diphénylpicrylhydrazyle

**FRAP** : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter

**GC/MS** : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**HPLC ou CLHP** : Chromatographie liquide haute performance

**ME** : Extraction assistée par micro-onde

**mg EAG/g ES** : Milligramme équivalent Acide Galique par gramme Echantillon Sec

**MS ou SM** : Spectrométrie de masse

**PA** : Propolis Algérienne

**PB** : Propolis Benisnous

**PC** : Propolis Chouli

**PC1** : Produit pur isolé de Propolis Chouli

**PT** : Propolis Tirni

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**SE** : Soxhlet Extraction

**S<sub>m</sub>PB** : Solution mère Propolis Benisnous

**S<sub>m</sub>PC** : Solution mère Propolis Chouli

**S<sub>m</sub>PT** : Solution mère Propolis Tirni

**UE** : Extraction assistée par ultrasons

**UV** : Ultraviolet

## **Liste Des Tableaux**

Tableau 1 : Les activités de la propolis et leurs biens faits sur la santé

Tableau 2 : Les rendements des extraits de la propolis par différentes méthodes d'extraction.

Tableau 3 : Proportions d'éluant des extraits de propolis

Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des extraits de propolis

Tableau 5 : Quantité des polyphénols totaux des extraits de propolis

Tableau 6 : Quantité des flavonoïdes totaux des extraits de propolis

## Liste Des Figures

Figure 1 : Produits isolés par chromatographie sur plaque en verre

Figure 2 : Tests phytochimiques

Figure 3 : Principe de la méthode DPPH

Figure 4 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait PB

Figure 4 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait PC

Figure 5 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait PT

Figure 6 : Principe de FRAP

Figure 7 : Plaque CCM - élution [7 :3]

Figure 8 : Plaque CCM – élution [8 :2]

Figure 9 : Révélation par solution permanganate de potassium et vanilline .

Figure 10 : Spectre 1H-RMN PC1

Figure 11 : Spectre 13C-RMN, DEPT 90, DEPT 135 PC1

Figure 12 : Spectre 13C-RMN PC1

Figure 13 : Structure proposé Octadecyl hexadecanoate.

Figure 14 : Activité antioxydante des extraits de Propolis

Figure 15 : Absorbances des extraits de Propolis-méthode FRAP

## **Liste Des Annexes**

- Annexe 1 : Les principaux composants de la propolis
- Annexe 1.1 : Les principaux flavonoïdes présents dans la propolis
- Annexe 1.2 : Les principaux flavonoïdes présents dans la propolis
- Annexe 1.3 : Les principaux polyphénols présents dans la propolis
- Annexe 1.4 : Les principaux terpènes présents dans la propolis
- Annexe 1.5 : Les principaux composants de la propolis du nord algérien
- Annexe 2 : Propriétés thérapeutiques de la propolis
- Annexe 2.1 : Activités biologiques de la propolis
- Annexe 2.2 : Composés bioactifs et efficacité biologique de la propolis
- Annexe 3 : Courbes d'étalonnage
- Annexe 3.1 : Courbe d'étalonnage acide gallique
- Annexe 3.2 : Courbe d'étalonnage rutine
- Annexe 4 : Absorbance des solutions filles
- Annexe 4.1 : Absorbance des solutions filles de l'acide gallique
- Annexe 4.2 : Absorbances solutions fille de rutine
- Annexe 4.3 : Absorbances solutions filles d'acide ascorbique
- Annexe 5 : Méthode DPPH
- Annexe 5.1 : Absorbance des solutions filles PC
- Annexe 5.2 : Absorbance des solutions filles PB
- Annexe 5.3 : Absorbance des solutions filles PT
- Annexe 6 : Méthode FRAP
- Annexe 6.1 : Absorbance des solutions filles PC
- Annexe 6.2 : Absorbance des solutions filles PB
- Annexe 6.3 : Absorbance des solutions filles PT
- Annexe 7 : Dosage des polyphénols et flavonoïdes
- Annexe 7.1 : Dosage polyphénols absorbance solutions filles
- Annexe 7.2 : Dosage flavonoïdes absorbance solutions filles

## Annexe 8 : Matériels et Méthodes

Annexe 8.1 : Echantillon de propolis brut

Annexe 8.2 : Filtration des macérât

Annexe 8.3 : Extraction sous ultrasons

Annexe 8.4 : Extraction au Soxhlet

Annexe 8.5 : Extrait de propolis

Annexe 8.6 : Elution –chromatographie sur colonne

Annexe 8.7 : Fractions récupérées

## Sommaire

Introduction Générale .....	1
Problématique .....	1
Objectifs .....	1

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I. Chapitre I: Généralités sur la Propolis</b>	
I. 1. Un aperçu de la Propolis dans l'histoire .....	3
I. 2. La composition chimique de la propolis .....	3
I. 3. La propolis algérienne .....	3
I. 4. Propriétés biologiques de la propolis .....	4
I. 5. Propriétés thérapeutiques de la propolis .....	4
I. 6. La propolis dans la santé bucco-dentaire .....	6
I. 7. La Propolis et le SARS-CoV-2 .....	6
I. 8. Conclusion .....	7
<b>II. Chapitre II: Extraction, Isolement, et Identification des Composés Bioactifs de la Propolis</b>	
II. 1. Introduction .....	9
II. 2. Méthodes d'extraction de la Propolis .....	9
a. L'extraction par macération .....	10
b. L'extraction assistée par micro-ondes (ME) .....	10
c. L'extraction par ultrasons (UE) .....	10
d. L'extraction au Soxhlet (SE) .....	10
II. 3. Isolation des composés biologiquement actifs de la Propolis .....	10
II. 4. Identification des composés biologiquement actifs de la Propolis .....	11
II. 5. Conclusion .....	12

### PARTIE EXPERIMENTALE

<b>III. Chapitre III: Matériels et Méthodes</b>	
III. 1. Introduction .....	14
III. 2. Indications générales .....	14
a. Chromatographie sur couche mince .....	14
b. Analyse UV-visible .....	15
c. Chromatographie sur colonne .....	15
d. Analyse par RMN .....	15
III. 3. Présentation d'échantillons de propolis .....	15
III. 4. Procédés d'extraction des échantillons de propolis .....	15
a. Macération à froid .....	15
b. Extraction sous ultrasons .....	15
c. Extraction au Soxhlet .....	16
III. 5. Méthodes chromatographiques .....	16
a. Chromatographie sur colonne .....	16

b.	<i>Chromatographie sur plaque en verre</i>	.....	17
<b>III. 6.</b>	<b>Identification des composés bioactifs des extraits de propolis</b>	.....	17
a.	<i>Criblage phytochimique</i>	.....	17
b.	<i>Révélation sur plaque CCM</i>	.....	18
b.1	<i>Solution de vanilline</i>	.....	18
b.2	<i>Solution de permanganate de potassium</i>	.....	18
<b>III. 7.</b>	<b>Evaluation de l'activité antioxydante</b>	.....	19
a.	<i>Le test DPPH</i>	.....	19
a.1	<i>Protocole expérimental</i>	.....	19
a.2	<i>Calcul des IC<sub>50</sub></i>	.....	20
b.	<i>Le test FRAP</i>	.....	21
b.1	<i>Protocole expérimental</i>	.....	22
<b>III. 8.</b>	<b>Dosage des polyphénols et flavonoïdes</b>	.....	22
a.	<i>Protocoles de dosage polyphénols</i>	.....	22
b.	<i>Protocoles de dosage flavonoïdes</i>	.....	23
b.1	<i>Principe</i>	.....	23
b.2	<i>Protocol expérimental</i>	.....	23
<b>IV.</b>	<b>Chapitre IV: Résultats et Discussions</b>		
<b>IV. 1.</b>	<b>Introduction</b>	.....	26
<b>IV. 2.</b>	<b>Les rendements des extraits de la propolis par différentes méthodes d'extraction</b>	.....	26
<b>IV. 3.</b>	<b>Système d'éluant pour chromatographe sur colonne</b>	.....	27
<b>IV. 4.</b>	<b>Criblage phytochimiques</b>	.....	28
<b>IV. 5.</b>	<b>Révélation sur couche mince</b>	.....	29
<b>IV. 6.</b>	<b>Analyse par RMN des composés bioactifs des extraits de Propolis</b>	.....	29
<b>IV. 7.</b>	<b>Dosage des polyphénols et flavonoïdes</b>	.....	32
a.	<i>Détermination de la quantité des polyphénols totaux</i>	.....	32
b.	<i>Détermination de la quantité des flavonoïdes totaux</i>	.....	33
<b>IV. 8.</b>	<b>Activité antioxydante</b>	.....	33
a.	<i>Evaluation de l'activité anti oxydante des extraits de Propolis par la méthode de DPPH</i>	.....	33
b.	<i>Evaluation de l'activité anti oxydante des extraits de Propolis par la méthode de FRAP</i>	.....	34
	<b>Conclusion Générale</b>	.....	37
	<b>Perspective</b>	.....	37
	<b>Annexe</b>	.....	38
	<b>Bibliographie</b>	.....	61

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Introduction Générale**

## **Introduction Générale**

La propolis est un produit résineux composé d'un mélange de différentes parties végétales et de molécules sécrétées par l'abeille. Ses différents effets thérapeutiques justifient son potentiel de développement de produits destinés à la santé. Ce travail vise à contribuer à la valorisation de la propolis algérienne. Le premier chapitre contient une brève revue de la littérature publiée sur la propolis en général et la propolis Algérienne en particulier. Le deuxième chapitre passe en revue des méthodes d'extraction, d'isolement, et d'indentification des composés chimiques de la propolis. Le troisième et dernier chapitre expose le travail effectué dans cette étude, les résultats, ainsi que les discussions.

## **Problématique**

L'activité biologique de la propolis Algérienne présente des résultats assez encourageants de par ses propriétés antimicrobiennes et antibactériennes. Les travaux réalisés sur la propolis Algérienne soulignent sa composition chimique différente et riche en composés bioactifs. Dans l'industrie pharmaceutique, il existe une panoplie de médicaments qui s'attaquent aux bactéries, au virus, ou aux champignons. L'utilisation répétée de ses médicaments a créé une sorte de résistance. La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. D'autre part, l'émergence de nouvelles maladies et virus comme le SARS-CoV-2 requière des traitements qui sont sûrs et potentiellement capables d'inhiber ce virus, de réduire sa viralité, et d'atténuer ses symptômes. Dans cette optique, la propolis et ses composants apparaissent comme des potentiels candidats qui pourraient aider à réduire les conséquences physiopathologiques de l'infection par le SRAS-CoV-2 ou autre infection<sup>1</sup>.

## **Objectifs**

Notre étude a pour objectif la découverte de nouvelles substances actives à partir de la propolis de plusieurs régions de l'Algérie comme suit:

- Extraction de la propolis de différentes régions.
- Purification et isolation des composés par chromatographie sur colonne.
- Etude par RMN de quelques produits isolés.
- Comparaison entre l'activité antioxydante de la propolis de plusieurs régions.

---

<sup>1</sup> Bachevski, D., Damevska, K., Simeonovski, V., & Dimova, M.. Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, **2020**, 33(4), e13780.

# **Chapitre I**

## **Généralités sur la Propolis**

### **I. 1. Un aperçu de la propolis dans l'histoire**

L'apithérapie est la science et l'art de maintenir la santé en utilisant des produits obtenus à partir de ruches d'abeilles, comme le miel, le pain d'abeille, le venin d'abeille, le pollen d'abeille, la gelée royale et la propolis. Les humains pratiquent l'apiculture depuis au moins 8 500 ans<sup>2</sup>.

### **I. 2. La composition chimique de la propolis**

La propolis est composée principalement de résine (50%), de cire (30%), huiles essentielles (10%), pollen (5%) et autres composés organiques (5%)<sup>3</sup>. Les composés organiques importants présents dans la propolis sont les composés phénoliques, les esters, les flavonoïdes, les terpènes, les bêta-stéroïdes, les aldéhydes aromatiques et les alcools<sup>4</sup>. Elle contient principalement quatorze flavonoïdes différents – la Pinocembrine, la Fesitin, l'Acacétine, la Chrysin, la Genisteine, la Lutéoline, le Kaempférol, l'Apigénine, la catéchine, la Naringénine, la Galangine et la Quercétine - (Annexe 1.1 ; Annex 1.2), ainsi que deux acides phénoliques (acide caféique et acide cinnamique) et un dérivé de stilbène appelé resvératrol ont été détectés dans des extraits de propolis par électrophorèse de zone capillaire<sup>5</sup>.

Des composés phénoliques tel que le 2,2-diméthyl-8-prenylchromène, le 4-hydroxy-3,5-diprenyl cinnamic acid (artepillin C), la propolis benzofuran, et la Kaempferide (Annexe 1.3). Des terpènes sont aussi présents dans la composition chimique de la propolis. On y trouve aussi de l'isocupressic acid, a labdane diterpénoid, 3C-symphoreticolic acid, a clerodane diterpénoid, et le farnesol, a sesquiterpénoid (Annexe 1.4).

La propolis contient également des vitamines importantes, telles que les vitamines B1, B2, B6, C et E et des minéraux utiles tels que le magnésium (Mg), calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), cuivre (Cu), zinc (Zn), manganèse (Mn) et fer (Fe)..

### **I. 3. La propolis Algérienne (PA)**

La propolis Algérienne a récemment commencé à faire l'objet de beaucoup d'études et d'intérêt scientifique de par sa différence naturelle. Par conséquent, les informations

---

<sup>2</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

<sup>3</sup> Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. . Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41(4), 1220-1234.

<sup>4</sup> Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, **2014**, 19(12), 19610-19632.

<sup>5</sup> Volpi, N. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **2004**, 25(12), 1872-1878.

concernant sa composition chimique, ses origines phytochimiques et ses propriétés phytothérapeutiques sont encore limitées. L'extrait de propolis collecté dans le nord-est de l'Algérie (Jijel) réduit les effets toxiques in vivo de la doxorubicine induits par les stress oxydatifs<sup>6</sup>. De plus, la propolis Algérienne représente un agent de contrôle efficace de la cascade protéolytique impliquée dans plusieurs troubles pathologiques (polyarthrite rhumatoïde, parodontite et athérosclérose).

Les flavonoïdes, tels que l'acacétine, la génistéine, et la chrysin, le pinostrobine chalcone et dérivés d'acide caféique ont été identifiés comme constituants d'échantillons prélevés dans le nord-est de l'Algérie<sup>7</sup>. L'étude comparative de plusieurs échantillons de propolis du nord Algérien a aussi révélé une consistance en diterpènes tels que l'acide cupressique, l'agathadiol, et la cistadiol, parmi d'autres. Un aperçu des recherches effectuées sur la composition chimique de la propolis du nord Algérien (Jijel, Constantine, et Tizi Ouzou) est proposé dans l'annexe 1.5, afin d'aider à une meilleure compréhension de ses composantes et potentiels<sup>6-7-8</sup>.

#### **I. 4. Propriétés biologiques de la propolis**

Les composés phénoliques contribuent aux propriétés biologiques de la propolis, y compris les activités antioxydantes, antimicrobiennes, antivirales, anti-inflammatoires, antifongiques, cicatrisantes et cardioprotectrices<sup>9</sup>. L'annexe 2 résume les efficacités biologiques de la propolis de par ses composés bioactifs<sup>10</sup>.

#### **I. 5. Propriétés thérapeutiques de la propolis**

Avec ses diverses activités biologiques (Annexe 2.1), la propolis possède différents usages thérapeutiques (Annexe 2.2). Les produits de la ruche, notamment la propolis, ont été étudiés et utilisés dans plusieurs domaines médicaux, tels que la dermatologie, l'oncologie, la

---

<sup>6</sup> Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S.. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, **2016**, *9*, 425-428.

<sup>7</sup> Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L.. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, *61*(21), 5080-5088.

<sup>8</sup> Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P.. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International journal of molecular sciences*, **2014**, *15*(2), 2327-2345.

<sup>9</sup> Sforzin, J. M.. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, **2016**, *30*(6), 894-905.

<sup>10</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H.. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

gynécologie et bien d'autres. Dans le contexte de la gynécologie par exemple, une étude menée sur l'application d'une solution aqueuse de propolis à 5% a permis de fournir des actions antibiotiques et antimycosiques, et d'améliorer le bien-être vaginal<sup>11</sup>.

En oncologie, les études ont rapporté que la propolis a un potentiel pour le traitement du cancer du sein en raison de son activité antitumorale<sup>12</sup>. Il présente également une toxicité faible ou nulle envers les cellules normales en raison de ses propriétés sélectivement toxiques<sup>13</sup>. L'effet de l'extrait éthanolique de propolis Algérienne sur la croissance tumorale du mélanome a montré que la galangine, un flavonoïde commun dans la propolis, a un potentiel assez important dans l'inhibition des cellules cancéreuses<sup>14</sup>. Le tableau suivant expose les activités de la propolis en relation à leurs bienfaits sur la santé<sup>15</sup>.

**Tableau 1** : Les activités de la propolis et leurs bienfaits sur la santé

<b>Application thérapeutique</b>	<b>Activité / Application</b>
<b>Maladie gastro-intestinale</b>	Antiparasitaire – Anti-ulcération
<b>Soins gynécologiques</b>	Antifongique – Antibiofilm
<b>Santé bucco-dentaire</b>	Antibactérien - Désinfectant Anti-gingival – Cicatrisant
<b>Traitement oncologique</b>	Anti cancer du sein – Anti cancer du poumon – Anti cancer buccal
<b>Soins dermatologiques</b>	L'acné - Métabolisme du collagène - Ulcère du pied diabétique

<sup>11</sup> Imhof, M., Lipovac, M., Kurz, C. H., Barta, J., Verhoeven, H. C., & Huber, J. C.. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *International journal of gynecology & obstetrics*, **2005**, 89(2), 127-132.

<sup>12</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H.. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

<sup>13</sup> Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., ... & Hu, F.. Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**.

<sup>14</sup> Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., & Antonicelli, F.. Algerian ethanolic extract of propolis and galangin decreased melanoma tumour progression in C57BL6 mice. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **2015**, 142(7), S294

<sup>15</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H.. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

## **I. 6. La propolis dans la santé bucco-dentaire**

La cavité buccale a une microflore bactérienne abondante et une croissance bactérienne excessive peut conduire à plusieurs conditions (maladies bucco-dentaires). Des études ont montré que la propolis peut limiter le développement de la plaque bactérienne et les agents pathogènes causant la parodontite en raison de ses propriétés antibactériennes<sup>16-17</sup>. Les solutions de propolis exercent une action cytotoxique sélectivement inférieure sur les fibroblastes de gomme humaine par rapport à la chlorhexidine. En plus de cela, les bains de bouche contenant de la propolis ont montré une efficacité dans la cicatrisation des plaies chirurgicales.

L'utilisation de la propolis dans les solutions utilisées comme bain de bouche a été ainsi encouragé. Les dentifrices à la propolis ont montré une plus grande efficacité contre la gingivite. Grâce à leur propriété bactéricide, les extraits de propolis ont également aidé à guérir l'halitose, une condition où un individu éprouve une haleine désagréable principalement en raison d'une mauvaise hygiène bucco-dentaire. Le dentifrice ou le bain de bouche à la propolis est utilisé pour sa capacité à réduire la croissance de la plaque bactérienne et de la microflore pathogène qui provoque la gingivite et la parodontite<sup>18-19</sup>.

Les préparations à base de propolis ont une large gamme d'applications dans diverses spécialités de la dentisterie. Le développement de nouvelles thérapies pour le traitement des maladies de la cavité buccale est d'une grande importance. Dans le sens où le cancer buccal est un problème de santé publique, l'utilisation de substances naturelles comme la propolis vise à rechercher une chimio-prévention avec moins d'effets secondaires. Les effets souhaitables de la propolis sur le traitement du cancer de la bouche sont la régression des tumeurs en stimulant l'immunité multicellulaire et prévenant des métastases.

## **I. 7. La Propolis et le SARS-CoV-2**

Compte tenu du grand nombre de contaminations et de décès causé par la pandémie COVID-19, il est urgent de trouver des thérapies qui peuvent aider à éviter ou réduire l'infection par le

---

<sup>16</sup> Sforcin, J. M.. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, **2016**, 30(6), 894-905

<sup>17</sup> Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., & Mohan, M.. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, **2010**, 2(7), 210-215.

<sup>18</sup> Sforcin, J. M.. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, **2016**, 30(6), 894-905.

<sup>19</sup> Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., & Mohan, M.. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, **2010**, 2(7), 210-215.

SRAS-CoV-2. La propolis a des effets anti-inflammatoires et immunorégulateurs avérés. Plusieurs études expérimentales et cliniques ont clairement montré que les extraits de propolis de climat tempéré présentent une activité antivirale puissante et à large spectre contre un panel diversifié de virus, tels que le HSV-1, HSV-2, virus de la grippe de type A et B, VIH, et bien d'autres<sup>20</sup>. Concernant le SRAS-Cov-2, les études sur la propolis sont encore rares mais celles disponibles sont assez prometteuses<sup>21</sup>. Il a été constaté que la chrysin et le kaempférol étaient très actifs dans l'inhibition de la réplication virale. Un autre flavonoïde important appliqué dans la recherche sur le SRAS est la quercétine associée à la vitamine C<sup>22</sup>.

## **I. 8. Conclusion**

Pour conclure, on peut dire que la propolis est prisée depuis l'antiquité parce qu'en plus d'être naturelle, elle possède des effets thérapeutiques étudiés et confirmés par les recherches modernes qui se rapportent à sa composition chimique.

---

<sup>20</sup> Scorza, C. A., Gonçalves, V. C., Scorza, F. A., Fiorini, A. C., de Almeida, A. C. G., Fonseca, M. C., & Finsterer, J.. Propolis and coronavirus disease 2019 (COVID-19): Lessons from nature. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, **2020**, *41*, 101227.

<sup>21</sup> Bachevski, D., Damevska, K., Simeonovski, V., & Dimova, M.. Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, **2020**, *33*(4), e13780.

<sup>22</sup>Hossain, K. S., Hossain, M. G., Moni, A., Rahman, M. M., Rahman, U. H., Alam, M., ... & Uddin, M. J.. Prospects of honey in fighting against COVID-19: pharmacological insights and therapeutic promises. *Heliyon*, **2020**, *6*(12), e05798.

**Chapitre II**  
**Extraction, Isolement, et Identification**  
**des Composés Bioactifs de la Propolis**

## II. 1. Introduction

Dans le présent chapitre, les méthodes d'extraction, d'isolement et d'identification rapportées dans la littérature vont être présentées.

## II. 2. Méthodes d'extraction de la Propolis

Il existe différentes méthodes d'extraction des composés biologiquement actifs de la propolis. La macération, qui est une méthode traditionnelle, nécessite des délais de 2 à 10 jours<sup>23</sup>. La polarité du solvant a une influence considérable sur le type de composés phytochimiques extraits. La plupart des substances présentes dans la propolis sont lipophobes, ainsi les meilleurs rendements d'extraction, quelle que soit la méthode utilisée, ont été obtenus dans des solvants organiques polaires comme l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane<sup>24</sup>. Le solvant de choix pour l'extraction des composés phytochimiques, de la propolis sont l'éthanol et le méthanol<sup>25-26</sup>. Les solvants polaires favorisent une meilleure extraction et par extension améliorent les propriétés antioxydantes des extraits par rapport aux solvants non-polaires<sup>27</sup>.

Les méthodes modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes (ME), l'extraction par ultrasons (UE), et l'extraction au Soxhlet, permettent une extraction rapide et efficace des composés organiques à partir de matrices naturelles solides. Ces méthodes d'extraction diffèrent principalement par le pourcentage total de composés biologiquement actifs extraits. L'extraction au Soxhlet, selon les études, possède le rendement le plus élevé quel que soit le type de solvant utilisé. Les études ont aussi démontré que l'utilisation des ultrasons et des extractions micro-ondes réduit considérablement le temps d'extraction. L'UE est particulièrement efficace car elle permet l'extraction de composants actifs et avec un minimum de cire, contrairement à la ME qui résulte en l'extraction de plus grande quantité de cire.

---

<sup>23</sup> Cunha, I., Sawaya, A. C., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., ... & Carvalho, P. D. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2004**, 15(6), 964-970.

<sup>24</sup> Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, **2020**, 25(10), 2397.

<sup>25</sup> Alday, E., Valencia, D., Garibay-Escobar, A., Domínguez-Esquivel, Z., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., ... & Velazquez, C. Plant origin authentication of Sonoran Desert propolis: an antiproliferative propolis from a semi-arid region. *The Science of Nature*, **2019**, 106(5-6), 25.

<sup>26</sup> Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, **2011**, 126(3), 1431-1435.

<sup>27</sup> Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, **2015**, 76, 449-457.

Dans son expérience Popova et al. (2007) ont congelé, broyé et homogénéisé l'échantillon total de propolis (51g) avant le début des expériences d'extraction. L'éthanol à 70% permet l'extraction des composés bioactifs de deux grammes de propolis (2g). Après extraction, l'échantillon a été filtré, et le filtrat a été dilué à 100 ml avec de l'éthanol à 70% dans une fiole jaugée. Les expériences d'extraction opérées dans son étude sont décrites en bas.

***a. L'extraction par macération***

Le matériau obtenu après filtration a été placé dans un Erlenmeyer et une quantité de solvant a été ajoutée. La macération s'est faite dans l'obscurité, pendant 72 h, à température ambiante.

***b. L'extraction assistée par micro-ondes (ME)***

L'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée en utilisant un four à micro-ondes domestique multimodal (Panasonic NN-S255W à 800 W) et un Erlenmeyer de 100 ml exposé à l'irradiation par micro-ondes (cycle d'irradiation: 10 s sous tension, puis 10 s hors tension) pendant une durée donnée.

***c. L'extraction assistée par ultrasons (UE)***

Le matériau obtenu après filtration a été placé dans un Erlenmeyer avec une quantité de solvant. L'extraction par ultrasons a été réalisée à l'aide d'un bain à ultrasons de 300 W. Un traitement avec des ultrasons à 25 ° C a été opéré pendant une durée donnée.

***d. L'extraction au Soxhlet (SE)***

Dans une étude comparative<sup>17</sup>, des échantillons de propolis (5 g) ont été placés dans un corps en verre et extraits avec une quantité de solvant (200 ml) dans un extracteur Soxhlet (pendant 6 h à la température de reflux du solvant). Pour éliminer les cires, les suspensions ont été congelées à -20 ° C pendant 24 h, puis filtrées. Les solutions ont été évaporées presque à siccité sur un évaporateur rotatif sous pression réduite à température ambiante et séchées sous vide (0,1–0,2 mmHg, 24–48 h jusqu'à atteindre un poids constant). L'étude rapporte que L'UE et la SE sont les méthodes d'extraction les plus efficaces, en tenant compte du rendement, du temps d'extraction court, et d'une sélectivité élevée. La ME, cependant, a conduit à l'extraction d'une quantité de cire significative. De plus, des durées d'irradiation plus longues peuvent entraîner une diminution du pourcentage de composants actifs extraits (processus de dégradation).

### **II. 3. Isolation des composés biologiquement actifs de la Propolis**

L'isolation des composés contenus dans la propolis se fait grâce aux techniques chromatographiques. La chromatographie sur colonne (CC) a été utilisée afin d'isoler des acides diterpéniques, des triterpènes, isoflavones, benzophénones et autres composés phénoliques contenus dans la propolis<sup>28</sup>.

Afin de comparer des échantillons de propolis ou différents extraits d'une même propolis, la chromatographie sur couche mince (CCM) est la technique la plus utilisée. Toujours, selon la littérature, La chromatographie gazeuse (CG) couplée à la spectrométrie de masse (MS) sert à l'analyse des composés volatils contenus dans la propolis.

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse est la méthode chromatographique la plus fréquente pour l'analyse de la propolis parce que les extraits de propolis sont pour la plus part solubles dans le méthanol, l'éthanol, ou les solutions hydro-alcooliques<sup>29</sup>

#### **II. 4. Identification des composés biologiquement actifs de la propolis**

L'une des méthodes d'identification sans purification antérieure s'appelle la déréplication. Elle consiste à identifier la composition de la propolis en comparant le temps de rétention des composés, les profils UV ainsi que les données de masse avec les données de la littérature scientifique. Elle nécessite des techniques chromatographiques telles que la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) couplée à un détecteur ultraviolet de type barrette de diodes (DAD-UV) afin d'obtenir le profil d'absorption et à un spectromètre de masse pour compléter les données nécessaires à l'identification par déréplication<sup>30</sup>.

La spectrométrie de masse en injection directe (ou infusion) permet la caractérisation chimique de n'importe quelle échantillon de propolis. Selon la littérature, l'ionisation électrospray en mode négatif [ESI (-)-MS] est utile à l'identification des groupements phénoliques<sup>21</sup>. La résonance magnétique nucléaire (RMN) est nécessaire pour l'identification de nouveaux composés. Cette technique nous informe sur la structure chimique des composés. Elle permet l'obtention de la structure précise à l'aide des spectres RMN 1D (1H et 13C) et 2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY, etc.)

---

<sup>28</sup> Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V.. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, **2011**, 126(3), 1431-1435.

<sup>29</sup> Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M.. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, **2020**, 25(10), 2397.

<sup>30</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*. **2014**, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

## **II. 5. Conclusion**

L'extraction des composés bioactifs contenus dans la propolis peut se faire par plusieurs méthodes. Selon la littérature, l'UE demeure la plus recommandée. L'identification de ces composés peut-être faite avec une analyse RMN, la spectrométrie de masse, LC-MS en présence des étalons ou bien en comparant avec les bases de données NIST.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

# **Chapitre III**

## **Matériels et Méthodes**

### **III. 1. Introduction**

*Ce chapitre regroupe les protocoles expérimentaux suivis dans ce travail. Il présente les méthodes qualitatives, telle que le criblage phytochimique, et quantitatives, telle que le dosage flavonoïdes et polyphénols.*

### **III. 2. Indications générales**

- a. Chromatographie sur couche mince* : La révélation des composés d'extraits de Propolis est réalisée sur des plaques d'Aluminium recouvertes de gel de silice 60 F254. La séparation des fractions de l'extrait de Propolis est effectuée sur des plaques en verre de silice SIL G-25 HR UV254
- b. Analyses par UV-visible* : Les analyses UV sont réalisées au laboratoire (COSNA) sur un spectrophotomètre Thermo-scientific Hélios.
- c. Chromatographie sur colonne* : La chromatographie sur colonne est effectuée sur une colonne en verre remplis de gel de silice 60. Plusieurs solvants et mélanges de solvants sont testés afin de sélectionner le meilleur système de séparation.
- d. Analyses par RMN* : Les spectres RMN sont réalisés sur un appareil de 60MHz, par Pr.C. Ziani Cherif au laboratoire de catalyse et synthèse en chimie organique.

### **III. 3. Présentation d'échantillon de propolis**

L'étude expérimentale est réalisée sur la propolis de Tlemcen de trois régions différentes Benisnous, Chouli et Tirni. L'échantillon se présente sous forme d'une résine (Annexe 8.1).

### **III. 4. Procédés d'extraction des échantillons de propolis**

#### *a. Macération à froid*

Tout d'abord on laisse séjourner à température ambiante et sous agitation continue l'échantillon de propolis brut (10g) dans 130 ml d'éthanol 96% pendant 7 jours dans un Erlenmayer couvert et fermer hermétiquement afin d'éviter la dégradation des composés antioxydants. Ensuite, on filtre le macérât et on évapore le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Annexe8.2 3)<sup>31</sup>.

#### *b. Extraction sous ultrasons*

---

<sup>31</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H.. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

Premièrement, on prépare dans un Erlenmayer un mélange de Propolis brut (10g) et d'éthanol (130ml). A l'aide d'un statif on fixe l'Erlenmayer et on le plonge dans un bain sonicateur de puissance 120W pendant 10 mn. Ensuite, le mélange est refroidi au congélateur à température fixe T= -20°C pendant 24h qu'on pourra par suite le filtré et l'évaporé (Annexe 8.3)<sup>32</sup>.

### *c. Extraction au Soxhlet*

On introduit la propolis brut (10 g) dans la cartouche de cellulose. Ensuite, on remplit le ballon avec une quantité suffisante d'éthanol 96% et on y ajoute quelques pierres ponce. On porte le solvant à ébullition après plusieurs cycles et jusqu'à ce que la couleur du solvant au réservoir du Soxhlet devienne transparente (de 4 à 5h) on arrête le reflux et on laisse la solution refroidir à température ambiante. Au final, on filtre et on évapore la solution (Annexe 8.4; Annexe 8.5)<sup>33</sup>.

Pour les trois méthodes d'extraction, les rendements sont calculés par la formule suivante :

$$r = \frac{m_0}{m} * 100$$

m<sub>0</sub>: masse de l'échantillon de Propolis brute en g.

m: masse de l'extrait en g

## **III. 5. Méthodes chromatographiques**

### *a. Chromatographie sur colonne*

L'isolation des composés de l'extrait de Propolis de Benisnous et Tirni est effectuée sur une colonne en verre rempli de gel de silice. L'éluant utilisé est acétate d'éthyle et éther de pétrole dans des proportions propres à chaque extrait. Ensuite, on vérifie la composition de chaque fraction séparée par la révélation UV-visible, KMNO<sub>4</sub> et Vaniline-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> des plaques CCM réalisées. Finalement, les fractions ayant montré une seule tache sur la plaque CCM lors de la révélation sont regroupées, codées et analysées par la suite (Annexe 8.6 ; Annexe 8.7)<sup>34</sup>.

---

<sup>32</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*. **2014**, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

<sup>33</sup> Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M.. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, **2020**, 25(10), 2397.

<sup>34</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*, **2014**, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

### ***b. Chromatographie sur plaques en verre***

Les fractions récupérées de la chromatographie sur colonne peuvent contenir plusieurs composés. Tenant compte de leurs quantités faibles, on peut les séparer en un seul produit par la méthode de chromatographie sur plaque en verre. Il suffit de tracer une ligne de dépôt sur la plaque en verre. Ensuite, Déposer une quantité suffisante de l'extrait de propolis à l'aide d'une pro-pipette. Laisser migrer les constituants en trompant la plaque en verre dans une cuve contenant l'éluant de séparation. Après migration on révèle les taches sous UV et on gratte les tâches séparées. Les produits isolés sont contaminés à la silice qu'il faut éliminer par filtration<sup>35</sup>.



**Figure 1 :** Produits isolés par chromatographie sur plaque en verre

## **III. 6. Identification des composés bioactifs des extraits de propolis**

### ***a. Criblage phytochimiques :***

Un test photochimique permet l'identification de différents composés présents dans un échantillon. Cette étude qualitative est basée sur des phénomènes de précipitation et/ou coloration par l'usage de réactifs-révélateurs spécifique à chaque famille de composées.

- Les alcaloïdes : on ajoute à 1 ml d'extraits 1 mL d'HCl 50 %. Ensuite, on ajoute quelque goutte du réactif du Mayer. La formation d'un précipité jaune indique la présence d'alcaloïdes<sup>36</sup>.
- Les flavonoïdes : on ajoute à 1 ml d'extraits de Propolis 1 mL d'HCL et 1 à 2 copeaux de magnésium. La coloration rouge-orangé indique la présence de flavonoïdes.

<sup>35</sup> Boisard, S. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*. 2014, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

<sup>36</sup> N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L.. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 2009, 6(1).

- Les tannins : sont vérifiées en ajoutant 1 mL d'eau distillée et quelques gouttes de  $FeCl_3$  à 1% à 1 mL d'extrait de Propolis. La coloration verte foncée de la solution indique la présence des Catéchiques.



**Figure 2 :** Tests phytochimiques

### ***b. Révélation sur plaque CCM***

La révélation sur plaque CCM à l'aide des solutions révélatrice (solution de permanganate de potassium et solution de Vanilline) est effectuée pour confirmer les résultats du criblage phytochimique<sup>37</sup>.

*b.1 Solution de vanilline :* Les composés phénoliques sont révélés par la solution de vanilline sur la plaque CCM, en laissant des tâches de couleurs rouge, orange, verte, bleue, violet ou marron.

*b.1.1 Préparation :* Dans un Erlenmeyer, on dissout 1g de vanilline dans 100 ml d'éthanol à  $T=95^{\circ}C$ . Ensuite, on place l'Erlenmeyer contenant la solution dans un bain de glace. Au final, on ajoute 2ml d'acide sulfurique concentré goutte à goutte.

*b.2 Solution de permanganate de potassium :* Cette solution permet de révéler la présence de molécules oxydables (polyphénols, flavonoïdes, alcools...etc) en laissant une tâche marron-jaunâtre. Les tâches appartenant aux molécules non-oxydables gardent la couleur violet.

*b.2.1 Préparation :* Dans un Erlenmeyer, on dissout 1,6 g de permanganate de potassium et 15 g de carbonate de sodium anhydre dans 100 ml d'eau distillée.

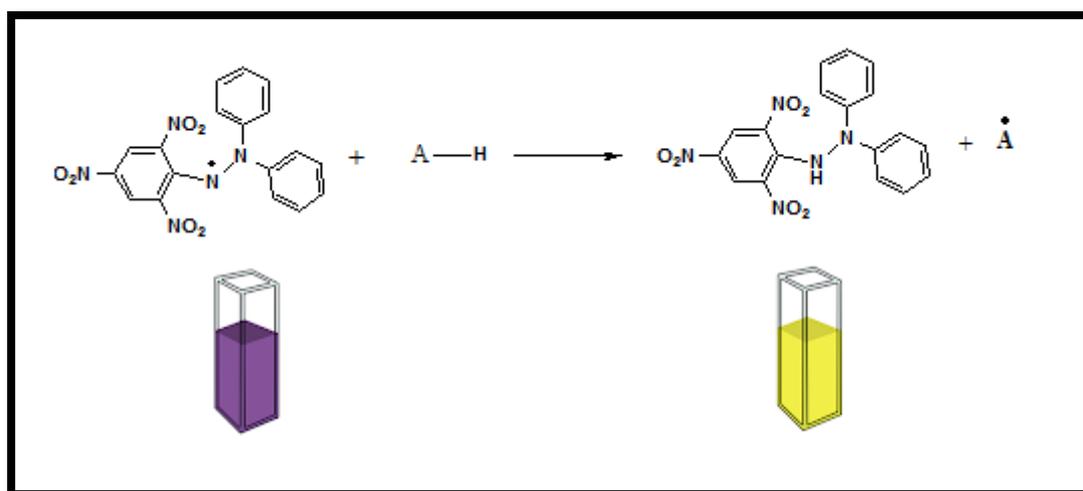
---

<sup>37</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*. 2014, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

### III. 7. Evaluation de l'activité antioxydante

#### a. Le test DPPH

Cette méthode consiste à mesurer l'effet de balayage des composés antioxydants par rapport au radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Dans une solution d'éthanol ou méthanol le radical DPPH prend une couleur violet en présence d'antioxydant le DPPH se réduit en hydrazine. Le produit formé est de couleur jaune dont l'intensité est proportionnelle à sa capacité antioxydante<sup>38</sup>.



**Figure 3 :** Principe de la méthode DPPH

#### a.1 Protocole expérimental

En premier, une solution éthanolique de DPPH est préparée en solubilisant 3 mg de 2,2-DPPH dans 50 ml d'éthanol. La solution est conservée au froid et à l'abri de la lumière afin d'éviter sa dégradation. Des solutions mères d'extraits de propolis sont préparées dont la concentration est de 100mg/ml ( $S_mPB$ ;  $S_mPC$ ;  $S_mPT$ ). A partir de ces solutions, on prépare des solutions filles par une dilution en série (Annexe 4). Pour chaque 1 ml de solution on ajoute 1ml de la solution de DPPH suivie d'une incubation de 30mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les absorbances sont mesurées à 517nm pour chaque solution par rapport aux deux solutions le blanc (2 ml de DPPH) et le témoin négatif (1ml de DPPH + 1 ml d'éthanol). Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique<sup>38</sup>.

<sup>38</sup> Talbi, H., Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A.. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *J Mater EnvironSci*, **2015**, 6, 1111-1117.

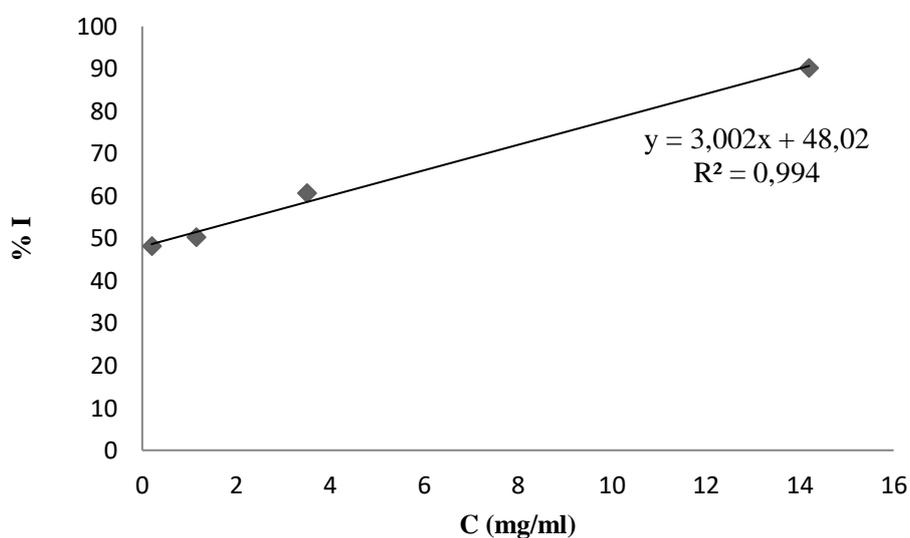
### a.2 Calcul des IC<sub>50</sub>

Ce paramètre représente la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale du radical DPPH• de 50%. Il est inversement proportionnel à la capacité antioxydante. Ainsi une valeur faible d'IC<sub>50</sub> correspond à une activité antioxydante plus importante. Les courbes d'absorbances des extraits de propolis (Figure 4 ; 5 ; 6) sont tracées en utilisant la formule suivante :

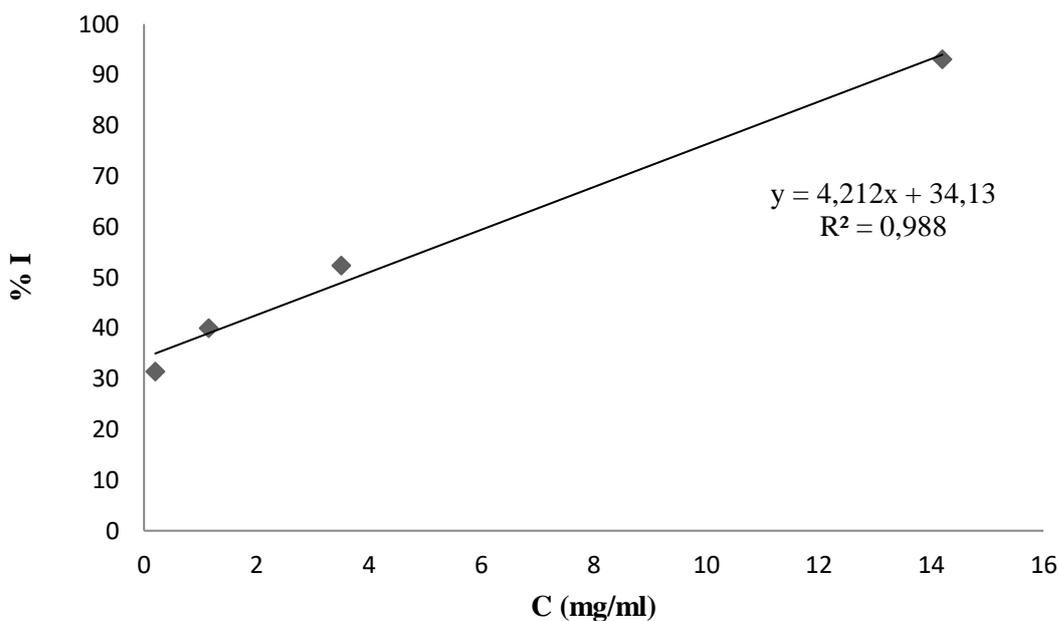
$$\%I = \frac{(A.\text{blanc} - A.\text{extrait})}{A.\text{blanc}}$$

A.blanc : Absorbance du blanc

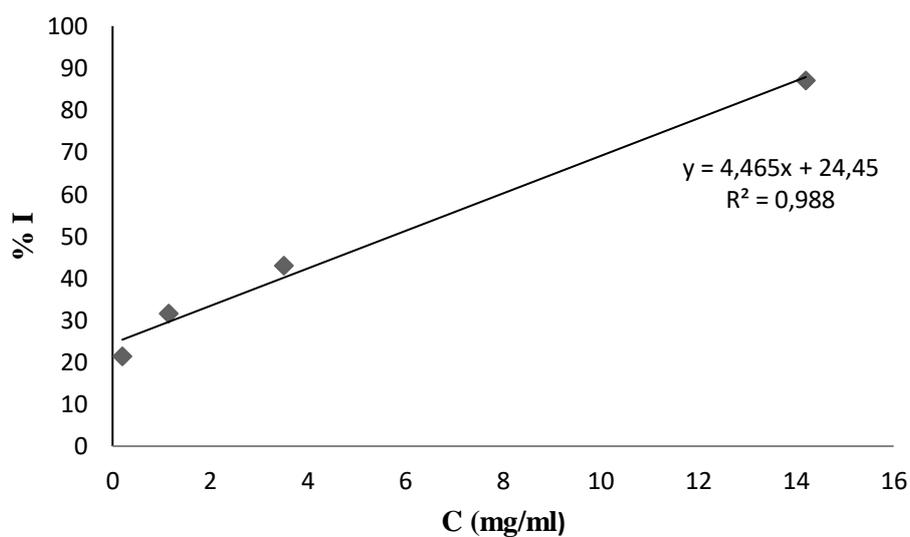
A.extrait : Absorbance de l'extrait



**Figure 4 :** Pourcentage d'inhibition de l'extrait PB. 517 nm



**Figure 5 :** Pourcentage d'inhibition de l'extrait PC. 517 nm

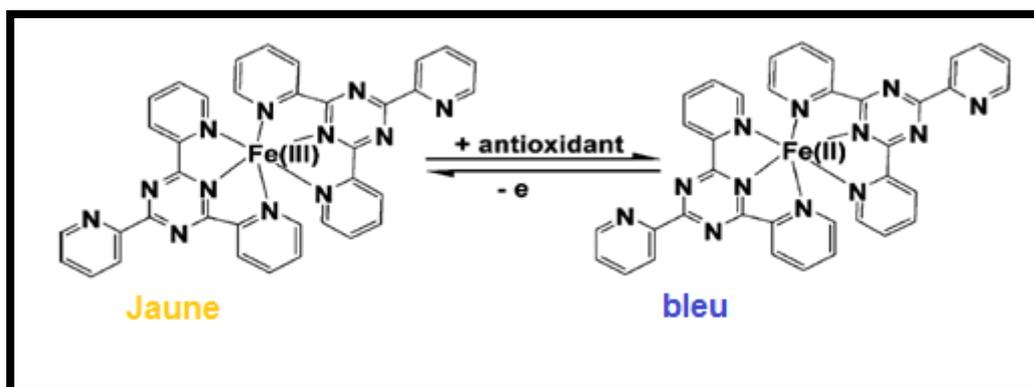


**Figure 6 :** Pourcentage d'inhibition de l'extrait PT. 517 nm

### **b. Le test FRAP**

Le dosage colorimétrique FRAP est basé sur la réduction des ions ferrique  $Fe^{2+}$  (fer 2, 4,6-tripyridyls-triazine) de couleur jaune en ions ferreux  $Fe^{3+}$  (fer 2, 4,6-tripyridyls-triazine) de couleur bleu par un transfert d'électrons en présence de composés antioxydant<sup>39</sup>.

<sup>39</sup> Achat, S.. Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. 2013, Doctoral dissertation, Université d'Avignon.



**Figure 7** : Principe de la méthode FRAP

### *b.1 Protocole expérimental*

Les solutions mères d'extraits de propolis ( $S_m$  PB=0.030 mg/ml ;  $S_m$  PC=0.030mg/ml ;  $S_m$  PT=0.028 mg/ml) sont diluées dans l'éthanol à des solutions filles (Annexe 5). Après, on ajoute à chaque 1 ml de solution fille le mélange 2.5 ml de solution tampon de phosphate et 2.5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium. L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 mn. Ensuite, on ajoute 2.5 ml de TCA pour arrêter la réaction. Au final 0,5ml de solution de FeCl<sub>3</sub> à 0,1% est ajoutée en utilisant l'eau comme solvant de dilution. L'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par l'eau distillée afin de calibrer le spectrophotomètre.

## **III. 8. Dosage des polyphénols et flavonoïdes**

### *a. Protocole de dosage des polyphénols*

*a.1 Principe* : On détermine les polyphénols totaux par spectrophotométrie en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Il s'agit d'un acide de couleur jaunâtre composé d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Le réactif se réduit durant l'oxydation des polyphénols en formant le complexe d'oxyde de tungstène de couleur

bleu. L'absorption maximale de cette couleur est de 725 nm. Elle est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits de propolis (plus la couleur bleu est foncé plus l'échantillon est riche en polyphénols). La quantité des polyphénols totaux est déduite graphiquement, en se référant à une courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique utilisée

comme standard. L'équation de la courbe (Annexe 3.1) nous permet de déduire directement la teneur en polyphénols en remplaçant Y par l'absorbance de l'extrait<sup>40</sup>.

$$t = \frac{\text{Abs}(725\text{nm}) - 0.357}{0.930}$$

t : la teneur en polyphénols (mg éq acide gallique /g d'extrait Propolis).

Abs(725nm) : absorbance de l'extrait à 725 nm

La teneur en polyphénols peut être déduite par une autre méthode, en utilisant la formule suivante :

$$t = \frac{c * V}{m}$$

t : teneur en phénols (mg d'acide gallique / g de matière sèche)

c : La concentration établie à partir de la courbe d'étalonnage en mg/mL

V : Volume de l'extrait

m : Le poids de l'extrait sec à doser en g

## ***b. Protocole de dosage des flavonoïdes***

### *b.1 Principe*

Le dosage des flavonoïdes totaux s'effectue en utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub>. Ce dernier forme des complexes d'acides stables soit avec le carbonyle ou le groupement hydroxyle des flavonoïdes<sup>40</sup>.

### *b.2 Protocol expérimental*

Tout d'abord, on ajoute 1ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% à 1 mL de l'extrait de Propolis. On agite bien le mélange jusqu'à homogénéisation. L'incubation se fait à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 10min. L'absorbance est mesurée à 450nm. Les concentrations en flavonoïdes sont déduites en se référant à une courbe d'étalonnage (Annexe 3.2) on utilisant la Rutine comme standard. L'équation de la courbe nous permet de déduire directement la teneur en flavonoïdes en remplaçant Y par l'absorbance de l'extrait comme indique la formule suivante :

---

<sup>40</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*, 2014, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

$$t = \frac{\text{Abs}(450\text{nm}) - 0.214}{18.07}$$

t : la teneur en flavonoïdes (mg éq Rutine /g d'extrait Propolis).

Abs(450nm) : absorbance de l'extrait à 450 nm

Une autre méthode de calcul peut être employée, en utilisant la formule suivante :

$$t = \frac{A * M}{Ar * m}$$

t : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).

A : l'absorption de l'extrait.

Ar : l'absorption de la rutine

m : masse de l'extrait (mg).

m<sub>0</sub> : masse de rutine dans la solution.

# **Chapitre IV**

## **Résultats et Discussions**

#### IV. 1. Introduction

Ce chapitre présente les résultats obtenus ainsi que des discussions basées sur la littérature.

#### IV. 2. Les rendements des extraits de la propolis par différentes méthodes d'extraction

L'extraction à chaud (extraction solide-liquide au Soxhlet) donne le meilleur rendement par rapport aux autres méthodes. Cependant l'extraction sous ultrasons est considérablement plus rapide, en comparant avec la macération qui donne un faible rendement et nécessite plus de temps. Les méthodes d'extraction autres que l'extraction sous ultrasons se font à la base de produits chimiques corrosives ou toxiques, telle que les solvants chlorés, alors que l'extraction sous ultrasons est une méthode d'extraction propre qui préserve l'environnement, protège la santé et garantit la sécurité au travail. Le procédé d'extraction UE est propre et vert, pouvant remplacer partiellement ou complètement l'usage des produits chimiques (solvants organiques potentiellement cancérigènes)<sup>41</sup>.

Plusieurs avantages environnementaux et économiques peuvent être tirés de cette méthode comme (1) l'amélioration du rendement d'extraction avec ou sans solvants ; (2) la possibilité d'utiliser des solvants alternatifs (GRAS) en améliorant leurs performances d'extraction. D'autre part, l'UE améliore aussi le rendement d'extraction des composants sensibles à la chaleur dans des conditions qui auraient autrement une valeur faible ou inacceptable, contrairement à l'extraction au Soxhlet qui est énergivore et toxique (usage de solvants d'extraction cancérigènes, nocives, corrosives...etc.). Les rendements d'extraction dépendent aussi des échantillons de propolis. Ainsi, la propolis de Tirni possède le rendement le plus important après la propolis de Benisnous et celle de Chouli (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Les rendements des extraits de la propolis par différentes méthodes d'extraction.

Méthodes d'extractions		
T <sub>ambiante</sub>		Reflux
Macération	Ultra son	Soxhlet

---

<sup>41</sup> Tiwari, B. K.. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, *71*, 100-109.

PB	10%	25%	67.8%
PC	31.6%	43.8%	85.2%
PT	36%	43%	97%
Temps d'extraction	7 jours	10 mn	4 à 5 h

### IV. 3. Système d'éluant pour chromatographe sur colonne

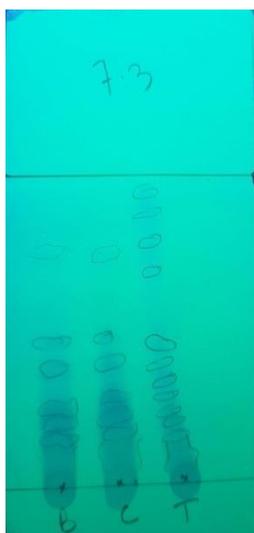
Le système d'éluant qui permet une bonne séparation de constituants est l'éther de pétrole : Acétate d'éthyle avec des proportions propre à chaque extrait. (Tableau 3 et Figure 8; 9). Les résultats montrent que la solubilité de la propolis est plus importante dans les solvants polaires (l'acétate d'éthyle), comme le rapporte les recherches<sup>42</sup>. Pour contrôler la migration des constituants de propolis, l'ajout du solvant apolaire (éther de pétrole), de ratio supérieur au solvant polaire, a permis une meilleure séparation<sup>43</sup>.

**Tableau 3** : Proportions d'éluant des extraits de propolis

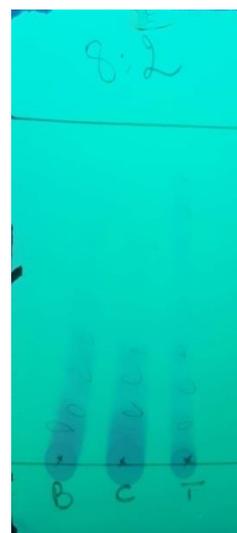
Extraits de Propolis		
PB	PC	PT
[8 :2]	[7 :3]	[7 :3]

<sup>42</sup> Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.

<sup>43</sup> Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, **2020**, 25(10), 2397.



**Figure 8** : Plaque CCM - élution [7 :3]



**Figure 9** : Plaque CCM – élution [8 :2]

#### IV. 4. Criblage phytochimiques

Les tests phytochimiques révèlent la présence de plusieurs familles de composés comme les polyphénols, flavonoïdes, tanins et terpènes. Par contre les extraits sont dépourvus d'alcaloïdes (Tableau 4). Ceci démontre une similarité de composition chimique entre la propolis provenant de plusieurs régions de Tlemcen et celle de Jijel, Constantine, et Tizi Ouzou<sup>44-45</sup>. Cette similarité est étroitement liée au climat et à la végétation dans laquelle l'abeille synthétise la propolis<sup>46-47</sup>.

**Tableau 4** : Résultats des tests phytochimiques des extraits de la propolis

	Extraits de Propolis		
	PB	PC	PT
Alcaloïdes	-	-	-

<sup>44</sup> Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L.. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, 61(21), 5080-5088.

<sup>45</sup> Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P.. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International journal of molecular sciences*, **2014**, 15(2), 2327-2345.

<sup>46</sup> Debab, M.. *Analyse pollinique et activités biologiques de la propolis de l'Ouest Algérien*. **2020**, Doctoral Dissertation, Université Sidi Bel Abbas.

<sup>47</sup> Boisard, S.. *Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis*. **2014**, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

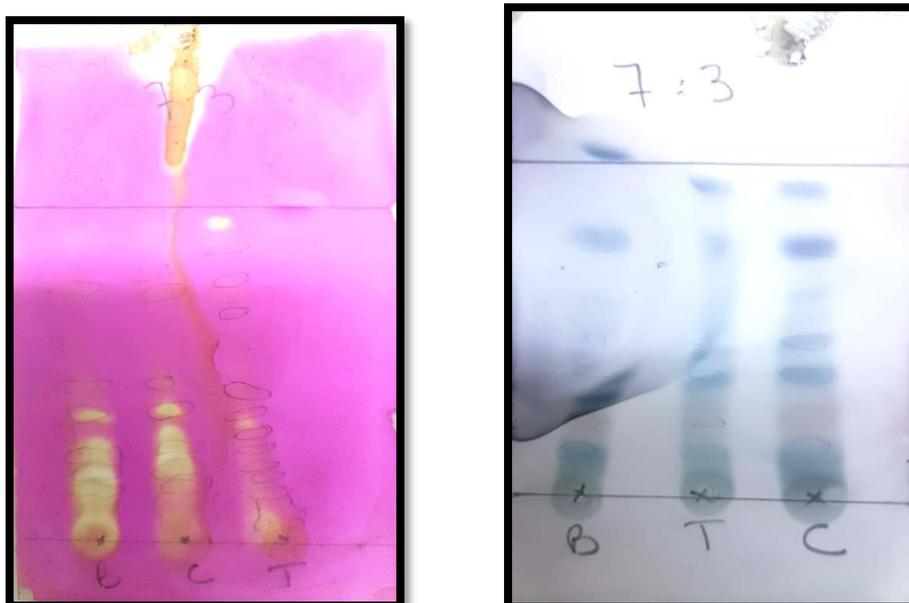
Flavonoïdes	+	+	+
Tanins	+	+	+
Terpènes	+	+	+

(+): test positif

(-) : test négatif

#### IV. 5. Révélation sur couche mince

En plus du criblage phytochimique, une autre technique d'analyse qualitative est effectuée afin de corroborer les résultats précédents. La révélation des fonctions oxydables par la solution de permanganate sous forme de taches marron –jaunâtre confirme la présence de polyphénols, flavonoïdes, et alcools (Figure 10). La solution de vanilline aussi révèle la présence d'une famille de polyphénols sous formes de taches vertes, bleues, marron, et rouges (Figure 10). Ainsi, les résultats du criblage phytochimique sont vérifiés par les résultats de la révélation sur couche mince (une composition chimique contenant des flavonoïdes et polyphénols).

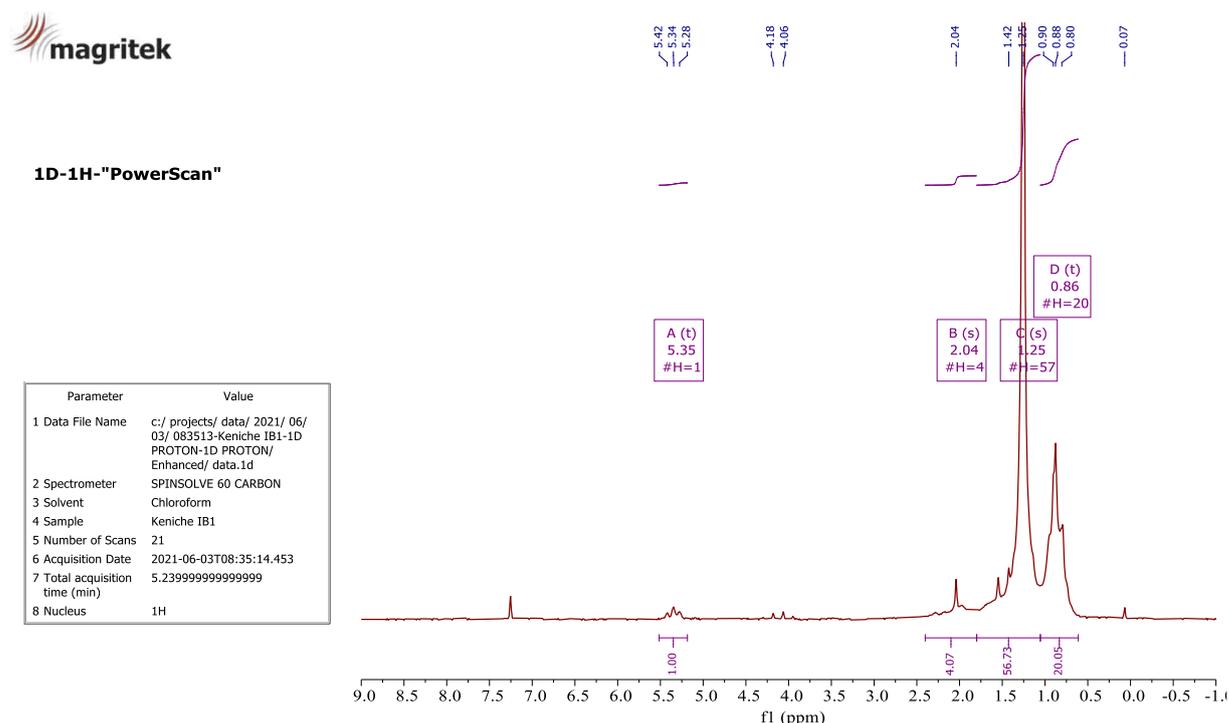


**Figure 10** : Révélation par solution permanganate de potassium et vanilline.

#### IV. 6. Analyse par RMN des composés bioactifs des extraits de Propolis :

Les onze produits isolés et purifiés n'ont pas pu tous être analysés. Un produit, PC1, a pu être analysé grâce aux techniques RMN. Les spectres 1H-RMN de PC1 est en suite traité sur le logiciel MestReNova V.14 (Figure 11).

Les déplacements chimiques, multiplicité, et intégration sont obtenus à l'aide du logiciel. Cependant, il n'est pas possible de comparer les spectres à l'aide de ce dernier à cause de l'indisponibilité d'une base de données. La revue de la littérature n'a elle aussi pas permis de trouver un spectre similaire. L'identification de PC1 par déplication requière plus de données, telle que le profil d'absorption UV. Au cas où ce serait de nouveaux produits, leur identification nécessiterait d'autres techniques telles que la spectroscopie de masse, en plus de la RMN.



**Figure 11** : Spectre 1H-RMN PC1

La dept135 révèle que ce composé comporte une longue chaîne carbonée de CH<sub>2</sub>, d'où l'intensité du signal en RMN proton et <sup>13</sup>C. De plus les signaux en mode positifs révèlent la présence du groupe CH<sub>3</sub>. Ce qui concorde avec le triplet et quadruplet dans le spectre RMN-H, vers 5.30 et 4.18ppm. A partir du spectre <sup>13</sup>C, on déduit le signal vers 130ppm, qui correspond à la fonction carbonyle. Puisqu'on ne dispose pas de spectre de masse, ni de formule brute, on peut conclure qu'il s'agit d'un composé aliphatique saturée, qui comporte une ou des fonctions carbonyle (Figure 12).

DEPT-13C-"DEPT-CYCLE"-0-10

<sup>13</sup>C

DEPT90

DEPT 135

CH3

CH2

f1 (ppm)

Parameter	Value
1 Data File Name	C:/projects/data/2021/06/07/094059-Keniche IB1-DEPT WALTZ-DEPT WALTZ/00/data.1d
2 Spectrometer	SPINSOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	Keniche IB1
5 Number of Scans	2805
6 Acquisition Date	2021-06-07T09:40:59.226
7 Total acquisition time	402.37 (min)
8 Nucleus	<sup>13</sup> C

Figure 12 : Spectre <sup>13</sup>C-RMN, DEPT 90, DEPT135 PC1

1D-13C-0-3-45-328-110-yes-yes

Parameter	Value
1 Data File Name	c:/projects/data/2021/06/05/133516-Keniche IB1-1D CARBON + WALTZ-1D CARBON + WALTZ/ data.1d
2 Spectrometer	SPINSOLVE 60 CARBON
3 Solvent	Chloroform
4 Sample	Keniche IB1
5 Number of Scans	51149
6 Acquisition Date	2021-06-05T13:35:16.685
7 Total acquisition time	2557.45 (min)
8 Nucleus	<sup>13</sup> C

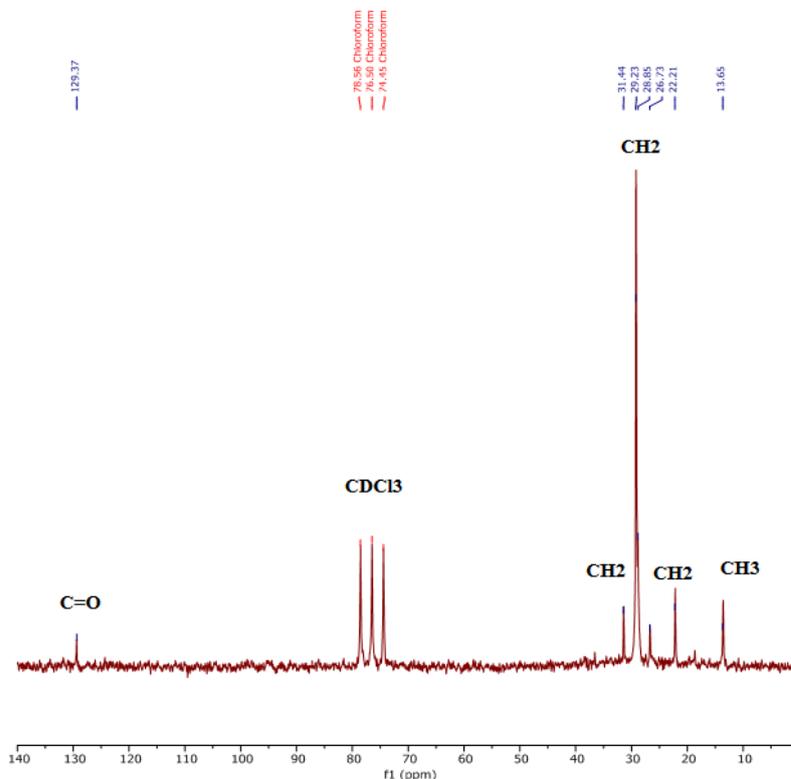
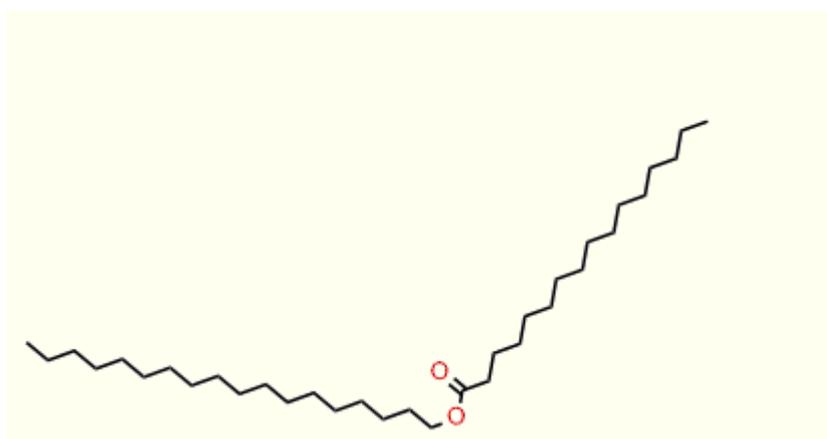


Figure 13 : Spectre <sup>13</sup>C-RMN PC1

Ce qu'on a trouvé dans la littérature, les hydrocarbures sont d'autres composants de base de la propolis. Ces dernières années, des alcanes, des alcènes, des alcadiènes, des monoesters, des diesters, des esters aromatiques, des acides gras et des stéroïdes ont été identifiés dans de nombreux types de propolis tels que la propolis égyptienne et la propolis brésilienne. En comparant les compositions des cires de propolis brésiliennes et d'autres cires, suggérant une origine commune pour les deux sources de cire. Ce résultat illustre non seulement que les cires de propolis sont sécrétées par les abeilles, mais indique également que la composition des cires de propolis ne dépend que de facteurs génétiques des abeilles, et non de sources végétales<sup>48</sup>.

On peut proposer, parmi une longue série de composé d'ester, le composé le plus proche au spectre de notre composé, tout en précisant, nous devons vérifier le spectre de masse ainsi qu'une analyse élémentaire (Figure 14).



**Figure 14** : Structure proposé Octadecyl hexadecanoate.

#### IV. 7. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

##### a. Détermination de la quantité des polyphénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que la propolis de Benisnous est la plus riche, en comparaison à celle de Chouli et Tirni (Tableau 5).

**Tableau 5** : Quantité des polyphénols totaux des extraits de propolis

	PB	PC	PT

<sup>48</sup> Shuai Huang, Cui-Ping Zhang, Kai Wang, George Q. Li, Fu-Liang Hu, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis, *Molecules* **2014**, *19*, 19610-19632.

Quantité des polyphénols totaux (mg EAG/g ES)	23.7	22.5	16.9
Quantité des polyphénols totaux (mg EAG/100g ES)	237	225	169
Absorbance	2.824	2.699	2.114

*b. Détermination de la quantité des flavonoïdes totaux*

Les résultats du dosage des flavonoïdes montrent que la propolis de Benisnous détient la teneur en flavonoïdes la plus importante, en comparaison à celle de Chouli et Tirni (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Quantité des flavonoïdes totaux des extraits de propolis

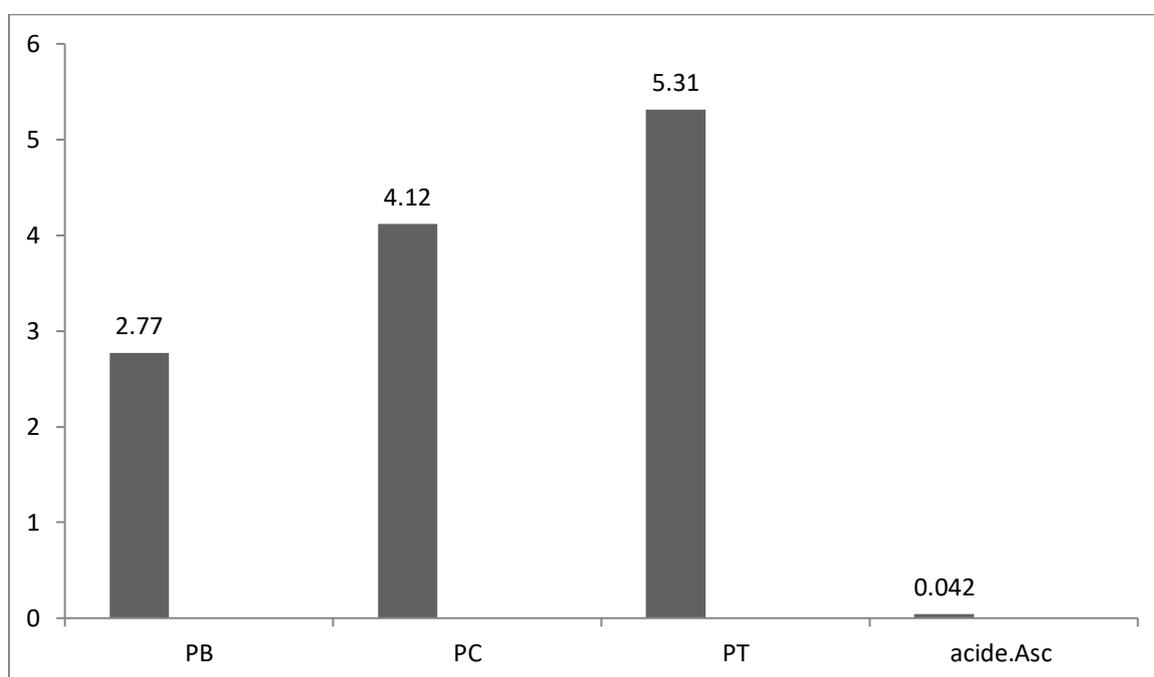
	PB	PC	PT
Quantité des flavonoïdes totaux (mg EAG/g ES)	12	11.12	10.5
Quantité des flavonoïdes totaux (mg EAG/100g ES)	120	111	105
Absorbance	2.393	2.255	2.115

#### **IV. 8. Activité antioxydante**

*a. Evaluation de l'activité anti oxydante des extraits de Propolis par la méthode de DPPH*

Tout les extraits de propolis (PB, PC, et PT) demontrent une activité antioxydante. Le pouvoir antioxydant est proportionnellement inverse à la valeur des IC<sub>50</sub>. Les résultats de mesure du pourcentage d'inhibition des extraits de propolis révèlent que PB se démarque par une capacité reductrice la plus élevée du radical DPPH, avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2.77mg/ml.

Cependant, son activité antioxydante reste largement inférieure à celle de l'acide Ascorbique dont l'IC<sub>50</sub> est de l'ordre de 0.042mg/ml. La PC montre une capacité de piégeage de radicaux plus importante que celle de PT (5.31mg/ml) avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 4.12mg/ml (Figure 15). Les résultats du test DPPH sont cohérents avec les résultats obtenus dans le dosage polyphénols et flavonoïdes<sup>49</sup>.



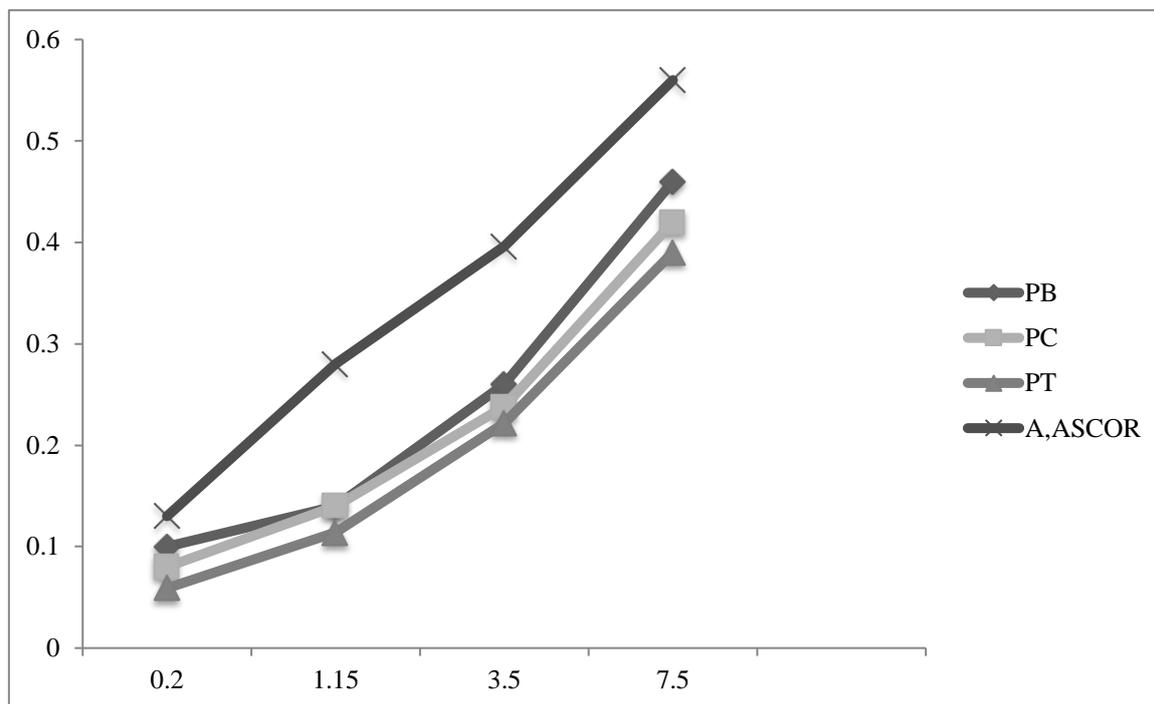
**Figure 15:** Activité antioxydante des extraits de Propolis

b. *Evaluation de l'activité anti oxydante des extraits de Propolis par la méthode de FRAP*

Les résultats représentés dans la figure 16 confirment que tous les extraits de propolis ont un pouvoir antioxydant. La capacité de l'extrait PB à réduire les ions ferrique Fe<sup>3+</sup> en ions

<sup>49</sup> Boufadi, Y. M., Van Antwerpen, P., Chikh Alard, I., Nève, J., Djennas, N., Riazi, A., & Soubhye, J.. Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, 42(1), 2018, 1-14.

ferreux  $Fe^{2+}$  est plus importante que celle de PC et PT, mais elle reste inférieure à celle de l'acide ascorbique.



**Figure 16 :** Absorbances des extraits de Propolis-méthode FRAP

Les extraits de Propolis (PB, PC et PT) présentent tous un pouvoir antioxydant selon la méthode DPPH et FRAP. Cela s'explique par leur composition chimique riche en polyphénols et flavonoïdes<sup>50</sup>.

<sup>50</sup> Benhanifia, M., Mohamed, W. M., Bellik, Y., Benbarek, H.. Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. *Int J Food Sci Technol*, **2013**, 48, 2521-2527.

## **Conclusion Générale**

## Conclusion Générale

Ce travail vise à analyser chimiquement trois échantillons de propolis de la région de Tlemcen, à l'Ouset de l'Algérie. Trois méthodes d'extractions ont été adoptées dans cette recherche : la macération, l'ES, et l'UE. Les tests qualitatifs (criblage phytochimique et révélation sur plaque CCM) nous ont révélé la présence de famille polyphénols et flavonoïdes. Plusieurs produits ont pu être isolés, à savoir 11, grâce à la chromatographie sur colonne et la chromatographie sur plaque en verre. Un produit isolé depuis PC a pu être analysé par RMN-H (1D et 2D) et RMN C<sup>13</sup>. La formule brute et la structure chimique de ce dernier n'ont pas pu être identifiées par manque d'analyses complémentaires. En se basant sur les spectres RMN et la littérature, la structure de lanolin a été proposée.

D'autre part, ce travail vise aussi à valoriser la propolis algérienne par l'étude de sa capacité antioxydante. Les tests DPPH et FRAP ont montré que la PB possède le pouvoir antioxydant le plus important parmi les trois régions, avec un écart peu significatif. Ce travail corrobore les précédentes recherches sur la propolis des autres régions de l'Algérie, révélant une grande capacité antioxydante.

## Perspectives

La propolis apparaît comme un potentiel candidat qui pourraient aider à réduire les conséquences physiopathologiques de l'infection par le SRAS-CoV-2<sup>51</sup>. L'étude chimique de la propolis algérienne est importante tenant compte de sa richesse en composés bioactifs et ses capacités thérapeutiques. Les futures études sur la propolis algérienne peuvent identifier de nouveaux composés propres à cette dernière. L'extraction assistée par ultrasons est recommandée selon la littérature et les résultats obtenus dans ce travail. La littérature présente la propolis comme un produit dont la composition chimique et les effets thérapeutiques varient selon sa provenance (région, climat, végétation, et abeilles). Les futures recherches sur la propolis algérienne peuvent considérer des échantillons du Sud Algérien. Par ces contributions scientifiques, la propolis Algérienne pourrait avoir une nouvelle place dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.

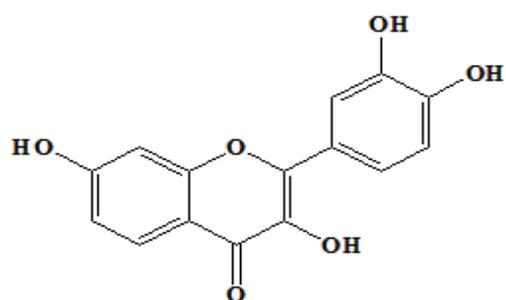
---

<sup>51</sup> Bachevski, D., Damevska, K., Simeonovski, V., & Dimova, M.. Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, **2020**, 33(4), e13780.

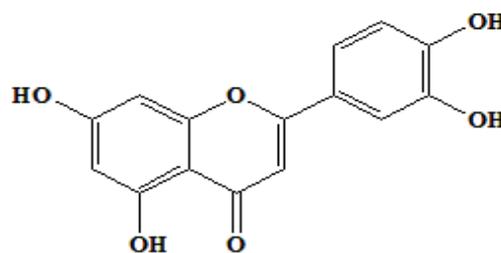
## **Annexes**

## Annexe 1 : Les principaux composants de la propolis

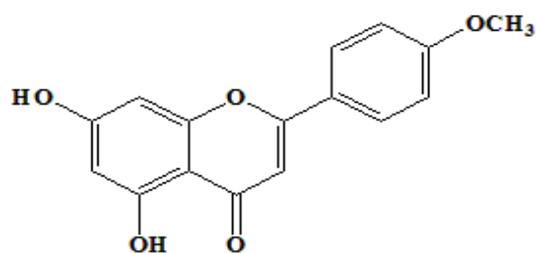
### Annexe 1.1 : Les principaux flavonoïdes présents dans la propolis



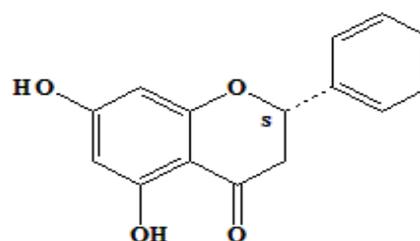
**Fesitin**



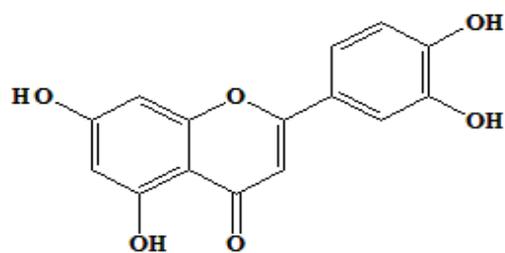
**Luteolin**



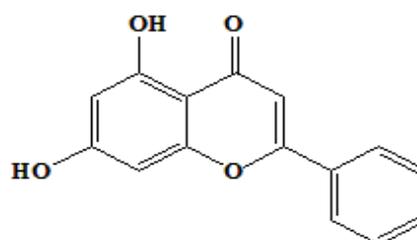
**Acacetin**



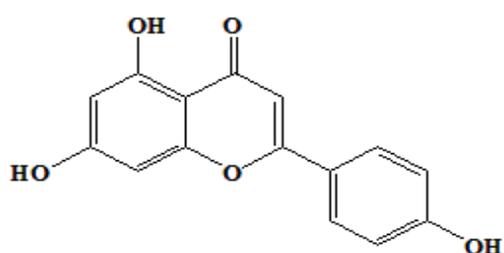
**Pinocembrin**



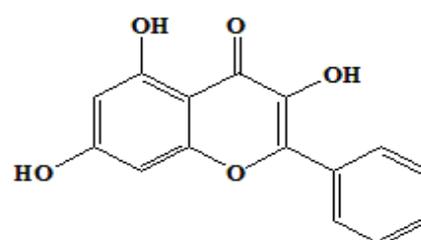
**Quercetin**



**Chrysin**

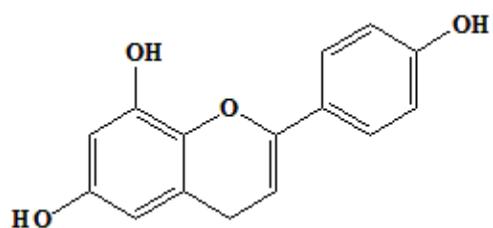


**Apigenin**

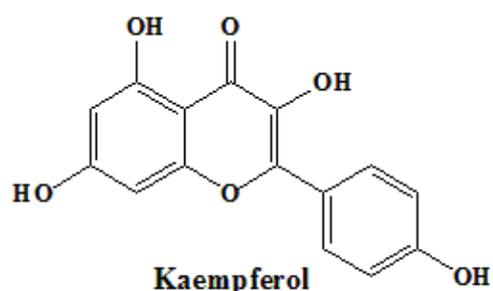


**Galangin**

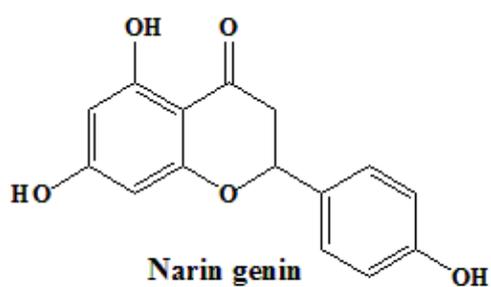
**Annexe 1.2 : Les principaux flavonoïdes présents dans la propolis**



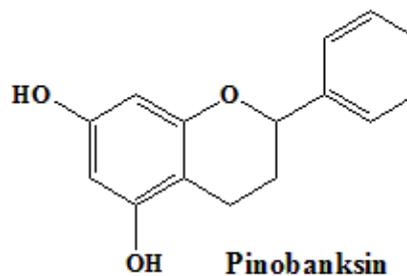
**Genistein**



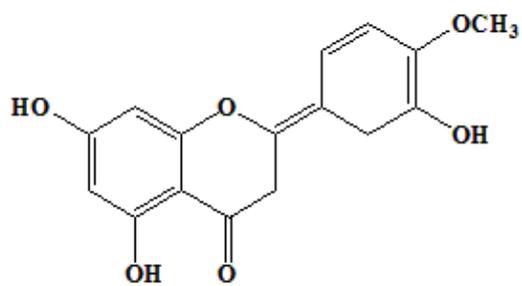
**Kaempferol**



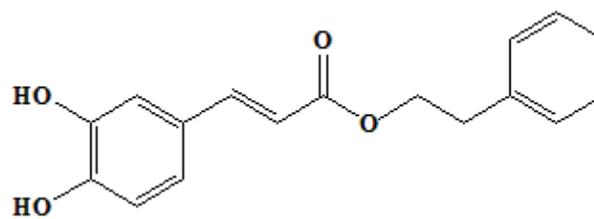
**Narin genin**



**Pinobanksin**

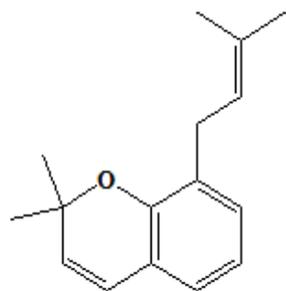


**Hesperetin**

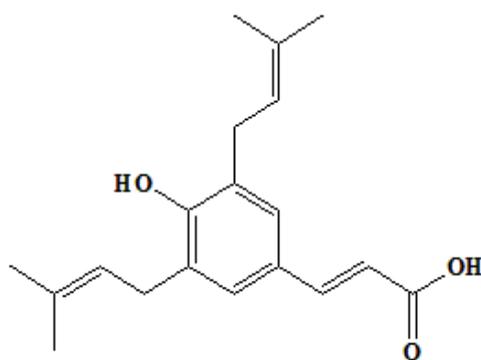


**Caffeic acid phenethyl ester**

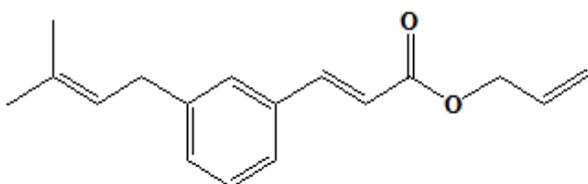
**Annexe 1.3 : Les principaux polyphénols présents dans la propolis**



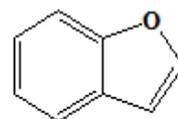
**2,2-dimethyl-8-prenylchromene**



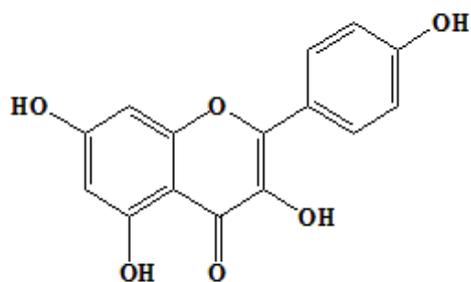
**4-hydroxy-3,5-diprenyl cinnamic acid (artepillin C)**



**3-prenylcinnamic acid allyl ester**

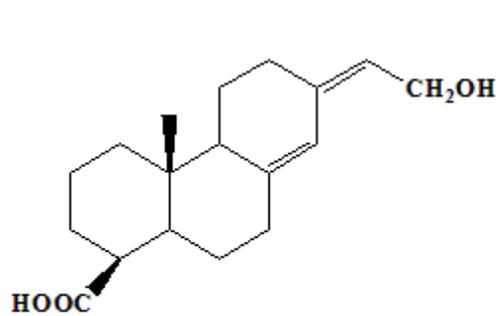


**Propolis benzofuran**

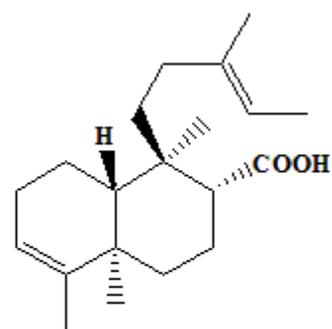


**Kaempferide**

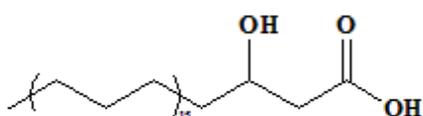
**Annexe 1.4 : Les principaux terpènes présents dans la propolis**



**isocupressic acid,  
a labdane diterpenoid**



**3C-symphoreticolic  
acid, a clerodane diterpenoid**

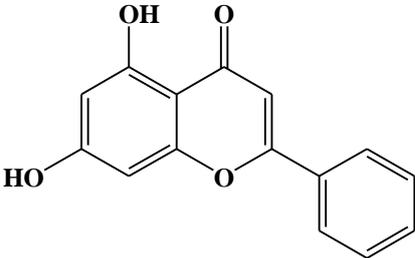
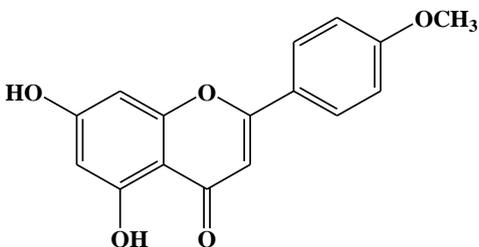
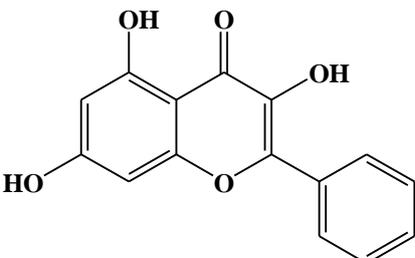
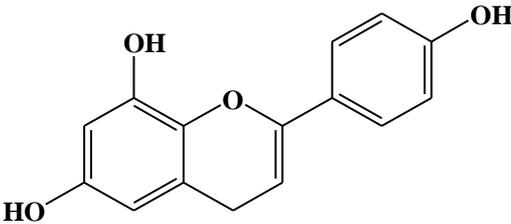


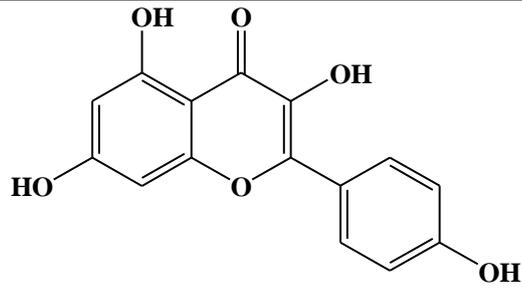
**esters of long-chain fatty acids,  
(3-hydroxystearic acid (n = 11) procrim a;  
3-hydroxystearic acid (n = 13), procrim  
b and a pentacyclic triterpenoid (lupeol))**



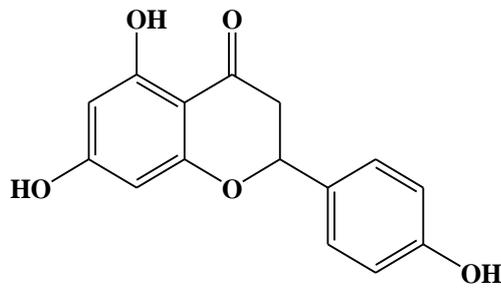
**farnesol, a sesquiterpenoid**

**Annexe 1.5 : Les principaux composants de la propolis du nord algérien**

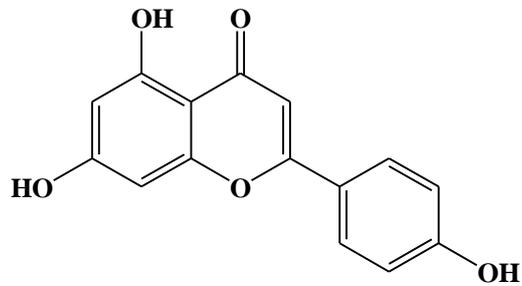
	Structure chimique	NOM
Flavonoïdes		Chrysin
		Acacetin
		Galangin
		Genistein



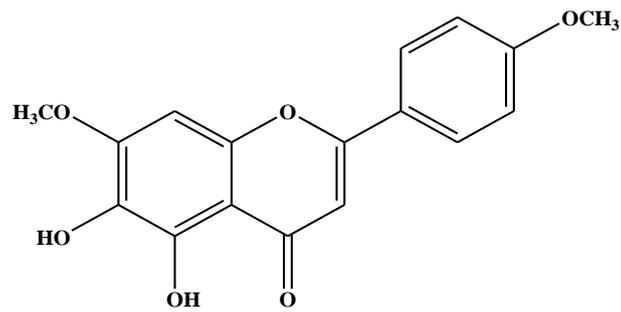
Kaempferol



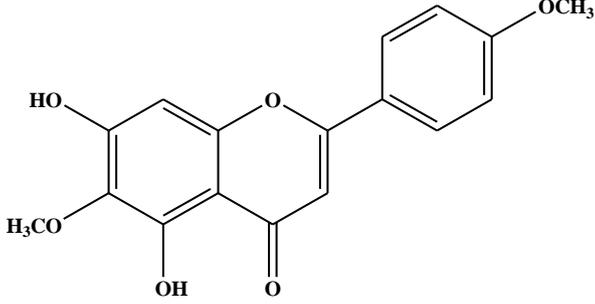
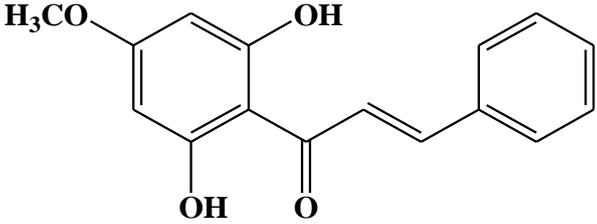
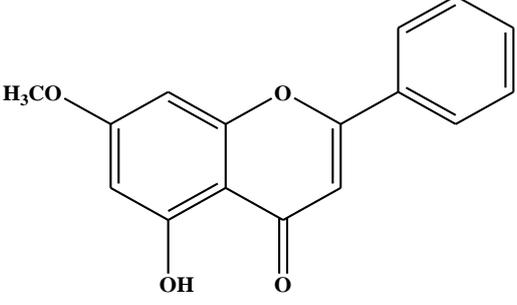
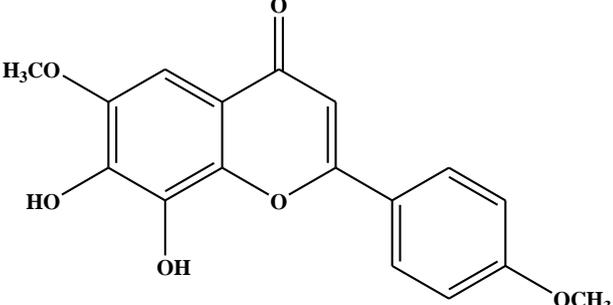
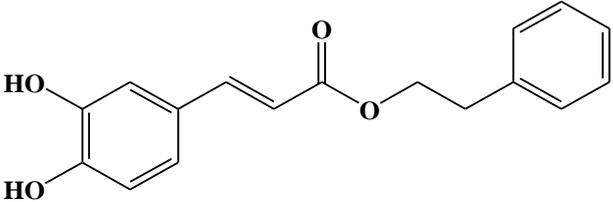
Naringenin

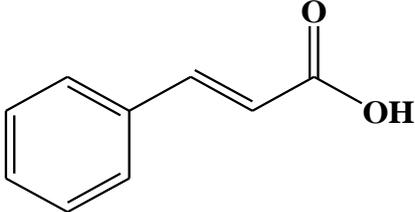
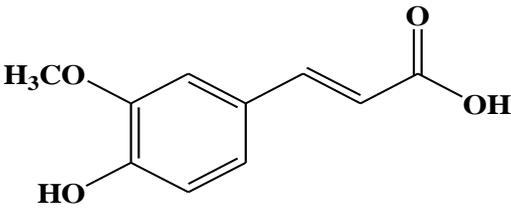
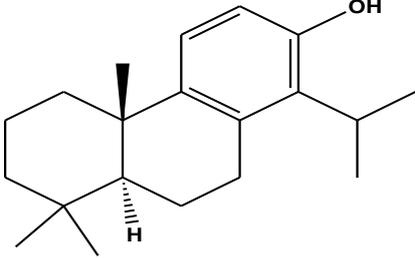
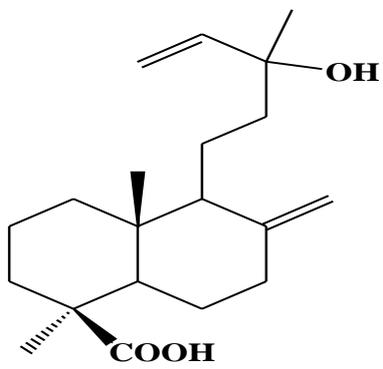


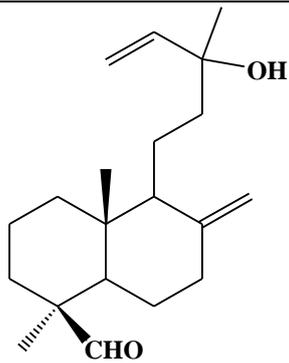
Apigenin



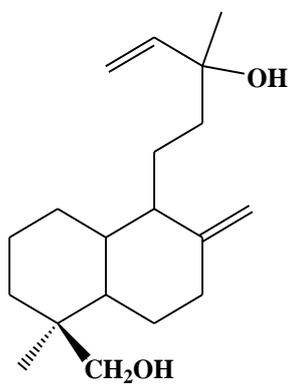
Ladanein

		<p>Pectolarigenin</p>
		<p>Pinostrombin Chalcone</p>
		<p>Tectochrysin</p>
		<p>Pilosin</p>
<p><b>Composés Phénoliques</b></p>		<p>Acide caféique</p>

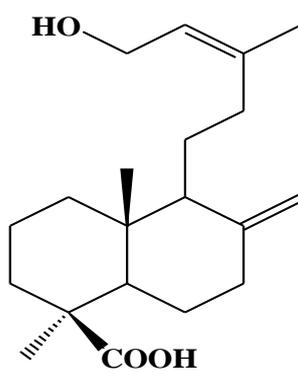
	 	<p>Acide cinamique</p> <p>Acide Féruilique</p>
<p><b>Terpènes</b> <b>(Diterpènes)</b></p>	 	<p>Totarol</p> <p>Acide cupressique</p>



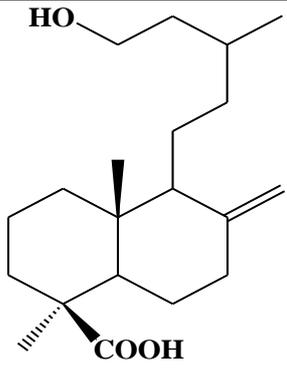
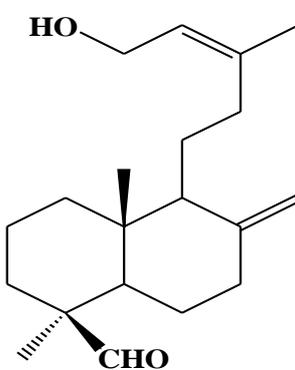
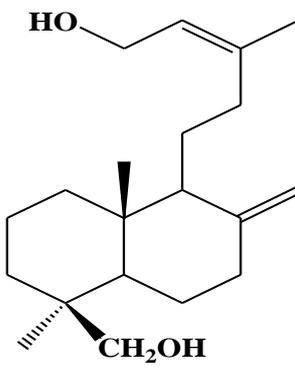
Torulosal

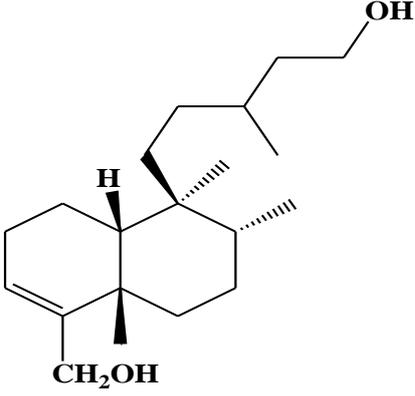
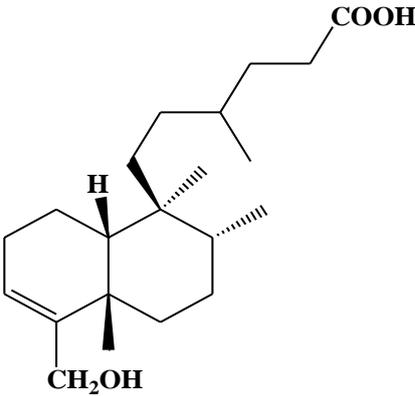


Toruloso



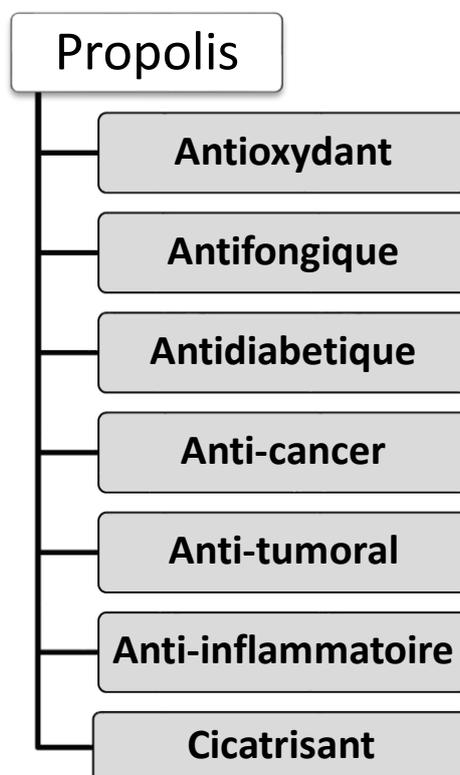
Acide  
isocupressique

	 <p>The structure shows a bicyclic core consisting of two fused six-membered rings. A methyl group is attached to the top bridgehead carbon with a wedge bond. A vinyl group is attached to the right ring. A propyl chain is attached to the right ring, ending in a methyl group. A hydroxyl group (HO) is attached to the terminal carbon of this propyl chain. At the bottom bridgehead carbon, a carboxylic acid group (COOH) is attached with a wedge bond, and a hydrogen atom is attached with a dashed bond.</p>	<p>Acide imbricatolique</p>
	 <p>The structure is identical to Imbricatol, but the terminal group of the propyl chain is an aldehyde group (CHO) instead of a hydroxyl group.</p>	<p>Isoagathol</p>
	 <p>The structure is identical to Isoagathol, but the terminal group of the propyl chain is a primary alcohol group (CH<sub>2</sub>OH) instead of an aldehyde group.</p>	<p>Agathadiol</p>

		<p>Cistadiol</p>
		<p>Acide 18- hydroxy-cis- elerodan-3-ene- 15-oïque</p>

## Annexe 2 : Propriétés thérapeutiques de la propolis

### Annexe 2.1 : Activités biologiques de la propolis



### Annexe 2.2 : Composés bioactifs et efficacité biologique de la propolis

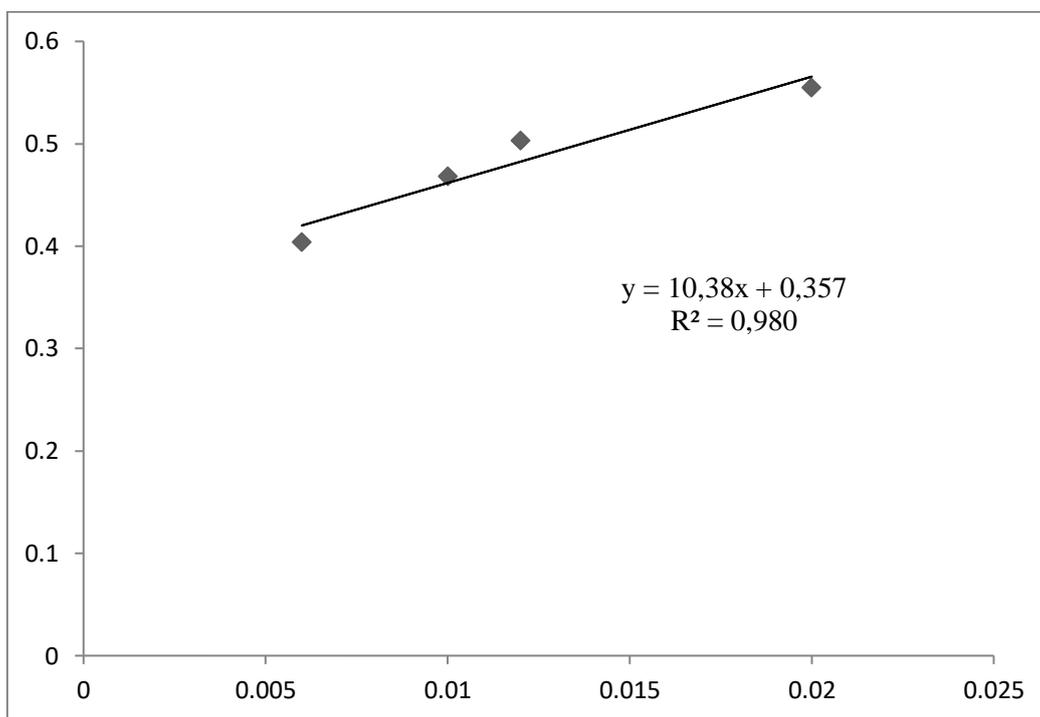
Composé bioactif	Nom	Effet
Polyphénole	2, 2-dimethyl-8-prenylchromene	Antimicrobien
Polyphénole	4-hydroxy-3, 5-diprenyl cinnamic acid (artepillin C)	Antimicrobien Anti-inflammatoire Anti-cancer
Polyphénole	3-prenyl cinnamic acid allyl ester	Antimicrobien
Polyphénole	Kaempferide	Anti-tumeur Anti-cancer
Polyphénole	propolis benzofuran	Antifongique

<b>Terpène</b>	isocupressic acid, a labdane diterpène	Antifongique
<b>Terpène</b>	3C-symphoreticolic acid, a clerodane diterpène	Anti-tumeur
<b>Terpène</b>	esters d'acides gras à longue chaîne, (3-hydroxystearic acid (n = 11) procrim a; 3-hydroxystearic acid (n = 13), procrim b and a pentacyclic triterpène (lupeol)	Antioxydant Antimicrobien Anti-tumeur
<b>Terpène</b>	farnésol, a sesquiterpènes	Antifongique
<b>Flavonoïde</b>	Apigenin	Antibactérien Anti-inflammatoire
<b>Flavonoïde</b>	Acacetin	Anti-allergie Anti-cancer
<b>Flavonoïde</b>	Quercetin	Antibactérien Anti-inflammatoire Anti-allergie Anti-cancer
<b>Flavonoïde</b>	Galangin	Antioxydant Anti-cancer
<b>Flavonoïde</b>	Pinocembrin	Antimicrobien Anti-cancer
<b>Flavonoïde</b>	Chrysin	Antibactérien Anti-inflammatoire Anti-cancer

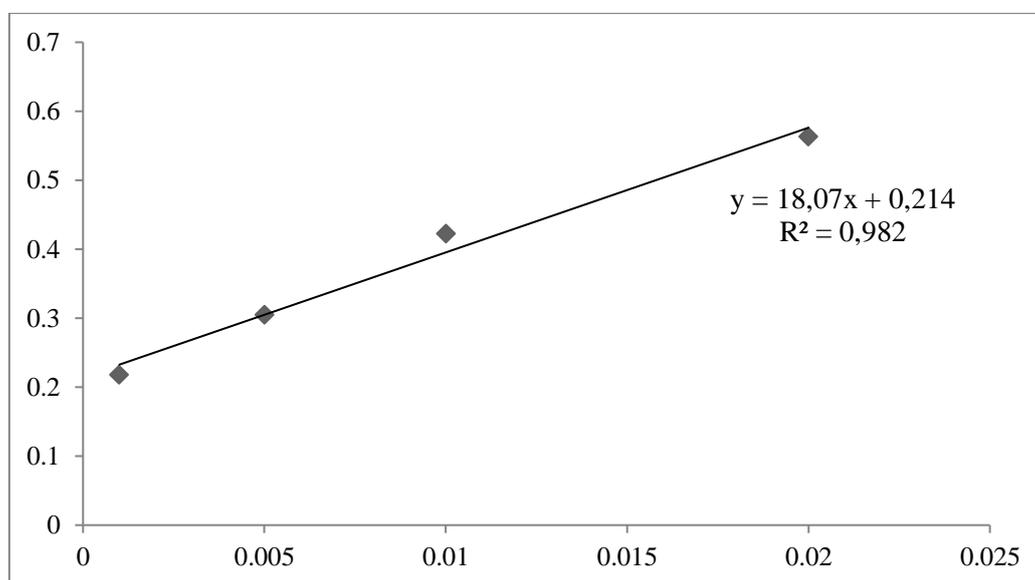
<b>Flavonoïde</b>	Fisetin	Antibactérien Anti-allergie Anti-cancer
<b>Flavonoïde</b>	caffeic acid phenethyl ester	Anti-cancer Anti-tumeur

### Annexe 3 : Courbes d'étalonnage

#### Annexe 3.1 : Courbe d'étalonnage acide gallique



#### Annexe 3.2 : Courbe d'étalonnage rutine



#### **Annexe 4 : Absorbance des solutions filles**

##### **Annexe 4.1 : Absorbance des solutions filles de l'acide gallique**

Acide gallique (mg/ml)	0.001	0.004	0.006	0.008	0.010
Absorbance	0,400	0,420	0,524	0,625	0,845

##### **Annexe 4.2 : Absorbances solutions fille de rutine**

Rutine (mg/ml)	0,008	0,01	0,020	0,040	0,080
Absorbance	0.226	0.340	0.406	0.470	0.505

##### **Annexe 4.3 : Absorbances solutions filles d'acide ascorbique**

Acide ascorbique (mg/ml)	0.001	0.004	0.006	0.008	0.010
Absorbance	0.130	0.280	0.396	0.560	0,840

## Annexe 5 : Méthode DPPH

### Annexe 5.1 : Absorbance des solutions filles PC

PC	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	14.2
Absorbance	0.534	0.460	0.372	0.054

### Annexe 5.2 : Absorbance des solutions filles PB

PB	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	14.2
Absorbance	0.514	0.417	0.315	0.076

### Annexe 5.3 : Absorbance des solutions filles PT

PT	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	14.2
Absorbance	0.616	0.534	0.445	0.108

## Annexe 6 : Méthode FRAP

### Annexe 6.1 : Absorbance des solutions filles PC

PC	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	7.5
Absorbance	0.082	0.140	0.238	0.420

### Annexe 6.2 : Absorbance des solutions filles PB

PB	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	7.1
Absorbance	0.101	0.140	0.260	0.460

### Annexe 6.3 : Absorbance des solutions filles PT

PT	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
C (mg/mL)	0.2	1.15	3.5	7.5
Absorbance	0.059	0.114	0.222	0.390

## **Annexe 7 : Dosage des polyphénols et flavonoïdes**

### **Annexe 7.1 : Dosage polyphénols absorbance solutions filles**

	PB	PC	PT
Absorbance			
760nm	2.699	2.595	2.124

### **Annexe 7.2 : Dosage flavonoïdes absorbance solutions filles**

	PB	PC	PT
Absorbance			
450 nm	2.255	2.249	2.193

## **ANNEXE 8 : Matériels et méthodes**

### **Annexe 8.1 : Echantillon de propolis brut**



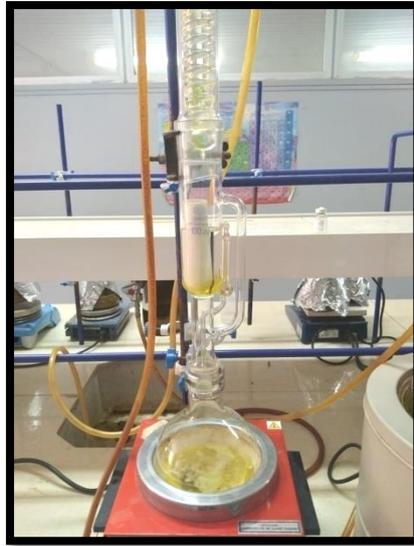
### **Annexe 8.2 : Filtration des macérât**



### **Annexe 8.3 : Extraction sous ultrasons**



**Annexe 8.4 : Extraction au Soxhlet**



**Annexe 8.5 : Extrait de propolis**



**Annexe 8.6 : Elution –chromatographie sur colonne**



**Annexe 8.7 : Fractions récupérées**



## Bibliographie

Achat, S.. Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. **2013**, Doctoral dissertation, Université d'Avignon .

Alday, E., Valencia, D., Garibay-Escobar, A., Domínguez-Esquivel, Z., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., ... & Velazquez, C.. Plant origin authentication of Sonoran Desert propolis: an antiproliferative propolis from a semi-arid region. *The Science of Nature*, **2019**, 106(5-6), 25.

Bachevski, D., Damevska, K., Simeonovski, V., & Dimova, M.. Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, **2020**, 33(4), e13780.

Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., & Antonicelli, F.. Algerian ethanolic extract of propolis and galangin decreased melanoma tumour progression in C57BL6 mice. In *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, **2015**, 142(6)-7, S294

Benhanifia, M., Mohamed, W. M., Bellik, Y., Benbarek, H.. Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. *Int J Food Sci Technol*, **2013**, 48, 2521-2527.

Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G.. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, **2015**, 76, 449-457.

Boisard, S.. Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. **2014**, Doctoral dissertation, Université d'Angers.

Boufadi, Y. M., Van Antwerpen, P., Chikh Alard, I., Nève, J., Djennas, N., Riazi, A., & Soubhye, J.. Antioxidant effects and bioavailability evaluation of propolis extract and its content of pure polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, 42(1), **2018**, 1-14.

Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., ... & Van Antwerpen, P.. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International journal of molecular sciences*, **2014**, 15(2), 2327-2345.

Cunha, I., Sawaya, A. C., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., ... & Carvalho, P. D. O.. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2004**, 15(6), 964-970.

Debab, M.. Analyse pollinique et activités biologiques de la propolis de l'Ouest Algérien. **2020**, Doctoral dissertation, Université Sidi Bel Abbès.

Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. . Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41(4), 1220-1234.

Hossain, K. S., Hossain, M. G., Moni, A., Rahman, M. M., Rahman, U. H., Alam, M., ... & Uddin, M. J.. Prospects of honey in fighting against COVID-19: pharmacological insights and therapeutic promises, **2020**, *Heliyon*, 6(12), e05798.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L.. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, **2014**, 19(12), 19610-19632.

Imhof, M., Lipovac, M., Kurz, C. H., Barta, J., Verhoeven, H. C., & Huber, J. C.. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *International journal of gynecology & obstetrics*, **2005**, 89(2), 127-132.

N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L.. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, **2009**, 6(1).

- Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., & Mohan, M.. Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medicine and Medical Science*, **2010**, 2(7), 210-215.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H.. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2017**.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L.. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2013**, 61(21), 5080-5088.
- Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hebert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M.. Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada. *Molecules*, **2020**, 25(10), 2397.
- Scorza, C. A., Gonçalves, V. C., Scorza, F. A., Fiorini, A. C., de Almeida, A. C. G., Fonseca, M. C., & Finsterer, J.. Propolis and coronavirus disease 2019 (COVID-19): Lessons from nature. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, **2020**, 41, 101227.
- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S.. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, **2016**, 9, 425-428.
- Sforcin, J. M.. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, **2016**, 30(6), 894-905.
- Talbi, H., Boumaza, A., El-Mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A.. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *J Mater EnvironSci*, **2015**, 6, 1111-1117.
- Tiwari, B. K.. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 71, 100-109.
- Volpi, N.. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **2004**, 25(12), 1872-1878.
- Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., ... & Hu, F.. Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**.