



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN

THÈSE LMD

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT

Spécialité : *Chimie Pharmaceutique*

Par :

M^{lle} Soltani Yassamine Ikram

Sur le thème

**Caractérisation chimique et valorisation biologique des
extraits naturels de propolis et de *Plumbago*.**

Europaea. L

Soutenue publiquement le 13 Avril 2026 à Tlemccen devant le jury composé de :

Pr DIB Mohamed El Amine
Pr BOUSSALEM Smain
Pr MEZARAI Abdelmoumin
Pr BENSALD Okkacha
Dr KENICHE Assia
Pr ARRAR Zoheir

Professeur
Professeur
Professeur
Professeur
MCA
Professeur

Université de Tlemccen
Université d'Ain- Temouchent
Université d'Oran
Université de Tlemccen
Université de Tlemccen
Université de Tlemccen

Président
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse

DÉDICACE

A mes chers parents.

A tous ceux que j'aime.

A tous ceux qui m'ont cru en moi.

A toutes les personnes qui m'ont aidé.

Et à vous cher lecteur.

«Imitons l'abeille, elle fait de grandes randonnées sans perdre son objectif »

Louis-Marie Parent



REMERCIEMENTS

EN TOUT PREMIER LIEU JE REMERCIE ALLAH LE TOUT PUISSANT ET LE TOUT MISERICORDIEUX, QUI M'A ACCORDE LAPATIENCE ET LA FORCE D'ACHEVER CE TRAVAIL.

QUE LA PAIX ET LA BENEDICTION SOIENT SUR NOTRE PROPHETE MOUHAMMAD عليه الصلاة والسلام

MES REMERCIEMENTS LES PLUS SINCERES S'ADRESSENT AUX MEMBRES DE JURY QUI ONT BIEN VOULU NOUS HONORER PAR LEUR PRESENCE AFIN DE JUGER ET D'EVALUER NOTRE TRAVAIL.

JE TIENS A REMERCIER DOCTEUR KENICHE ASSIA POUR SON ENCADREMENT, SON ACCOMPAGNEMENT PRECIEUX ET SES ENCOURAGEMENTS TOUT AU LONG DE CE TRAVAIL.

JE TIENS TOUT PARTICULIEREMENT A REMERCIER PROFESSEUR ARRAR, MON CO-DIRECTEUR DE THESE POUR SA DISPONIBILITE POUR SES CONSEILS AVISES ONT GRANDEMENT ATTRIBUES A ENRICHIR MA REFLEXION ET AMELIORER LA QUALITE DE MON TRAVAIL, JE TIENS EGALEMENT A SOULIGNER SES QUALITES HUMAINES ET PROFESSIONNELLES QUI ONT RENDU CET ENCADREMENT AUSSI AGREABLE QU'ENRICHISSANT.

JE SOUHAITE ADRESSER MES SINCERES REMERCIEMENTS AU PROFESSEUR HAFIDA MERZOUK ET DOCTEUR AMEL MERZOUK, ENSEIGNANTES A L'UNIVERSITE DE TLEMCEM (FACULTE DE SNV), POUR LEUR GENTILLESSE, LEUR ACCUEIL AU NIVEAU DE LEUR LABORATOIRE DE RECHERCHE EN PHYSIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE ET BIOCHIMIE DE LA NUTRITION, PUR LEURS QUALITES SCIENTIFIQUES ET HUMAINES QUI M'ONT VRAIEMENT TOUCHEES, RESTERONT A JAMAIS GRAVEES DANS MON CŒUR.

JE TIENS A EXPRIMER MES PLUS VIFS REMERCIEMENTS AU PROFESSEUR NASSIMA MOKHTARI DOYENNE DE LA FACULTE DE SNV, PROFESSEUR AMINA TABET ZATLA ET PROFESSEUR MOHAMMED EL AMINE DIB (VICE DOYEN DE LA FACULTE DES SCIENCES), JE VOUS REMERCIE DE VOTRE GENTILLESSE, DE VOTRE DISPONIBILITE PERMANENTE, DE VOTRE COMPREHENSION ET DE VOTRE SOUTIEN DURANT DES MOMENTS DIFFICILES TOUT AU LONG DES TRAVAUX DE CETTE THESE DE DOCTORAT, MERCI POUR VOS CONSEILS ET VOTRE BIENVEILLANCE

J'EXPRIME TOUS MES REMERCIEMENTS AU PROFESSEUR ZIANI CHERIF CHAWKI POUR LES ANALYSES RMN ET IR AU NIVEAU DE LABORATOIRE DE RECHERCHE LCMSO, UNIVERSITE DE TLEMCEM, JE TIENS A REMERCIER EGALEMENT PROFESSEUR BELLIFA SAMIA POUR TOUT SON AIDE ET SES EXPLICATIONS DANS LA REALISATION DES ETUDES DE LA MICROBIOLOGIE BACTERIENNE.

UN GRAND MERCI AU DOCTEUR LAOUR IBTISSEM POUR L'EVALUATION DE L'ACTIVITE NEUROPROTECTIVE AU NIVEAU DE CENTRE DE RECHERCHE CRSP, CONSTANTINE.

JE REMERCIE LA FAMILLE COSNA (DOCTORANTES, SECRETAIRES ET MEMBRES) POUR TOUS LES MOMENTS AGREABLES QUE J'AI PASSE AVEC EUX.

JE REMERCIE PROFESSEUR DRICI WASSILA ET PROFESSEUR BENDIABDELLAH DJAMEL, C'EST A VOS COTE QUE J'AI COMPRIS LA RIGUEUR, LA PRECISION, LA PATIENCE ET LE SERIEUX DANS LE DOMAINE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

JE REMERCIE CHALEUREUSEMENT LA PHARMACIENNE DOCTEUR ARZAZI TEMA POUR SON AIDE ET SES EXPLICATIONS DANS LE DOMAINE DE L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE ET LA PREPARATIONS DES PRODUITS PARAPHARMACEUTIQUES, MERCI D'AVOIR PARTAGER AVEC MOI VOS EXPERIENCES PROFESSIONNELLES.

MES REMERCIEMENTS S'ADRESSENT EGALEMENT A TOUS LE PERSONNEL ADMINISTRATIF DE L'UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID, EN PARTICULIER LE DOYEN DE LA FACULTE DES SCIENCES PROFESSEUR ZOHEIR ARRAR ET LA RESPONSABLE DE LA FORMATION DOCTORALE PROFESSEUR NEGADI LATIFA.

MES SINCERES REMERCIEMENTS A TOUS LES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES SURTOUT CEUX DU DEPARTEMENT DE CHIMIE POUR LEURS EFFORTS POUR NOTRE FORMATION TOUT AU LONG DU NOTRE PARCOURT UNIVERSITAIRE.

J'EXPRIME TOUS MES REMERCIEMENTS A IMENE L'INGENIEUR DE LABORATOIRE PEDAGOGIQUE DE CHIMIE, FACULTE DES SCIENCES ET SOUMIA L'INGENIEUR DE LABORATOIRE PEDAGOGIQUE DE CHIMIE ORGANIQUE, FACULTE DE MEDECINE, DEPARTEMENT DE PHARMACIE POUR LEUR DISPONIBILITE, LEURS ENCOURAGEMENTS, LEUR AIDE ET LEUR GENTILLESSE.

JE NE SAURAI PAS TERMINER SANS REMERCIER MES ACCOMPAGNOS DE TOUS LES JOURS, MES CHERS PARENTS QUI SONT MA SOURCE DE FORCE, DE COURAGE ET DE JOIE, JE LEUR REMERCIE POUR LEURS SACRIFICES, LEUR SOUTIEN, LEUR EDUCATION, LEUR AMOUR ET LEURS PRIERES POUR MOI TOUT AU LONG DE MON PARCOURT, GRACE A ALLAH ET A VOUS QUE J'AI REUSSI.

JE REMERCIE TOUTE MA FAMILLE, QUI ONT TOUJOURS CRU EN MOI, POUR LEURS ENCOURAGEMENTS, SURTOUT MA CHERE TANTE TATA KHALIDA JE LA REMERCIE POUR SON SOUTIEN SON AIDE SA GENTILLESSE SON ECOUTE SES CONSEILS, SES PRIERES ET SES DOUAA POUR MOI DEPUIS MON ENFANCE, JE TIENS A REMERCIER MA CHERE SŒUR NABAHET MON CHER FRERE NASSIM ET MA BELLE SŒUR HADJER POUR LEUR SOUTIEN INDECTIBLE TOUT AU LONG DE MON PARCOURS, LEUR PRESENCE, LEUR ENCOURAGEMENT EN MOI ONT ETE UNE VERITABLE SOURCE DE MOTIVATION.

A MON AMIE ET MA BINOME DE TOUTES CES ANNEES D'ETUDE, HAMMOUDI AMINA, MERCI DE M'AVOIR AIDE, TU M'AS TOUJOURS ENCOURAGE, TU M'AS TOUJOURS SOUTENU, MERCI !

JE REMERCIE CHALEUREUSEMENT MES AMIES : AMINA ABOURA SARAH ET TEMA POUR M'AVOIR SOUTENUS PENDANT LES MOMENTS DURS ET DIFFICILES, MERCI POUR LES MOMENTS AGREABLES ET INOUBLIABLES QU'ON A PASSE ENSEMBLE, SANS OUBLIER MES CHERES AMIES CHAHINEZ, RADJAA, IMENE MAMI ET IMENE AZZOUNI POUR LEUR AMITIE, LEUR ATTENTION, LEUR SYMPATHIE, LEUR BONNE HUMEUR ET LEURS ENCOURAGEMENTS, CE N'EST PAS TOUJOURS EVIDENT D'AVOIR DE VRAI AMIS, JE SUIS CHANCEUSE DE VOUS AVOIR TOUS DANS MA VIE, MERCI !

DANS L'IMPOSSIBILITE DE CITER TOUS LES NOMS MES SINCERES REMERCIEMENTS A TOUTES LES PERSONNES DE PRES ET DE LOIN POUR LEURS CONSEILS, LEURS ENCOURAGEMENTS ET LEURS DOUAA POUR CETTE REUSSITE DE REALISER CE TRAVAIL.

MERCI



TABLE DES MATIERES

- I. LSTE D'ABREVIATIONS ET ACRONYMES
- II. LISTE DES FIGURES
- III. LISTE DES TABLEAUX.
- IV. INTRODUCTION GENERALE
- V. PROBLEMATIQUE
- VI. OBJECTIF

Sommaire

<i>Chapitre 1 : Généralité sur la propolis</i>	1
I.Etymologie.....	5
II.La production de la propolis par l'abeille.....	6
III.L'utilisation de la propolis par l'abeille.....	7
IV.Historique.....	8
V.Les principales espèces végétales.....	9
VI.La récolte de la propolis par l'homme.....	10
VII.Caractéristiques.....	12
VIII.Conservation de la propolis.....	14
IX.Toxicité de la propolis.....	15
X.Conclusion du Chapitre1.....	16
<i>Chapitre2 :Caractérisation chimique de la propolis</i>	Error! Bookmark not defined.
I.Introduction générale.....	Error! Bookmark not defined.
II.Composition chimique de la propolis.....	19
III.Les flavonoïdes.....	Error! Bookmark not defined.
IV.Les terpènes.....	Error! Bookmark not defined.
V.Les composés phénoliques.....	Error! Bookmark not defined.
VI.Les anthraquinones et les coumarines.....	Error! Bookmark not defined.
VIII.Les hydrocarbures.....	25
IX.Les éléments minéraux.....	27
IX.Lacomposition chimique de la propolis.....	27
X.La composition chimique de la propolis algérienne.....	28
XI.Conclusion du Chapitre 2.....	29
<i>Chapitre 3 : Propriétés pharmacologiques de la propolis</i>	31
I.Introduction.....	32
II.Activité antibactérienne et antifongique.....	33
III.Activité Anti-tumorale.....	35
IV.Activité Anti-inflammatoire.....	36

V.Activité antioxydante.....	37
VI.Activité antivirale.....	380
VII.Activité neuroprotective	31
VIII. Docteur propolis.....	31
X.Conclusion du Chapitre 4.....	33
<i>Chapitre 4 : Application de la propolis en médecine buccodentaire</i>	34
I.Introduction.....	35
III.Efficacité de la propolis dans le traitement da la stomatite aphteuse.....	35
III.Propolis :Anticaries.....	35
IV.Propolis: Anti plaque.....	36
V.Propolis: Cancer bucal.....	37
VI.Propolis: Traitement de la gingivite.....	37
VII.Etudes des résultats expérimentaux des produits buccodentaire à base de propolis.....	38
VIII.Conclusion du chapitre 4.....	43
<i>Chapitre 5: Origine,composition chimique et propriétés du Plumbago.europaea.</i>	44
I.Introduction.....	45
II.Origine.....	45
III.Composition chimique.....	46
IV.Propriétés pharmacologiques.....	50
V. <i>Plumbago.europaea</i> : agent inhibiteur de la corrosion de l'aluminium.....	52
VI.Conclusion du Chapitre 5.....	53
Travail effectué.....	54
Partie I. Caractérisation chimique.....	57
Analyse qualitative/quantitative.....	57
1-Matériels et méthodes.....	57
I.Présentation de la matière première.....	57
II.Préparation des extraits de la propolis.....	59
II.1. Macération alcoolique simple à froid.....	60
II.2. Détermination du rendement d'extraction	60
Analyse qualitative (Screening phytochimique) des extraits de la propolis	61
III.1. Tests phytochimique	61
III.2. Criblage phytochimique à l'aide de la chromatographie analytique sur couche mince	61
Analyse quantitative (dosage par spectrophotométrie) des extraits de la propolis	62
IV.1. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu.....	62

IV.2. Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode d’AlCl₃	62
2. Résultats et discussion	63
Rendements d’extraction	63
II. Résultats du screening phytochimique des extraits de la propolis	64
III. Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes	64
Partie I. Caractérisation chimique	70
Analyse spectrale	70
1. Matériels et méthodes	70
I. Analyse HPLC	70
II. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse HPLC/MS	71
III. Chromatographie sur colonne	72
2. Résultats et discussion	72
I. Identification des composés des extraits de propolis par HPLC (profil chromatographique)	72
II. Identification par HPLC/MS	77
III. Isolation des composés par chromatographie sur colonne et plaque chromatographique sur couche mince sur un support en verre	83
Partie II. Evaluation de l’activité biologique	90
1. Matériels et méthodes	90
I. Evaluation de l’activité antioxydante par des tests in vitro	91
I.1. Test de piégeage du radical libre (DPPH)	91
II. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique	92
II.1 Evaluation de l’activité antimicrobienne et antifongique par des tests in vitro	92
II.2. Test antimicrobien et antifongique	92
II.2.1. Méthode des disques (méthode de diffusion sur gélose ou l’antibiogramme)	93
III. Evaluation de l’activité neuroprotective	93
III. 1. Activité anti cholinestérase	95
IV. Evaluation de l’activité immunostimulante	95
1. Résultats et discussion	97
I. Détermination des IC₅₀ des extraits pour l’activité antioxydante	97
II. Détermination du diamètre d’inhibition des extraits pour l’activité antibactérienne et antifongique	99
III. Détermination des IC₅₀ pour l’activité anti cholinestérase	100
IV. Evaluation de l’activité immunostimulante	100
IV. Effets de la propolis sur la prolifération des lymphocytes	101
Partie III. Etude comparative de l’activité biologique des extraits de la propolis et le complexe propolis/β-cyclodextrine	108
Matériels et méthodes	108

Préparation des complexes d'inclusion extrait-Cyclodextrine en mode solide.....	109
1. Résultats et discussion.....	109
I.Résultats de l'activité antioxydante des complexes d'inclusion extrait EPE/ β -Cyclodextrine.....	110
II. Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des complexes d'inclusion extrait EPE/ β -Cyclodextrine	111
Partie IV. Application en médecine buccodentaire.....	113
I.Formulation pharmaceutique.....	113
II.Contrôle des caractéristiques physiques du bain de bouche.....	114
III.Evaluation de l'activité antimicrobienne du bain de bouche.....	115
<i>Plumbago.europeae</i>	117
1. Matériels et méthodes.....	117
I.Récolte de la matière première.....	117
II.Préparation de l'extrait.....	118
III.Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG) et par spectrométrie de masse (CG/SM).....	118
Partie II. Evaluation de l'activité biologique.....	119
I.Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique.....	120
II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (<i>in vitro</i>).....	121
III.Evaluation de l'activité hémolytique.....	121
2. Résultats et discussion.....	121
I.Détermination du rendement et la composition chimique de l'extrait hexanoïque du <i>P.europaea</i>	121
II.Détermination de la composition chimique de l'extrait hexanoïque du <i>P.europaea</i>	122
III. Résultats de l'activité antibactérienne.....	124
IV.Les résultats de l'activité anti-inflammatoire.....	126
IV.Les résultats de l'activité hémolytique.....	128
Conclusion générale et perspectives.....	132
Référence bibliographique.....	1395

LISTE D'ABREVIATIONS ET ACRONYMES

- **EEP** : Extrait Ethanoïque de la Propolis
- **EPB** : Extrait de propolis de la région de Benisnous
- **EPA** : Extrait de propolis de la région de Chetouan
- **EPI** : Extrait de propolis de la région de Chouli
- **EPE** : Extrait de propolis de la région d'Elouret
- **EPT** : Extrait de propolis de la région de Terny
- **EtOH** : Ethanol
- **MeOH** : Methanol
- **DCM** : Dichlorométhane
- **FeCl₃** : Chlorure Ferrique
- **CD** : Cyclodextrine
- **B-CD** : béta-cyclodextrine
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **IP** : Indice de plaque
- **MBC** : concentration minimale bactéricide
- **MFC** : Concentration minimale fongicide
- **DI** : Diamètre d'inhibition
- **IG** : Indice gingival
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50%
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance
- **LC/MS** : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
- **TPC** : Total Polyphenol Content
- **TFC** : Total Flavonoid Content
- **mg EAG/g** : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait
- **mg EQ/g** : milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme d'extrait
- **AlCl₃** : Trichlorure d'aluminium
- **DPPH** : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
- **AchE** : Acétylcholinestérase
- **BChE** : Butylcholinestérase
- **RMN-¹H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton
- **m/z** : Masse/charge électrique
- **UV** : Ultraviolet
- **DL50** : Dose létale médiane
- **R_f** : Rapport frontal
- **Rdt** : Rendement
- **GSH** : glutathion réduit
- **MDA** : malondialdéhyde
- **Con A** : Concanaline A
- **CARP** : protéines carbonylées

Listes des Figures

Figure 1: La résine de Pin.	4
Figure 2: Des abeilles fabriquent de la propolis dans la ruche	5
Figure 3: Machoire humaine agée de 6500 ans dont la couronne canine gauche porte des traces de plombage à la cire d'abeille.	5
Figure 4: Propolis brute.	6
Figure 5: Les différentes races de l'abeille brésilienne.	7
Figure 6 : L'abeille <i>Apis mellifera intermissa</i>	7
Figure 7: Peuplier (<i>Populus</i>)	9
Figure 9: <i>Baccharis dracunculifolia</i>	9
Figure 11: <i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	10
Figure 12: La récolte de la propolis par raclage	11
Figure 13: Propolis sur la grille	11
Figure 14: Composition de la propolis.	14
Figure 15: Les principaux flavonoides présents dans la propolis.	15
Figure 16: Flavonoïdes identifiés dans la propolis chinoise et mexicaine	15
Figure 17: La structure de quelques terpènes et leurs dérivés présents dans la propolis.....	17
Figure 18: La structure de quelques composés phénoliques.....	18
Figure 19: Quelques anthraquinones et coumarines identifiés dans la propolis.	21
Figure 20: La structure des composés isolés de la propolis algérienne (Jijel) Composé 1 : $C_{17}H_{14}O_6$, Composé 2 $C_{17}H_{15}O_7$, Composé 3 : $C_{17}H_{14}O_6$, composé 4 : $C_{15}H_{10}O_4$, composé 5 : $C_{15}H_{10}O_5$	23
Figure 21: Structure de quelques composés présents dans la propolis algérienne.....	24
Figure 22: L'activité antivirale, antifongique et anticancéreuse de la propolis	30
Figure 23: Effets morphologique de la propolis de Skikda sur les cellules HepG2 observés au microscope....	32
Figure 24: Un résumé de l'effet de la propolis sur l'abeille et l'homme.....	33
Figure 25: à droite : avant traitement ; à gauche : après traitement à droite	37
Figure 26: Résumé de l'utilisation de la propolis en dentisterie.	38
Figure 27: Nombre de brevet déposés et les études publiées sur l'utilisation de la propolis en dentisterie (1987-2019).....	42
Figure 28: (a) les brevets des produits dentaires à base de propolis dans le monde entier;(b) (c) principaux pays qui ont des brevets et des études publiées sur l'action de la propolis en dentisterie (1987-2019)	43
Figure 36: <i>Plumbago europaea</i>	47
Figure 37: Carte de distribution du <i>Plumbago.europaea</i> au monde.	47
Figure 38: Structure des composés isolés à partir d'extrait des parties aérienne du <i>Plumbago.europaea</i>	48
Figure 39: Chromatogramme des constituants majeurs d'extrait des racines du <i>P.europaea</i>	49
Figure 40: Composition chimique de l'huile essentielle des racines du <i>P.europaea</i>	49
Figure 41: Structure des composés isolés des extraits des feuilles et des racines de <i>P.europaea</i>	50
Figure 42: Un schéma récapitulatif de l'activité antioxydante et anti-obésité des extraits des feuilles du <i>P.europaea</i>	52
Figure 43: Structure de la Plumbagine et l'isoshinanolone	53
Figure 44: Micrographie électronique de balayage de surface en aluminium (A) : dans une solution de NaOH (0.1M) ; (B) : la surface d'aluminium dans une solution d'extrait de <i>P.europaea</i>	53
Figure 45: Les échantillons de la propolis récoltés pour cette étude.....	57
Figure 46: Les sites de récolte des échantillons de la propolis.	58
Figure 47: Macération à froid de la propolis.....	60
Figure 48: Diagramme représentant le taux de rendement des extraits de la propolis.	64
Figure 49: Chromatogramme des extraits de la propolis.....	65
Figure 50: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	67
Figure 51: La courbe d'étalonnage de la Quercétine.	68
Figure 52: Diagramme représentant le taux des polyphénols et flavonoides des extraits de la propolis.	70

Figure 53: Profil chromatographique des extraits de la propolis de différentes régions de la wilaya de Tlemcen (régions montagneuse : EPB(Benisnous) et EPE (Eouret), régions de plaine : EPA(Chetouan) et EPI(Chouli).	74
Figure 54: Structure des composés identifiés dans les extraits préparés par HPLC.	77
Figure 55: Profil chromatographique de l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI.	78
Figure 56: Profil chromatographique de l'extrait de la propolis de la région d'Elouret EPE.	78
Figure 57: Profil chromatographique de l'extrait de la propolis de la région de Benisnous EPB.	79
Figure 58: Profil chromatographique de la propolis de la région de Chetouan EPA.	80
Figure 59: Profil chromatographique de la propolis de la région de Terny EPT.	80
Figure 60: La structure des composés identifiés dans les extraits de la propolis par HPLC/MS.	81
Figure 61: Spectre de masse de Pinobanksine-3-acétate.	81
Figure 62: Spectre de masse de la Chryisine.	82
Figure 63: Spectre de masse de la Pinobanksin.	82
Figure 64: Spectre de masse de la Pinocembrin.	82
Figure 65: Spectre IR du composé YF1-15.	84
Figure 66: Spectre RMN- ¹ H du composé YF1-15.	85
Figure 67: Spectre IR du composé YF-32.	85
Figure 68: Spectre RMN- ¹ H du composé YF-32.	86
Figure 69: Spectre IR du composé YF2-15.	86
Figure 70: Spectre RMN-H du composé YF2-15.	87
Figure 71: La réduction du DPPH° par un antioxydant	91
Figure 72: Réduction du radical DPPH	91
Figure 73: La méthode des disques (l'antibiogramme).	94
Figure 75: Marqueurs de stress oxydatif et marqueurs antioxydants des lymphocytes exposés à différentes concentrations d'extraits éthanoliques de propolis.	106
Figure 76: <i>Plumbago.europaea</i> .	118
Figure 77: Taux de rendement d'extraction de l'extrait des racines de <i>P.europaea</i> .	122
Figure 78: Structure des composés identifiés dans l'extrait hexanoïque du <i>P.europaea</i> .	124
Figure 79: Les valeurs d'IC50 de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait et du diclofenac de sodium.	127

Liste des tableaux

Tableau 1: Type de propolis selon leur origine végétale, leur composition chimique et leurs principales activités biologiques	8
Tableau 2: Les flavonoides identifiés dans la propolis de différents pays du monde	20
Tableau 3: L'activité anti-cancéreuse de la propolis de différentes origines.....	29
Tableau 4: Etude in vitro des dentifrices à base de propolis.....	39
Tableau 5: Etude in vivo des dentifrices à base de propolis.....	40
Tableau 6: Des études in vitro des bains de bouche à base de propolis	41
Tableau 7: Des études in vivo des bains de bouche à base de propolis	42
Tableau 8: Le site, l'année et le mois de récolte des échantillons et race d'abeille.	58
Tableau 9: Température de fusion de la propolis brute récoltée.....	59
Tableau 10: Les caractéristiques organoleptiques des échantillons.....	59
Tableau 11: Rendement d'extraction et aspect des extraits obtenus.	63
Tableau 12: Résultats des tests phytochimiques.....	65
Tableau 13: Les résultats du screening phytochimique par CCM.	66
Tableau 14: Taux des polyphénols et flavonoides des extraits.....	67
Tableau 15: L'absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations.	67
Tableau 16: L'absorbance de la Quercétine à différentes concentrations	68
Tableau 17: Standards utilisés avec leur temps de rétention dans l'HPLC.....	71
Tableau 18: Détermination de la composition de l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI.	78
Tableau 19: Détermination de la composition de l'extrait de la propolis de la région d'Elouret.	79
Tableau 20: Détermination de la composition de l'extrait de la région de Benisnous EPB.	79
Tableau 21: Détermination de la composition de la propolis de la région de Chetouan EPA.....	80
Tableau 22: Détermination de la composition de la propolis de la région de Terny EPT.....	81
Tableau 23: Détermination de la nature de la classe chimique des composés isolés.....	87
Tableau 24: Diamètre d'inhibition de la croissance microbienne exprimé en mm.	99
Tableau 25: IC ₅₀ de l'activité neuroprotective des extraits.....	101
Tableau 26: Réponse proliférative cellulaire (indice de stimulation SI) des lymphocytes à différentes concentrations des extraits éthanoliques de la propolis.	102
Tableau 27 : Marqueurs de stress oxydatif intracellulaire des PBMC en présence de différentes concentrations d'extraits d'éthanol de la propolis.	105
Tableau 28: Les valeurs d'IC ₅₀ des extraits de propolis et des complexes d'inclusion EEP/ β -CD.	110
Tableau 29: Le diamètre d'inhibition des extraits et complexes extraits/ β -CD.	111
Tableau 30: L'évolution des caractéristiques physiques du bain de bouche préparé à 45°C.	115
Tableau 31: L'évolution des caractéristiques physiques du bain de bouche à température ambiante.	115
Tableau 32: Diamètre d'inhibition du bain de bouche contre des micro-organismes.	116
Tableau 33: Rendement d'extraction de l'extrait du P.europaea	122
Tableau 34: Résultats d'analyse CPG et CPG/MS de l'extrait hexanoïque du P.europaea.....	123
Tableau 35: Zone d'inhibition de l'extrait de P.europaea, Gentamicine et l'amphotéricine.	125
Tableau 36: Concentration minimale inhibitrice CMI de l'extrait d'hexane, Gentamicine et l'amphotéricine.	125
Tableau 37: Les valeur de IC ₅₀ de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait et du Diclofenac.	126
Tableau 38: Le pourcentage d'hémolyse de l'extrait de P.europaea en fonction de la concentration.	128

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie pharmaceutique fait face aujourd'hui à des défis majeurs : l'émergence et la propagation rapide de l'antibiorésistance, la progression des maladies chroniques liées au stress oxydant (maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, diabète, syndromes inflammatoires chroniques), ainsi que la nécessité de disposer de molécules innovantes pour cibler des voies physiopathologiques encore mal maîtrisées. Dans ce contexte, la découverte de nouvelles entités chimiques thérapeutiques constitue une priorité stratégique.

Historiquement, les substances naturelles ont joué un rôle fondamental dans l'approvisionnement de la pharmacopée mondiale. Plus de 60 % des médicaments anticancéreux et plus de 75 % des anti-infectieux actuellement sur le marché sont directement ou indirectement issus de produits naturels. Cette contribution majeure s'explique par la diversité structurale exceptionnelle des métabolites secondaires produits par les végétaux, les micro-organismes et les animaux. Face aux limites des approches de chimie combinatoire, qui peinent à générer des bibliothèques moléculaires à la fois diverses et « drug-like », les substances naturelles connaissent un regain d'intérêt considérable. Les substances naturelles constituent un réservoir de molécules bioactives d'une extraordinaire diversité structurale. Parmi celles-ci, la propolis produit apicole complexe et *Plumbago europaea*. L' plante médicinale de la famille des Plumbaginaceae ont été sélectionnées pour cette étude en raison de leur riche composition chimique (flavonoïdes, naphthoquinones, composés phénoliques) et de leurs usages traditionnels documentés.

La propolis, souvent appelée « colle d'abeille », est une substance résineuse récoltée par les abeilles (*Apis mellifera*) à partir des bourgeons, des écorces et des exsudats de diverses plantes. Elle est ensuite mélangée à de la cire et à des sécrétions salivaires riches en enzymes. Utilisée par les abeilles pour colmater les fissures, aseptiser la ruche et lutter contre les agents pathogènes, la propolis est également employée par l'homme depuis l'Antiquité : les Égyptiens l'utilisaient pour l'embaumement, les Grecs et les Romains pour ses propriétés cicatrisantes et antiseptiques, et les médecins arabes pour traiter les brûlures et les infections buccales.

Plumbago europaea. L(Plumbaginaceae) est une plante vivace présente en Afrique du Nord, dans la région méditerranéenne, en Europe du Sud et en Asie occidentale. Elle est utilisée depuis des siècles dans les médecines traditionnelles : traitement des verrues, des affections cutanées, des rhumatismes, des œdèmes et même comme agent anti-cancéreux dans certaines pharmacopées asiatiques.

PROBLEMATIQUE :

Le stress oxydatif, déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les défenses antioxydantes, est impliqué dans de nombreuses pathologies : maladie d'Alzheimer, Parkinson, diabète, athérosclérose, inflammations chroniques et anémies hémolytiques. Par ailleurs, l'antibiorésistance constitue une crise sanitaire mondiale. Selon l'OMS, elle tue chaque année des centaines de milliers de personnes et pourrait causer 10 millions de décès annuels d'ici 2050. La santé bucco-dentaire, souvent négligée, est également liée à des pathologies systémiques (cardiovasculaires, neurologiques, intestinales), certaines bactéries buccales pouvant passer dans la circulation sanguine.

La recherche de nouveaux agents naturels actifs représente donc un enjeu majeur de santé publique.

C'est dans ce cadre que nous avons choisi d'explorer deux substances naturelles aux propriétés reconnues mais encore insuffisamment caractérisées : la propolis et *Plumbago europaea L.*

OBJECTIF :

Ce travail met en évidence deux substances naturelles ayant joué un rôle important dans la médecine traditionnelle : la propolis et *Plumbago europaea L.* L'objectif de cette étude se divise en deux grandes parties : La première partie vise à analyser la composition chimique de la propolis provenant de différentes régions de la wilaya de Tlemcen (Algérie) et à évaluer ses propriétés biologiques, notamment ses activités antioxydante, antibactérienne, antifongique, immunostimulante et neuroprotectrice. Ensuite, une complexation des extraits de propolis avec la cyclodextrine sera réalisée, suivie du développement d'une formulation prototype à base de propolis pour une application en médecine bucco-dentaire.

La deuxième partie porte sur l'étude de la composition chimique de l'extrait à l'hexane des racines de *Plumbago europaea* récoltées dans la région de Tlemcen, ainsi que sur l'évaluation de ses activités antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et anti-hémolytique.

Il est important de souligner que ce travail constitue une étude préclinique *in vitro*. Il ne s'agit ni d'un essai clinique ni d'une preuve d'efficacité thérapeutique chez l'humain.

Sur le plan méthodologique, ce manuscrit est structuré en cinq chapitres (recherche bibliographique), principalement de la partie expérimentale qui est consacrée aux travaux réalisés en laboratoire, détaillant les résultats obtenus, les techniques employées et les protocoles expérimentaux suivis.

*Chapitre 1 : Généralités sur la
propolis*

I. Etymologie :

Le mot propolis est d'origine grec, il est divisé en deux parties *Pro* signifie "à l'entrée" et *polis* signifie "communauté", donc la Propolis désigne l'entrée de la communauté [1]. L'abeille enduit de la propolis pour protéger son habitat, pour cette raison le mot propolis vient d'une autre source, il vient du verbe *propolire* qui signifie "enduire" [1].

II. La production de la propolis par l'abeille :

La propolis appelée aussi la colle des abeilles, l'un des produits de la ruche, cette miraculeuse substance, de consistance visqueuse est d'abord collectée par l'abeille ouvrière à partir des résines sécrétées par des plantes, des bourgeons, les écorces des arbres et diverse source végétale ensuite elle est mélangée avec le pollen et des enzymes sécrétées par l'abeille (β -glucosidase) [1][2], la propolis est considérée comme l'un des produits de la ruche, plutôt une partie de son origine est végétale[2].



Figure 1: La résine de Pin [3].

III. L'utilisation de la propolis par l'abeille :

L'abeille utilise la propolis pour les constructions des locaux aseptiques pour la protection de la ruche contre les micro-organismes, les prédateurs et les épidémies, elle est aussi utilisée comme un isolateur thermique de la ruche et réparation des dommages [2].



Figure 2: Des abeilles fabriquent de la propolis dans la ruche [1].

IV. Historique :

La propolis, ce précieux produit apicole a accompagné l'être humain depuis des milliers d'années, elle était utilisée par les Romains pour les blessures des guerriers par les flèches, l'utilisation de la propolis pendant les batailles sert à accélérer les phases de la cicatrisation, pour les Grecs la propolis était un remède naturel aux nombreuses pathologies et aux infections de la peau, elle était utilisée aussi par les Egyptiens pour embaumer les cadavres (des pharaons) grâce à ses propriétés conservatrices [4]. Dans la littérature on trouve plusieurs auteurs et médecins Romains et Grecs comme Dioscoride, Gallien et Aristote dans son "*Historia Animalium*", ont décrit les différentes propriétés de la propolis et ses différentes utilisations dans la médecine populaire [5], ce qui prouve l'utilisation de la propolis depuis des temps anciens [5]. Les Arabes l'employaient pour son effet cicatrisant et antiseptique contre les brûlures et elle était utilisée aussi comme un désinfectant buccal [6].

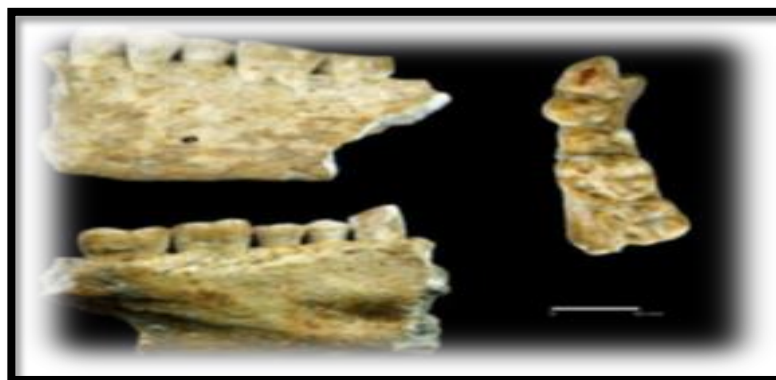


Figure 3: Machoire humaine âgée de 6500 ans dont la couronne canine gauche porte des traces de plombage à la cire d'abeille [7].

Au XII^e siècle la propolis a été utilisée pour les problèmes dentaires, l'ecchymose et les infections de la gorge.

Nous citons quelques textes des médecins anciens Arabes et Grecs :

“La propolis retire les aiguillons et ce qui est rentré dans la chair, elle réduit les enflures et ramollit les durcissements de la peau. Elle diminue les douleurs nerveuses, guérit les ulcères, abcès, furoncles, souvent incurables” Pline l'ancien.

“La propolis a la qualité de faire éliminer les pointes de flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement” Avicenne (Ibn Sina).

“La propolis est un remède aux affections de la peau, plaies et suppurations” Aristote.



Figure 4: Propolis brute [9].

V. Les principales espèces végétales qui sont la source de la production de la propolis :

La couleur de la propolis varie en fonction de la source végétale, des conditions environnementales, surtout la race d'abeille, sachant qu'il y a des milliers de types d'abeilles (grise, noire et jaunes) dans le monde, pour cette raison on trouve des propolis de différentes couleurs, d'une couleur jaune ambre jusqu'à brun foncé, cette différence de couleur donne un profil chimique particulier donc une activité biologique spécifique de chaque type de propolis [10].



Figure 5: Les différentes races de l'abeille brésilienne [11].



Figure 6 : L'abeille *Apis mellifera intermissa*.

Dans le tableau 1, on cite quelques types de *propolis*, les différentes sources végétales, les principales activités biologiques et les composés actifs de chaque propolis :

Origine géographique	La source végétale	Principales activités biologiques	Principaux Composés actifs
Europe, Afrique du nord, les régions non tropicales de l'Asie	Peuplier (<i>Populus</i>), famille des <i>Salicacées</i> .	Diurétique, Antiseptique, Fluidifiant.	Flavones et Flavanones Acides cinnamique et des esters phénoliques
Russie, Europe, Amérique du nord, Canada	Bouleau blanc (<i>Betula Verrucosa</i>) ou (<i>Betula Alba</i>).	Duirétique, Cicatrisante	Flavones, Flavanones Et sesquiterpènes.
Brésil	<i>Baccharis</i> spp, predominantly <i>B dracunculifolia</i> DC <i>Dalbergia</i> <i>Ecastaphyllum</i>	Antibiotique, Antioxydante.	Prénylés de l'acide <i>p</i> -coumarique, Acide diterpenique et les acides caféoylquiniques

Tableau 1: Type de propolis selon leur origine végétale, leur composition chimique et leurs principales activités biologiques [12][13][7].



Figure 7: Peuplier (Populus) [14]



Figure 8: Bouleau blanc [1]



Figure 9: Baccharis dracunculifolia [14]



Figure 10 : Populus Nigra[1]



Figure 11: *Dalbergia ecastaphyllum*[14].

Chaque région a une plante ou plutôt une source végétale préférée par les abeilles pour la récolte de la propolis, comme nous avons cité dans le tableau ci-dessus pour les régions tempérées, en Europe ou en Afrique du nord par exemple la source végétale principale est le Peuplier (*Populus*), il y a le *Populus Nigra* qui existe surtout en Europe, le *Populus Fremontii* qui existe en Afrique du nord et d'autres plantes qu'on peut trouver dans cette zone et que les abeilles l'utilisent pour la récolte de la propolis, on peut citer les conifères (*Sapins, pins*) ainsi les pruniers[12][13].

Concernant les régions tropicales comme le Brésil, le peuplier n'existe pas, l'abeille cherche à utiliser autres espèces comme le *Baccharis Dracunculifolia*, *Dalbergia Ecastaphyllum* comme une source végétale. Plusieurs études ont montré que la propolis du Peuplier est riche respectivement en flavonoïdes et les phenylpropanoïdes, alors que la propolis verte et rouge du Brésil est riche en dérivés prénylés de l'acide p-coumarique et certains iso flavonoïdes qui sont différents de ceux de la propolis du Peuplier.

VI. La récolte de la propolis par l'homme :

La propolis est récoltée par l'apiculteur selon deux techniques :

- a- Soit par grattage des parois de la ruche c'est une technique traditionnelle, la récolte se fait à température assez basse pour que la propolis se décolle facilement et se détache mieux, c'est pour cela la période idéale de la récolte est l'hiver, l'inconvénient de cette technique c'est que les impuretés sont récoltées avec la propolis au même temps [8].
- b- Soit par la technique biotechnologique, qui sert à utiliser des grilles en plastique ou en métal, les

abeilles ouvrières bouchent les mailles ou bien les trous de la grille à l'aide de la propolis, ensuite les grilles sont mises au congélateur, la propolis devient congelée cassante et moins collante, donc elle est facile à se détacher (à désolidariser) de la grille [8].



Figure 12: La récolte de la propolis par raclage [8].



Figure 13: Propolis sur la grille[8].

Une fois la propolis est congelée, l'apiculteur élimine les impuretés, tous ce qui est abeille morte ou des morceaux en bois, ensuite elle est broyée ou bien cassée en petits morceaux.

VII. Caractéristiques :

La propolis est une substance de consistance variable, elle est cassante et dure à basse température et elle est collante, molle et flexible à chaud, ce matériau de nature lipophile a une coloration différente y compris rouge, verte, brune, jaune avec une agréable odeur aromatique [3].

VIII. Conservation de la propolis :

Il est préférable de conserver la propolis dans des récipients bien fermés, à l'abri de la lumière et de la chaleur [15], sa conservation de longue durée ne diminue pas son effet thérapeutique ni sa teneur en composés bioactifs [16].

IX. Toxicité de la propolis :

La propolis n'est pas toxique si elle est consommée en quantités raisonnables, en 1994, Avroust-Grand a reporté un DL50 (propolis) de 7340mg/kg [17]. Selon une étude qui a été réalisée par *De Castro et Higashi* a montré qu'une administration orale de 200 à 1220 mg/kg d'extrait éthanolique de propolis pendant 10 jours n'entraînent pas un effet nocif [17].

X. Conclusion du chapitre 1 :

La propolis est une substance résineuse, recueillie par les abeilles à partir des bourgeons foliaires des arbres, la propolis est utilisée par l'abeille pour défendre la ruche contre la prédation et l'invasion des intrus et les micro-organismes et l'isolement thermique. La propolis a été utilisée depuis des temps anciens dans la médecine et les remèdes traditionnels dans nombreuses régions et différentes civilisations du monde en raison de ses activités biologiques variées. La couleur et la composition de la propolis varient selon les différentes sources botaniques, la race d'abeille, le climat la saison de récolte et la zone géographique.

Chapitre 2 : Caractérisation chimique de la propolis

I. Introduction :

Plusieurs études sur différents types de propolis ont montré qu'il y a plus de 300 composés chimiques ont été identifiés [18]. Ce qui montre la grande richesse de cette substance miraculeuse. Avec le développement des techniques d'analyse telles que la chromatographie en phase liquide (HPLC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la spectroscopie de masse (MS) et la résonance magnétique (RMN) ont permis d'identifier un grand nombre de composés notamment des flavonoïdes, des terpènes, des composés phénoliques et leurs esters, des sucres, des hydrocarbures et des éléments minéraux [19][20].

Dans ce chapitre nous avons décrit quelques composés et les familles de molécules les plus réponsus dans la propolis de différentes régions du monde.

II. Composition chimique de la Propolis :

Généralement la propolis se caractérise par une teneur moyenne de 50% de résine, 30% de cires, 10% d'huiles essentielles, 5% de pollen et 5% d'autres substances tels que les polyphénols et les Terpnoides ¹⁶ [19] (Figure14).

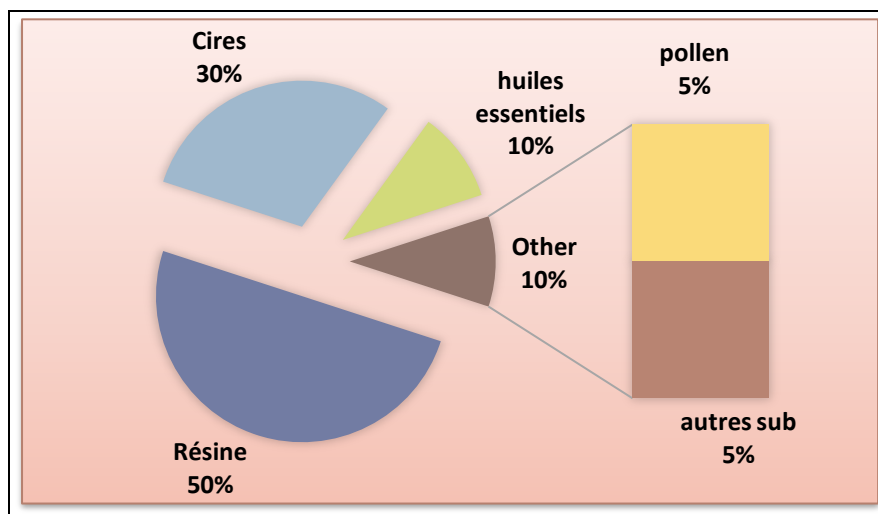


Figure 14: Composition de la propolis.

D'après nombreuses études plus de 300 composés ont été identifié dans la propolis, en général elle contient des polyphénols, les acides phénoliques, les esters, les aldéhydes et cétones [21].

Nous avons déjà mentionné dans le chapitre précédent que la composition de la propolis dépend de l'espèce de l'abeille, la source botanique et la zone géographique qui donne une complexité à sa composition, pour cette raison et depuis des années jusqu'à nos jours ,plusieurs études ont été réalisé pour l'identification de nouvelles molécules de la propolis[21].

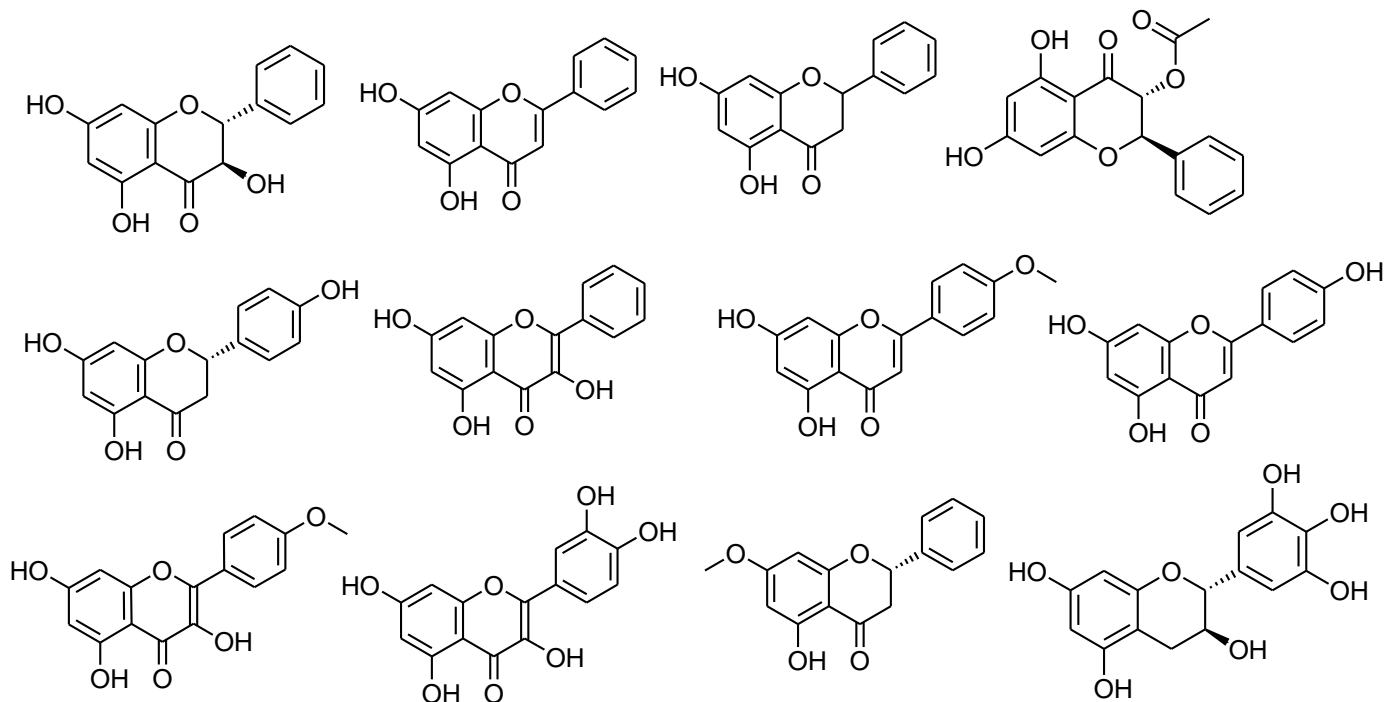


Figure 15: Les principaux flavonoïdes présents dans la propolis [19].

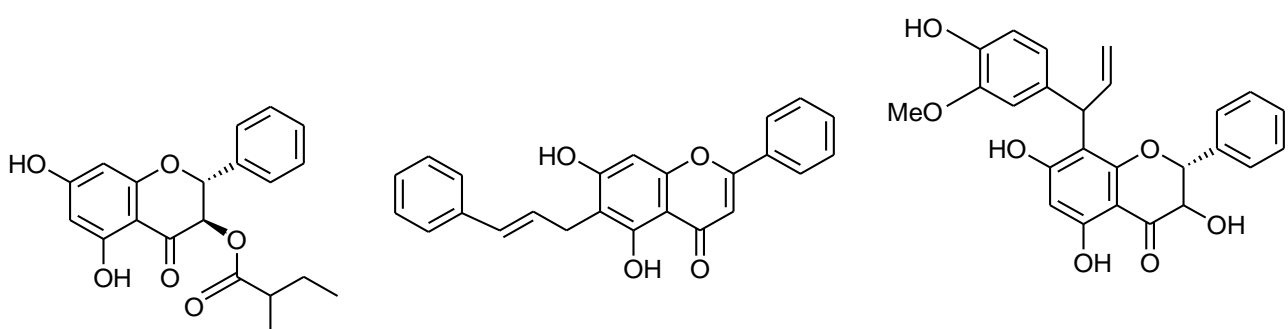


Figure 16: Flavonoïdes identifiés dans la propolis chinoise et mexicaine [20][21].

III. Les Terpènes :

Les terpènes représentent une classe importante des composés volatils qui sont présents dans la propolis tel que : l'Elémicine, trans-anéthol et le Méthyleugénole qui sont présents surtout dans la propolis rouge du Brésil, avec des propriétés biologiques importantes y compris l'anti inflammatoire, l'analgésique, l'anti fongique et l'effet chimio-préventif du cancer [22].

Les composés volatils représentent 10% de la constitution de la propolis, tandis que les terpènes sont les majeures des composés volatils [22].

Les mono terpènes isolés de la propolis sont sous trois formes : acyclique, monocyclique et di cyclique, les mono terpènes acycliques primaires sont les myrcènes et les p-menthanes, les mono terpènes monocycliques primaires sont les cinéole, les monoterpènes dicycliques dans la propolis sont classés en cinq groupes : Thujanes, Caranes, Pinanes, Fenchanes et Camphènes, les sesquiterpènes sont les constituants les plus abondants dans la propolis et ces sesquiterpènes appartiennent à quatre classes selon le nombre des cycles, les principaux sesquiterpènes acycliques de la propolis sont les dérivés du farnésane, les triterpènes tétracycliques sont les lanostanes et les cycloartane et les principaux diiterpènes de la propolis sont : Abiétane, Labdane, Cembrane, Totorane et Pimarane, les triterpènes pentacycliques sont l'Oléane, Lupane et l'Ursane [22].

Popova et al ont identifiés les diiterpénoides suivants dans la propolis grecque : ferruginol et ses dérivés et du totarol et ses dérivés qu'on les trouve généralement dans les plantes type *cupressacées*, certains triterpènes qui ont été identifiés pour la première fois dans la propolis grecque, cubaine,

Brésilienne, égyptienne et birmane appartiennent aux oléanes, ursanes et aux lanostanes [22].

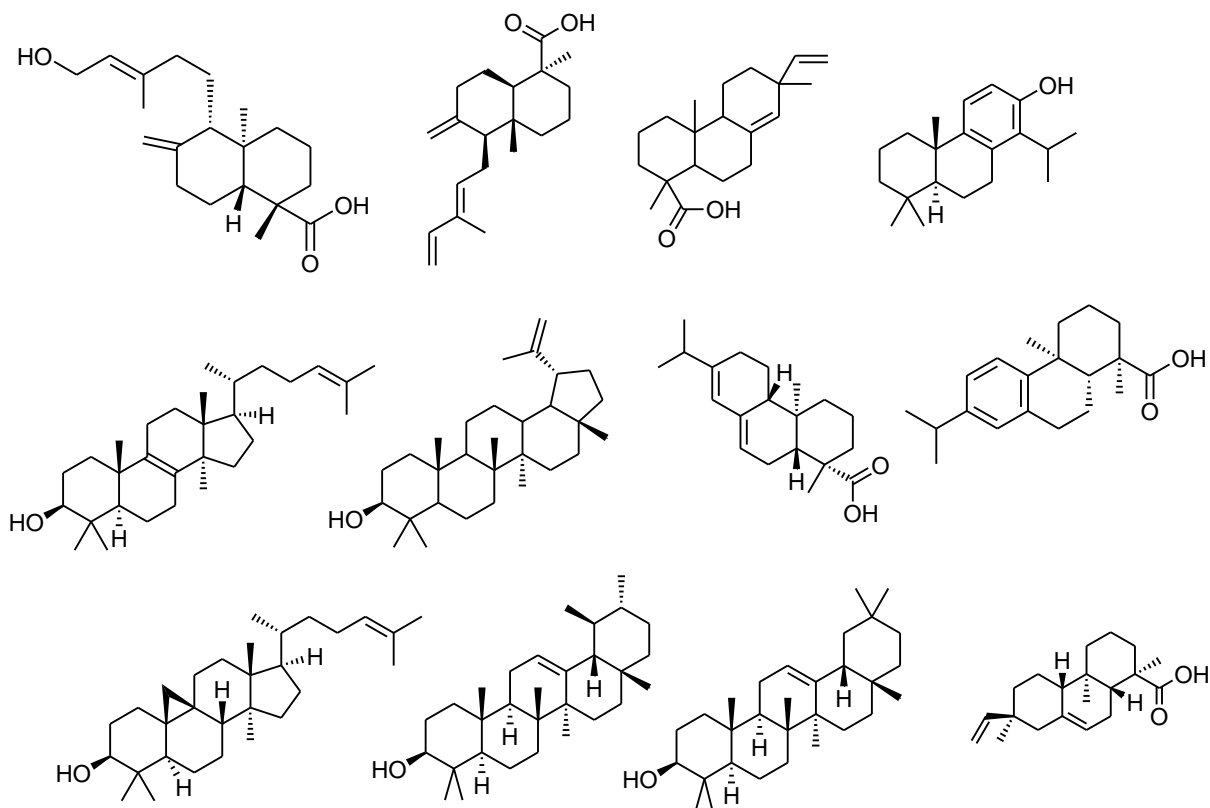


Figure 17: La structure de quelques terpènes et leurs dérivés présents dans la propolis [23].

IV. Les composés phénoliques :

La propolis verte brésilienne est très riche en composé phénoliques tels que l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide cinnamique et leurs dérivés [22]. Pétrouva *et al.* ont identifiés deux molécules : schweinfurthin A et schweinfurthin B dans la propolis de Kenya, la seule source végétale de ces deux molécules à ce jour est la *Macaranga schweinfurthii* [23]. Une autre molécule a été identifiée en 2012 : le 5-farnesyl-3'-hydroxyresvératrol dans l'île Salomon, cette molécule se trouve uniquement dans une plante qui s'appelle *Macaranga* [24].

D'après les résultats ils ont suggérés que la *Macaranga* est probablement la source végétale de l'abeille de Kenya et l'île Salomon [21]. Les lignanes sont les principaux composés de la propolis tropicale, les trois premiers lignanes qui ont été identifiés sont : Tetrahydrojusticidine B, 6-Méthoxydiphylline et Phyllamricine C dans la propolis kenyane [22]. Tschimagine, Tschimganine, Ferutinine et Téflon sont identifiés dans la propolis iranienne et se sont les composés qui caractérisent l'espèce *Ferula* qui est considérée comme une source végétale de l'abeille iranienne [22].

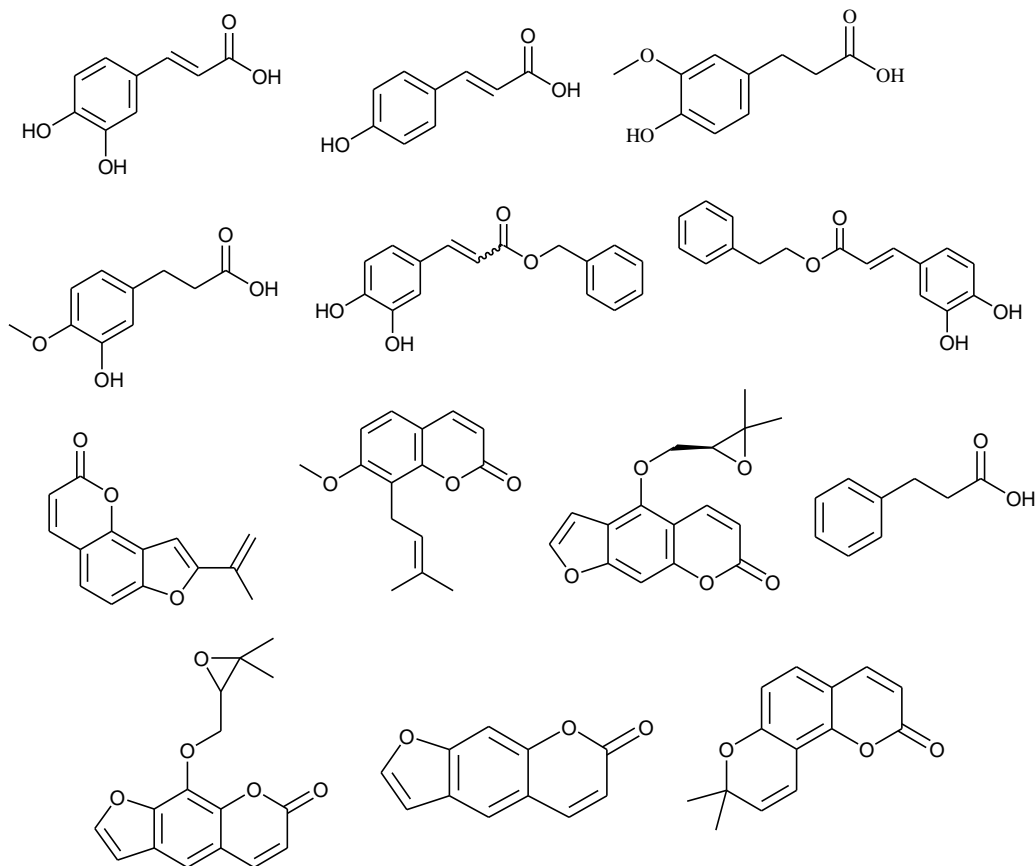


Figure 18: La structure de quelques composés phénoliques [23].

a. Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont considérés comme principaux constituants de la propolis, sont les plus courants et plus actifs comme la Chrysin et la Quercétine [19], ils sont classés selon la structure en :

Flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, chalcones, dihydrochalcones, isodihydroflavones, flavanes, Isoflavanes et néoflavonoïdes. La quantité de flavonoïdes dans la propolis est utilisée comme un critère pour évaluer la qualité de la propolis grâce à son large spectre de propriétés biologiques et ses effets thérapeutiques [25]. Depuis 2000 jusqu'à 2012, 112 flavonoïdes ont été identifiés pour la première fois dans la propolis de diverse origine botanique. Le glycoside de flavonoïdes sont très rare dans la propolis il s'agit de l'isorhamnétine-3-O-rutinoside et de la flavone C-glycoside [26] [27].

Quatres flavonols (1 à 4) ont été identifiés pour la première fois dans la propolis provenant du Kenya et les îles Salomon et les chercheurs ont confirmés que ces composés présentaient une très bonne activité antibactérienne [27]. Les chimistes ont identifiés des flavanones prénylés (5à 15) elles montraient une activité antimicrobienne importante, cela dû à la présence du groupe prénylique lipophile qui peut endommager rapidement les parois cellulaire et la fonction de la membrane [28].

Cinq flavones ont été identifiés pour la première fois (16 à 20) dans la propolis polonaise, chinoise, mexicaine et égyptienne [21], certains flavanones ont été identifiés surtout dans la propolis du peuplier (21 à 26), trois flavanonols (27-28-29) ont été également identifiés dans la propolis népalaise, portugaise et la propolis australienne [22].

N°	Type de flavonoïde	Nom du composé chimique	Origine géographique
1	Flavonols	2'-(8''-Hydroxy-3'',8''-dimethyl-oct-2''-enyl)-quercetine.	îles Salomon
2		8-(8''-Hydroxy-3'',8''-dimethyl-oct-2''-enyl)-quercetine	
3		2'-Geranylquercetine	
4		Macarangin	
5	Flavanols prénylés	5,7,3',4'-Tetrahydroxy-5'-C-geranylflavanone	Kenya
6		5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-C-geranylflavanone	
7		5,7,3',4'-Tetrahydroxy-2'-C-geranylflavanone	
8		5,7,3',4'-Tetrahydroxy-2'-C-geranyl-6-prenlyflavanone	Japan
9		Propolin A	Taiwan
10		Propolin B	
11		Propolin E	
12		Sigmoidin B	
13		Bonannione A	

14		Solophenol A	îles Salomon
15		Sophoraflavanone A	Chine
16	Flavones	Luteolin	
17		6-Cinnamylchrysin	Pologne
18		3',5-Dihydroxy-4',7-dimethoxy flavone	Egypte
19		Hexamethoxy flavone	Mexique
20		(7''R)-8-[1-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl) prop-2-en-1-yl]chrysin	Chine
21		3-O-[(S)-2-Methylbutyroyl]pinobanksin	Portugal
22	Flavanones	Hesperitin-5,7-dimethyl ether	
23		Pinobanksin-5-methyl-ether-3-O-pentanoate	
24		(2R,3R)-3,5-Dihydroxy-7-methoxyflavanone 3-(2-methyl)-butyrate	Mexique
25		(2R,3R)-6[1-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl) prop-2en-1-yl]pinobanksin	
26		(2R,3R)-6[1-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl) prop-2en-1-yl]-pinobanksin-3-acetate	
27		(2R, 3R)-3,6,7-Trihydroxyflavanone	Népal
28		5-Methoxy-3-hydroxyflavanone	Portugal
29		5,7-Dihydroxy-6-methoxy-2,3-dihydroflavonol-3-acetate	Australie

Tableau 2: Les flavonoides identifiés dans la propolis de différents pays du monde [22].

V. Les anthraquinones et les coumarines :

Une étude a été réalisée sur la propolis italienne, l'analyse de sa composition chimique a signalé la présence des anthraquinones et les coumarines y compris l'autraptène, l'umbelliferone et la présence du 7-isopentenylcoumarine [23]. Une étude a été réalisée par Bayram et *al* a montré que la propolis turque collectée de la région d'Hakkari est riche en coumarine où 26 coumarines ont été détectées y compris lomatine, methoxsalene, oroselone, osthole, oxypeucedanin, prangenin, psoralen, seselin, angelicin, Bergapten, bergaptol, columbianetine, decursine, isogeijerine et jatamansine [29].

VIII. Les éléments minéraux :

Les éléments minéraux tels que : Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr et Zn ont été identifiés pour la première fois dans la propolis récoltée de différentes régions de la Croatie et de l'Argentine par spectrométrie d'émission/absorption atomique et par analyse d'activation neutronique [21].

IX. La composition chimique de la propolis Algérienne :

Très peu d'études sont réalisées sur la composition chimique de la propolis algérienne et sur son origine botanique, dans cette partie nous avons décrit les travaux cités dans la littérature sur la composition chimique de la propolis de différentes régions de l'Algérie.

La composition chimique de quatre échantillons de la propolis de différentes zones de la wilaya de Sétif (Babor, Sétif, Ain Abbass et Boutaleb) a été déterminée par GC/MS, plus de 20 composés ont été identifiés dans chaque extrait y compris la chrysin, acide cinnamique, acide benzoïque, 2,3,5-acide triméthoxymandélique, acide 3-chloro-2-fluorobenzoïque, 2-O-méthylcajanone, acide déshydroabietique, acide pimarique, acide abiétique, acide hydroxydéhydroostéviq, docosane, butane, octadécane, acide hexadécanoïque, nonahexacontanoïque, thymol, gamma-éléène, bêta-guaiène, pagicerine, démcolcine. Une autre étude a été réalisée sur la propolis de Jijel, sa composition a été déterminée par LC/MS (HPLC-DAD), les principaux flavonoïdes qui ont été détectés sont : Pinocembrin, Tectochrysin et la Pinostrobin [32]. Les extraits méthanoïques de la propolis récoltée à Oum El-Bouaghii et Collo (Skikda), ont enregistré par analyse HPLC/MS la présence des acides phénoliques (tels que l'Acide gallique, l'Acide caféique) et les flavonoïdes (tels que l'Apigénine, la Quercétine) [33], papavérine, aspidospermidine, thébaine, N, Odimethylstephine et morpholine, des sucres et leurs acides ont été également identifiés dans les extraits [34].

Segueni et al ont arrivé à isoler cinq composés pour la première fois de la propolis algérienne La propolis a été récoltée dans le nord-est de l'Algérie (Jijel) en 2006, les molécules sont représentées dans la figure 21 : Il a été établi que le composé 1 est le 5,7-dihydroxy-6,40-diméthoxyflavone (Pectolargénine), composé 2 est le 5, 7, 8-trihydroxy-6,40-diméthoxyflavone (pilosine), composé 3 est le 6,7-dihydroxy-7,40-Diméthoxyflavone (ladaneine), le composé 4 est le 5,7-dihydroxyflavone (Chrysin) et le composé 5 est le 5, 7,40-trihydroxyflavone (Apigénine) [35].

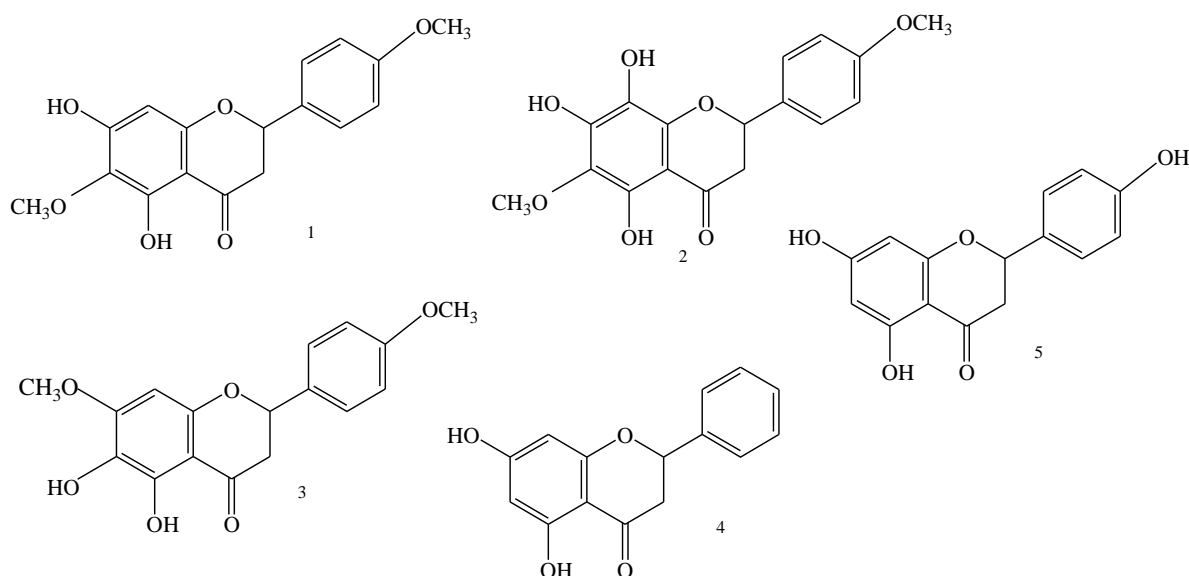


Figure 20: La structure des composés isolés de la propolis algérienne (Jijel) Composé 1 : $C_{17}H_{14}O_6$, Composé 2 $C_{17}H_{15}O_7$, Composé 3 : $C_{17}H_{14}O_6$, composé 4 : $C_{15}H_{10}O_4$, composé 5 : $C_{15}H_{10}O_5$ [35].

Une étude a été réalisée par Piccillini et *al.* qui a permis l'identification de l'acide caféique et ses dérivés, l'acide férulique, l'acide cinnamique la Chrysin, la galangine, la Pinobanksin et d'autres composés, dans la propolis algérienne récoltée dans différentes régions de l'Algérie (Ait Ousalah, Amtik Ntfaat, Bejaia, Ibouhatmen, Boulimat, Iazouen Amizour, Boumerdes, Akbou Ouadghir, Tizi Ouzou, Iakouren et Bejaia) et ces composés sont considérés des marqueurs de la propolis du *peuplier* [36].

Une autre étude a été réalisée par Boutabet et *al.* qui a permis de détecter les flavonoïdes, les sesquiterpènes et d'autres composés dans la propolis Algérienne (récoltée au niveau de la wilaya de Jijel), on peut citer quelques composés : Pinostrobin, Catéchine et Tectochrysin [37].

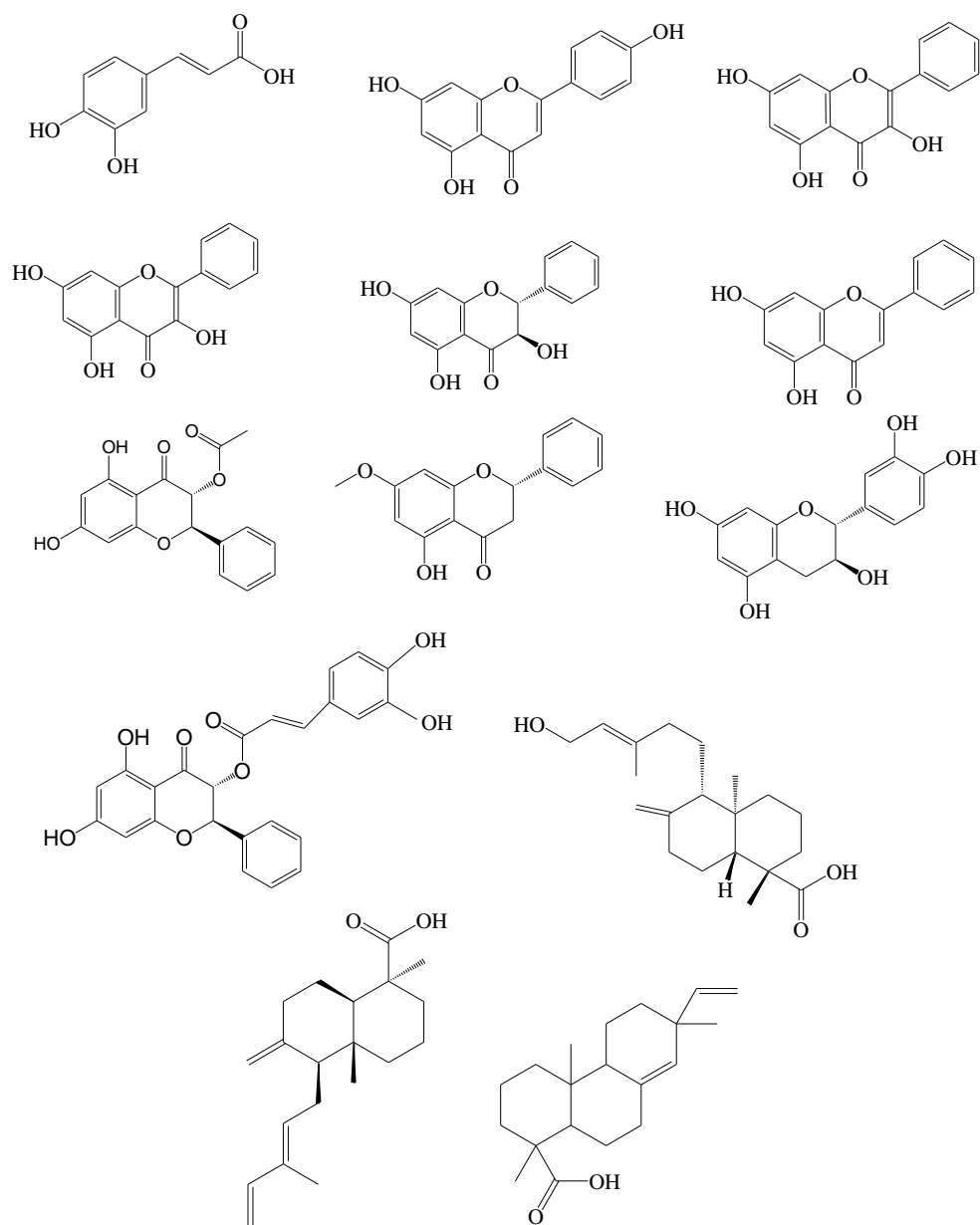


Figure 21: Structure de quelques composés présents dans la propolis algérienne [36].

X. Conclusion du chapitre 2 :

La propolis est un produit naturel et résineux qui a un grand potentiel d'utilisation dans différents domaines. La composition chimique complexe de la propolis est extraordinairement variable et elle a une incroyable richesse en composés biologiquement actifs, elle a fait l'objet de plusieurs études, comme déjà mentionné, cette composition chimique peut varier en fonction de plusieurs paramètres surtout la zone géographique et l'origine botanique, ses constituants tels que les flavonoïdes (y compris les flavonols, les flavones, les flavanone) les acides phénoliques et leurs esters sont responsables des activités biologiques bénéfiques de la propolis.

*Chapitre 3 : Propriétés
pharmacologiques de la propolis*

I. Introduction :

La propolis a été utilisée thérapeutiquement depuis des siècles par l'homme [38], les Grecques et les Romains ont utilisé la propolis pour ses propriétés cicatrisantes à guérir les plaies et elle a été utilisée également par les Egyptiens pour atténuer beaucoup de maux [1]. La propolis a un large spectre d'activités biologiques, elle présente de fortes propriétés pharmacologiques et au même temps une faible toxicité [39], plusieurs études ont montré que cette substance a une activité antioxydante, antimicrobienne, activité cytotoxique, anti herpétique et antivirale [40] [41], en raison de ses nombreuses propriétés pharmacologiques, elle est utilisée dans les boissons et les aliments pour prévenir les maladies et améliorer la santé de l'être humain [42].

II. Activité antibactérienne et antifongique :

Plusieurs études ont confirmé l'activité anti bactérienne de la propolis, ce mode d'action est dû principalement à l'interaction entre les composés phénoliques et d'autres composés tels que la Galagine, la Pinobanksin et la Pinocembrin [43]. La propolis est un agent bactéricide, elle détruit les parois cellulaires et arrête la division de la cellule bactérienne [44]. Ce produit apicole a un effet antibactérien contre certaines bactéries aérobies telles que : *Micrococcus luteus*, *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus auricularis*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warnerii*, *S. mutans*, *S. hominis*, *Streptococcus cricetus*, *St. faecalis*, *acillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus*, *St. pyogenes*, *St. pneumoniae*, *St. sobrinus* et *St. Viridians* [45].

Les composants qui ont été isolés de la propolis comme l'acide p-coumarique et l'acide 3-phényl,4-dihydrocinnamylocinnamique ont montré une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis *Helicobacter pylori*, l'Apigénine restreint fortement la glycosyltransférase bactérienne et la pinocembrin a montré une activité antibactérienne vis-à-vis les *Streptococcus spp* [46]. La pinocembrin a présenté également une activité antifongique contre le *Penicillium italicum* en arrêtant la croissance du mycélium, elle agit sur la respiration du pathogène et l'homéostasie énergétique qui conduit à un trouble du métabolisme et la rupture de la membrane cellulaire [47].

La race d'abeille est un des facteurs qui influe sur l'activité biologique de la propolis, Silica et Kutluca ont comparé l'activité antimicrobienne de la propolis du *Peuplier* recueillie par trois races d'abeilles d'une même région : *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera anatolica* et *Apis mellifera carnica*,

les résultats ont montré que la propolis récoltée par *Apis mellifera caucasica* a une activité antibactérienne supérieure à celle recueillie par *Apis mellifera anatolica* et *Apis mellifera carnica* [48].

III. Activité anti tumorale (anticancéreuse) :

Il a été démontré que la propolis a la capacité de provoquer le vieillissement des cellules tumorales et arrêter la synthèse de l'ADN dans ces cellules, elle possède la propriété de mettre en action les globules blancs pour générer des agents capables de réguler la fonction des cellules tueuses naturelles, les cellules T[36][49].

L'effet anti tumoral de la propolis est dû principalement aux composés phénoliques [50]. Il a été démontré que les composés de la propolis tels que le phenylester (CAPE), l'acide caféique et L'Artepilline C ont un effet anti tumoral [51], ces composés participent à l'inhibition des métallo protéinases matricielles, à l'effet anti-angiogénèse et l'arrêt du cycle cellulaire (cycle des cellules tumorales) [52].

L'activité anti-cancéreuse de la propolis est dû à la présence des flavonoïdes qui ont la capacité de stopper le cancer des poumons, cancer du sein, cancer de la bouche, ainsi que le cancer de l'estomac colorectal, de la peau, de la prostate et le cancer de l'œsophage [53].

L'origine de la propolis	Les cellules cancéreuses
Propolis Tunisienne [54]	Adénocarcinome du colon humain, adécarcinone pulmonaire humain, monocyte macrophage leucémique de souris [54].
Propolis Turque [55]	Adécarcinone mammaire humain [55]
Propolis portugaise [56]	Carcinome rénal humain [56].
Propolis Grèque [57]	Adénocarcinome du colon humain [57].
Propolis Taïwanaise [58]	Gliome du rat, glioblastome humains [58].

Tableau 3: L'activité anti-cancéreuse de la propolis de différentes origines.

IV. Activité anti inflammatoire :

La propolis est considérée comme un agent anti inflammatoire, ce mode d'action est dû principalement aux flavonoïdes [59]. Il a été démontré que la propolis régule les substances inflammatoires qui sont produites dans les cellules [60].

Une expérience a été réalisée sur des mastocytes des porcins pour évaluer l'activité anti inflammatoire de la propolis, les résultats ont montré que la propolis contrôle l'activité de la NADPH oxydase, l'ornithine décarboxylase, l'activité de la myéloperoxydase, l'hyaluronidase et l'activité de la tyrosine-protéine kinase [60].

La Galengine et le CAPE se sont des composés de la propolis, plus précisément la propolis du *peuplier*, ces deux molécules ont montré une bonne activité anti inflammatoire en inhibant l'inflammation arthritiques, la pleurésie et l'œdème à la carragénine chez les rats [52].

V. Activité antioxydante :

Le mode d'action de l'activité antioxydante de la propolis est dû principalement aux composés phénoliques qui donnent des ions d'hydrogène H^+ aux radicaux libres pour protéger les cellules des réactions d'oxydation, ces radicaux sont également la conséquence de l'oxydation des protéines, des lipides et les acides nucléiques, ils sont aussi la conséquence principales des maladies telles que la maladie d'Alzheimer, Parkinson, le diabète, le cancer [58].

VI. Activité antivirale :

La propolis présente une activité antivirale, elle perturbe la réplication virale ce qui entraîne la destruction d'ARN du virus en inhibant son entrée dans la cellule [58]. Un composé isolé de la propolis du peuplier appelé 3-méthyl-but-2-ényl-caféate dérivé de l'acide caféique a inhibé la synthèse de l'ADN du virus *l'herpès simplex (type 1)*. Plusieurs études ont montré que la propolis a une activité antivirale contre le virus de *l'herpès bursal*, le virus de *la grippe aviaire*, le virus de *la fièvre de la vallée du Rift*, le virus de *la maladie de Newcastle* et le virus de *l'influenza* [58].

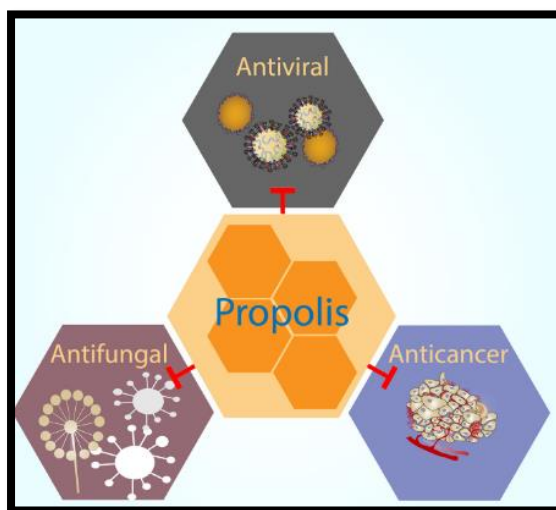


Figure 22: L'activité antivirale, antifongique et anticancéreuse de la propolis..

VII. Activité neuroprotective :

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme la plus courante de démence dans la société, le nombre des cas de MA augmente d'une façon spectaculaire [50].

La surproduction des espèces réactives de l'oxygène ROS provoquent des dommages cellulaires, cela favorise la peroxydation des lipides en endommageant l'ADN qui cause la mort cellulaire [50].

Une étude a été réalisée sur l'effet neuroprotecteur de la propolis verte brésilienne, l'étude a été réalisé sur des cellules humaine de neuroblastome SHSY5Y, ils ont constaté que le traitement avec la propolis a considérablement amélioré la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les cellules, elle a réduit également de manière significative les espèces réactives de l'oxygène ROS générées par H₂O₂ et elle a réduit les marqueurs de dommage oxydatifs de l'ADN, ces observation suggèrent que la propolis protège les neurones des dommages neurodégénératifs et elle peut être un agent thérapeutique précieux pour la prévention de la maladie d'Alzheimer [61].

VIII. Docteur Propolis :

Un biologiste Danois qui s'appelle Dr Karl-Lund Aagaard s'est fait connaitre sous le nom Dr Propolis, pour ses exploits de plus de 20 ans de collecte et de recherches sur la propolis [62], après ses observations sur les effets de la propolis sur 50.000 patients en Scardinavie il a tiré la conclusion suivante :

« Le champ d'action de la propolis est extrêmement vaste, il comprend le cancer, l'infection des voies urinaires, gonflement de la gorge, goutte, plaies ouvertes, congestion des sinus,

le rhume, la grippe, la bronchite, la gastrite, les maladies des oreilles, les maladies parodontales, les infections intestinales, ulcères, éruptions d'eczéma, pneumonie, arthrite, maladies pulmonaires, virus de l'estomac, maux de tête, maladies de l'estomac maladies pulmonaires, virus de l'estomac, maux de tête, maladie de Parkinson, infections biliaires, sclérose, troubles de la circulation, Verrues, conjonctivite et enrrouement. » [54]

IX. La propolis Algérienne :

La composition chimique, l'origine de la source botanique et les propriétés thérapeutiques de la propolis algérienne sont encore limitées, on peut citer dans cette partie quelques études importantes sur l'activité biologique de la propolis algérienne. Une étude *in vivo* a été réalisée par Lahoul et *al.* qui a montré que la propolis collectée dans différentes régions de la wilaya de Jijel (nord-est d'Algérie) a la capacité de réduire les effets toxiques de la doxorubicine induits par le stress oxydatif [35], d'autres travaux ont montré que la propolis algérienne a un effet modulateur de la métalloprotéinase-3(MMP-3) ce qui permet de dire que cette propolis peut être un futur agent de contrôle de la cascade protéolytique impliquée dans plusieurs troubles pathologiques tels que : la polyarthrite rhumatoïde, la parodontite et l'athérosclérose [37].

Quatre échantillons de propolis collectés dans quatre localités de la région de Sétif, en Algérie ont montré une bonne activité antibactérienne contre les principaux pathogènes bactériens dans le saumon de mer *Shewanella putrefaciens* et *Photobacterium damsela*, ces échantillons ont modulé significativement l'activité des leucocytes (*in vitro*), ce qui prouve que la propolis algérienne a un potentiel autant qu'un agent biocide riche en composés bioactifs et immun modulateur dans la pratique aquacole [34]. Boulchefar et *al.* ont évalué l'effet cytotoxique de l'extrait méthanoïque de la propolis de la wilaya de Skikda (Collo) et Oum El-Bouaghi contre le cancer du foie humain, alors les résultats obtenus ont révélé que ces deux extraits possèdent un potentiel important d'inhibition des cellules cancéreuses HepG2 [37].

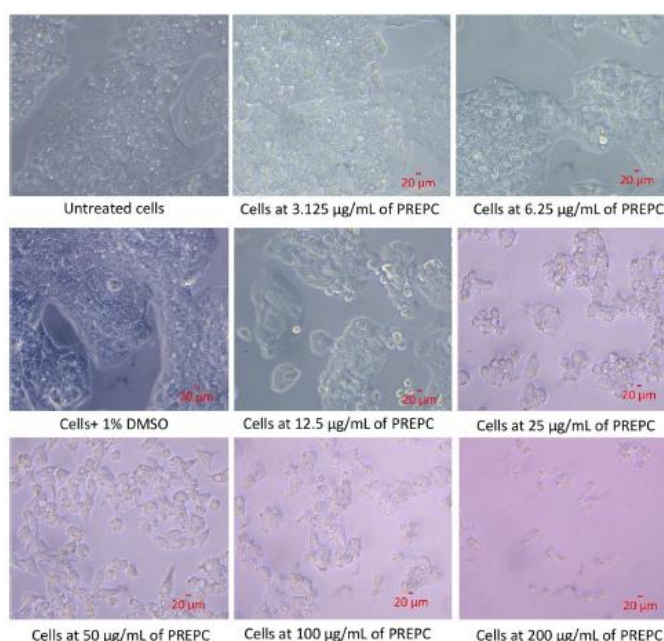


Figure 23: Effets morphologique de la propolis de Skikda sur les cellules HepG2 observés au microscope [37].

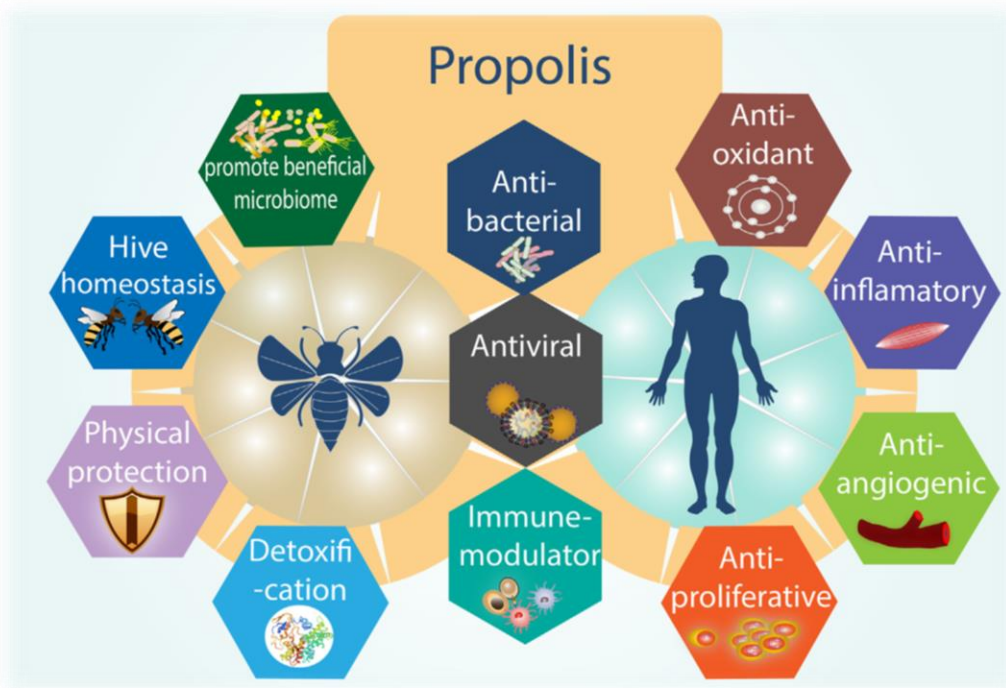


Figure 24: Un résumé de l'effet de la propolis sur l'abeille et l'homme [63].

X. Conclusion du chapitre 3 :

La propolis est un produit végétal fabriqué par l'abeille à partir de ses sécrétions salivaires, les résines et les gommes qu'elle collecte sur les bourgeons et les fleurs, elle est connue depuis l'antiquité pour ses multiples usages, elle était utilisée comme agent cicatrisant par les soldats Romains, les Egyptiens l'utilisaient pour embaumer leurs pharaons (les momies), dans le cadre de l'api thérapie, la propolis a attiré l'attention des chercheurs et plusieurs études scientifiques ont montré que la propolis possède un large spectre d'activités pharmacologiques, des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré que la propolis pourrait avoir des propriétés antioxydante, antibactérienne, elle ralentit le développement des cellules cancéreuses dans plusieurs types de cancer, elle possède une activité anti-inflammatoire, antivirale, neuroprotective et d'autres activités biologiques importante.

Chapitre 4 : Application de la
Propolis en médecine
buccodentaire

I. Introduction :

La Carie dentaire est une maladie infectieuse buccale [64], elle est considérée comme un problème majeur de la santé dentaire publique [65] et elle est très répandue dans tous les segments de la population mais surtout chez les enfants [57] [58]. La Chlorhexidine est considérée comme un antiseptique le plus efficace pour la prévention et le traitement des maladies buccodentaires mais l'inconvénient de l'utilisation systémique de cette substance chimique " synthétique " n'est pas recommandé en raison des effets secondaires locaux [57], c'est pour cela la recherche est très active dans le domaine de la médecine buccodentaire pour détecter des composés naturels pour prévenir les caries dentaire [57]. La propolis ,cette substance résineuse, fabriquée par les abeilles, qui est utilisée pour la construction et la prévention de leur ruche a attiré l'attention des chercheurs [58] [66] en raison de sa nature adhésive [58] et plusieurs études ont été réalisées sur la propolis pour évaluer ses effets sur le développement des caries dentaires et les infections de la cavité buccale, ils ont constaté que la propolis peut être utilisée comme une thérapie naturelle contre l'infection de la cavité buccale sans effets secondaires[58].

II. Efficacité de la Propolis dans le traitement de la stomatite aphteuse :

La stomatite aphteuse récurrente SAR est une maladie multifactorielle, elle est parmi les lésions buccales les plus courantes [67]. Parmi les symptômes les douleurs et des difficultés à manger, à avaler qui nuit la qualité de vie de la personne [32]. Une étude a été réalisée pour examiner l'effet de la Propolis sur la stomatite aphteuse récurrente SAR tout en comparant à des placebos, les résultats ont indiqué que la Propolis peut réduire la rougeur, soulager la douleur et réduire la durée de la cicatrisation chez les patients souffrants de la SAR par rapport à un placebo [32].

III. Propolis : Anti caries :

Streptococcus mutans est considéré parmi les micro-organismes les plus fréquents présents dans la cavité buccale, qui est capable d'adhérer aux dents et survivre dans un environnement acide [63].

En se basant sur des rapports bibliographiques, plusieurs études ont montré que la propolis est un produit apicole ayant une activité bactéricide, des expériences *in vitro* et certaines *in vivo* ont démontré que la Propolis peut être utilisée pour traiter des maladies bactérienne et d'autres études ont conclu que la Propolis utilisée comme bain de bouche possède une activité antimicrobienne contre *S.mutan* et elle peut même être utilisée comme une mesure alternative pour prévenir les caries dentaires [68].

Il y a d'autres groupes de bactéries qui contribuent au développement des caries dentaires telle que *S.sobrinus*, *S.cricetus*, *Scardovia.spp*, mais les plus importantes sont *Strptococcus mutans* et *Lactobacillus spp*. Selon une étude qui a été réalisé sur des rats infetés par *S.sobrinus*, l'eau de boisson enrichie en propolis a réduit de manière significative (50%-60%) l'incidence des caries dentaires chez ces rats [69].

Duailibe et al ont invité vingt volontaires à réaliser une expérience pour étudier l'effet de rinçage de la bouche par un extrait de propolis pendant 1min, des échantillons de salive ont été prélevés une heure plus tard comparés aux échantillons de salive initiaux des mêmes volontaires avant le rinçage, ils ont constaté une réduction de 62% de nombre de colonies de *S.mutans* [70].

IV. Propolis : Anti plaques :

Six volontaire ont participé à une étude réalisée en deux phases de trois jours, ces volontaires ont abstenus de toute hygiène bucco-dentaire et se sont rincés avec des solutions de saccharose cinq fois par jour pour favoriser la formation des plaques dentaires et avec un bain de bouche contenant de la propolis deux fois par jour, le quatrième jour , l'indice de plaque IP a été évalué et la plaque dentaire supra gingivale a été analysé, le bain de bouche contenant de la propolis a réduit la concentration de IP dans la plaque dentaire, le bain de bouche préparé à partir de la Propolis a été efficace pour réduire la formation de la plaque supra gingivale et la formation de l'IP dans des conditions de forte accumulation de plaque [71].

V. Propolis : Cancer buccal :

L'étude réalisée par Cavalcante et *al.* a démontré que l'extrait éthanolique de la propolis a diminué la dysplasie induite chimiquement dans la langue des rats, la propolis et ses constituants bioactifs tels que l'acide férulique, l'acide caféique et p-coumarique induisent l'apoptose des cellules de carcinome squameux de la langue humaine (cellule CAL27) [53]. La Quercétine est un composé bioactif de la propolis, cette molécule a des propriétés anticancéreuses inhibe la carcinogénèse orale induite chimiquement chez les rats, inhibe également la prolifération des cellules cancéreuses [53]. La CAPE est un composé de la propolis, il inhibe la croissance de fibroblastes dans la muqueuse buccale, il inhibe également la croissance des cellules du carcinome épidermoïdes de la langue [53].

VI. Propolis : Traitement de la gingivite et la parodontite chronique :

Une expérience a été menée sur quatre patients présentant un diagnostic de parodontite chronique et de gingivite, les patients devaient appliquer un gel une fois par semaine, se brosser les dents et faire un rinçage buccal à la propolis verte brésilienne pendant cinq semaines, les résultats ont montré une réduction de 95% de la gingivite ainsi une baisse de la profondeur des poches parodontales et une diminution de la mobilité dentaire [72] [73].



Figure 25: à droite : avant traitement ; à gauche : après traitement à droite [73].

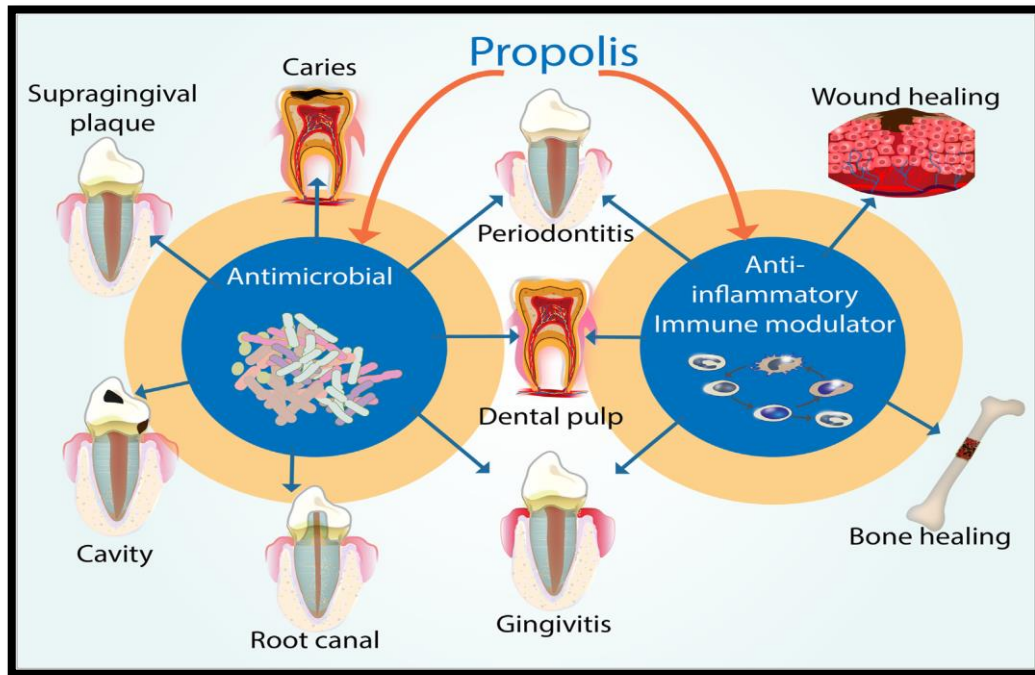


Figure 26: Résumé de l'utilisation de la propolis en dentisterie [53].

VII. Etudes et résultats expérimentaux des produits bucco-dentaires à base de propolis :

Dans cette partie nous avons résumé quelques études expérimentales réalisées *in vitro* et *in vivo* dans des tableaux sur les dentifrices et les bains de bouche à base de propolis.

a. Les dentifrices :

a.1. *In vitro* :

Etude	Souches bactérienne testées	Type de propolis	Paramètre étudié /Matériels et méthodes	Résultats
Dentifrice à la propolis à 2% [74]	<i>S. mutans</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. mitis</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. rattus</i> <i>A. naeslundii</i> <i>S. sanguis</i> <i>A. viscosus</i> <i>S. oralis</i> <i>L. casei</i>	Propolis brésilienne	CMI et CMB/ Méthodes de diffusion sur gélose et exposition des souches bactériennes au dentifrice à la propolis [74].	Inhibition croissance des souches de bactéries Gram + (concentration de 3 à 7 mg/mL) Efficacité sur l'inhibition complète de la croissance des bactéries cariogènes formant la plaque dentaire [74].
Dentifrice avec propolis Dentifrice sans propolis Dentifrice à la chlorhexidine [75]	<i>A. naeslundii</i> , <i>Veillonella dispar</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>Candida albicans</i>	Non identifié	CFU/Méthode de diffusion sur gélose, exposition biofilm et analyse sous stéréomicroscopie [75].	Pas de réduction significative des CFU entre les différents dentifrices. Inhibition de la croissance du biofilm supra-gingival pour tous les dentifrices [75].

Tableau 4: Etude in vitro des dentifrices à base de propolis

a.2. *In vivo* :

Etude	L'état de santé buccale du patient	N° du patient	Type de propolis	Paramètre à étudier	Résultats
Etude comparative des dentifrices avec et sans propolis [76]	Non décrit	30	Non décrit	PI	Efficacité du dentifrice avec propolis sur la plaque dentaire [76]
Utilisation de dentifrice à la propolis une fois par jour pendant quatre semaines/prélèvement de salive [77]	Patients avec stade de dentition mixte	30	Propolis de Séoul	CFU	Efficacité antimicrobienne sur les souches <i>S.mutans</i> [77]
Utilisation de dentifrice Asa Parodont en ajoutant 10 gouttes d'extrait de propolis/prélèvement de plaque [78]: Groupe1 : utilisation de dentifrice uniquement Groupe2 : utilisation de dentifrice + extrait de propolis [78]	Patients avec dentition permanente et gingivite modérée induite par la plaque dentaire	70	Propolis Bulgare	PI	Groupe 1 et 2 : Eradication complète de <i>Fusobacterium varium</i> , de Cocci a Gram - et de <i>Prevotella intermedia</i> [78]. Groupe 2 : Eradication complète <i>S. mutans</i> , <i>C. albicans</i> , de bâtonnets a Gram + de <i>Porphyromonas asaccharolyticus</i> , de <i>Prevotella bivia/melani</i> et de <i>S. intermedius</i> . Efficacité du dentifrice+ l'extrait de la propolis pour améliorer la santé gingivale et une bonne activité antimicrobienne sur les pathogène cariogènes et parodontaux [78]

Tableau 5: Etude in vivo des dentifrices à base de propolis

b. Les bains de bouches :

b.1. In vitro :

Etude	Souches bactérienne testées	Type de propolis	Parameter étudié /Matériels et méthodes	Résultats
Etude comparative d'un bain de bouche à la propolis (10%) et un bain de bouche à l'hexidine avec 0.12% de Chlorhexidine [79]	<i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Candida albicans</i> .	Propolis des états unis (Pennsylvanie)	CMI/Méthode de diffusion sur gélose.	Bain de bouche à l'hexidine et chlorhexidine a une efficacité sur toutes les souches testées Bain de bouche à la propolis a une efficacité similaire au bain de bouche à l'hexidine et la chlorhexidine uniquement sur <i>S.mutans</i> [79]
Etude comparative du bain de bouche à l'extrait éthanolique de la propolis et un bain de bouche au gluconate de chlorhexidine 0.2% [79]	<i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. salivarius</i> ., <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>A. israelii</i> <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> . <i>Candida albicans</i>	Propolis de la Turquie ⁹¹	CMI , MBC/MFC	CMI : Inhibition de croissance de toutes les souches avec les deux Bain de bouche mais l'extrait éthanolique de la propolis était plus efficace sur les Gram + MBC/MFC : Bain de bouche à la chlorhexidine a une MBC plus faibles que l'extrait de la propolis contre les biofilms de <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>S. aureus</i> et <i>E. faecalis</i> , tandis que l'extrait de propolis donnait de meilleurs résultats contre <i>Lactobacillus</i> et <i>P. intermedia</i> . MFC/MBC égales sur <i>Streptococcus</i> , <i>P.gingivalis</i> , <i>A. israelii</i> et <i>C. albicans</i> pour les deux bains de bouche

Tableau 6: Des études in vitro des bains de bouche à base de propolis

b.2. In vivo :

Etude	L'état de santé buccale du patient	N° du patient	Type de propolis	Paramètre à étudier	Résultats
Rinçage avec un bain de bouche à la propolis (5%) /prélèvement du salive avant et après rinçage [80]	Non décrit	30	Propolis verte du Brésil ⁹²	CFU	Réduction significative (90% des cas) de nombre de <i>S.mutans</i> [80].
Rinçage avec un bain de bouche à la propolis matin et soir pendant 90 jours [81].	Patients avec au moins vingt dents naturelles avec : PI ≥1.5 IG ≥1.0	21	Propolis verte du Brésil	IG, IP	IG : réduction significative de 40% par rapport au premier jour PI : réduction de 24% par rapport au premier jour Conclusion de l'étude : efficacité dans la réduction de la plaque dentaire et de la gingivite [81].

Tableau 7: Des études in vivo des bains de bouche à base de propolis

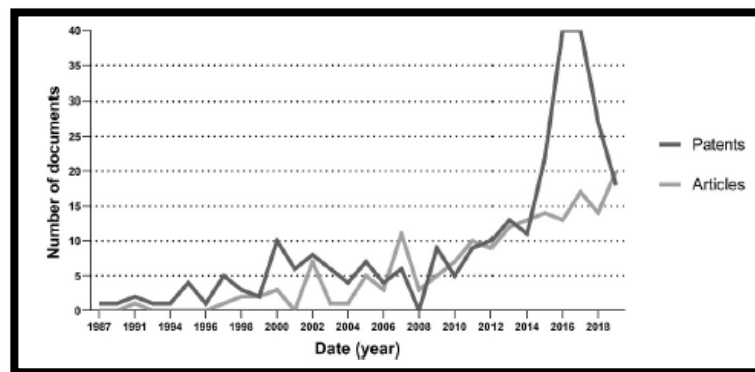


Figure 27: Nombre de brevet déposés et les études publiées sur l'utilisation de la propolis en dentisterie (1987-2019) [82].

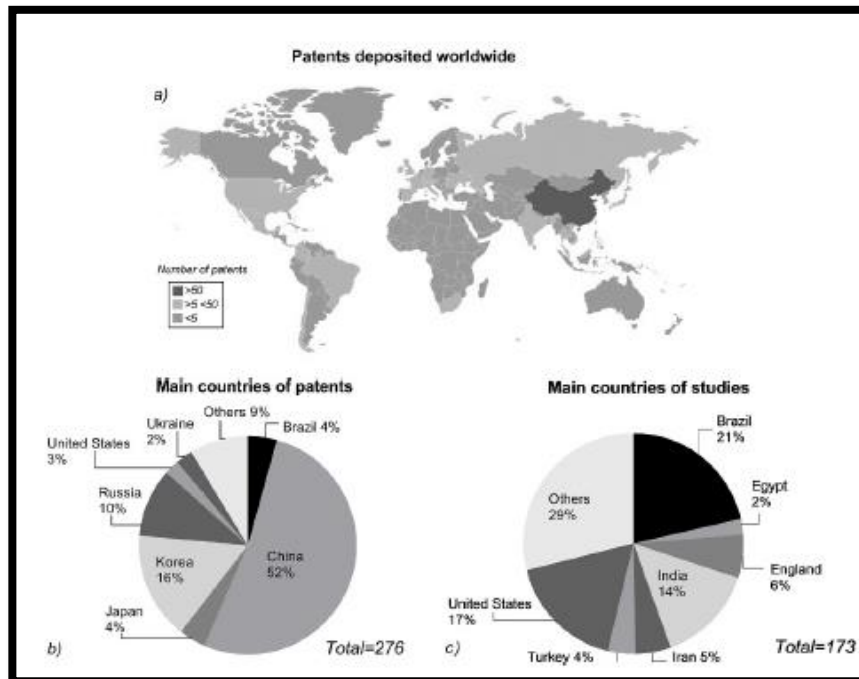


Figure 28: (a) les brevets des produits dentaires à base de propolis dans le monde entier;(b) (c) principaux pays qui ont des brevets et des études publiées sur l'action de la propolis en dentisterie (1987-2019)[82].

VIII. Conclusion du chapitre 4 :

Dans ce chapitre nous avons décrit quelques études sur la propolis et ses applications en dentisterie, sachant que l'hygiène buccodentaire occupe une place primordiale dans la vie quotidienne des individus et actuellement les chercheurs essaient d'appliquer ou remplacer les produits buccodentaires synthétiques par des substances d'origine végétale avec moins d'effets secondaires comme la propolis qui est un produit apicole très riche en composés bioactifs.

Chapitre 5 : Origine, composition chimique et propriétés du Plumbago europaea

La propolis et P. europaea illustrent deux stratégies distinctes de production de métabolites secondaires. La première, issue de la transformation par l'abeille de résines végétales est caractérisée par une prédominance de polyphénols et flavonoïdes, La seconde, directement synthétisée par la plante, est marquée par la présence de naphtoquinones (plumbagine, isoplumbagine, droserone) et de monoterpènes phénoliques, Cette divergence chimique n'est pas anecdotique : elle reflète des voies de biosynthèse différentes (voie des phénylpropanoïdes et des polycétides pour les flavonoïdes, voie de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique pour les naphtoquinones) et offre un éventail élargi de structures moléculaires potentiellement actives.

Le passage de la propolis au Plumbago s'inscrit dans une même logique d'exploration des substances naturelles bioactives, visant à identifier et comparer différentes sources de composés d'intérêt thérapeutique.

Leur étude conjointe permet de comparer deux chimiotypes différents issus d'un même écosystème et d'explorer leurs applications thérapeutiques

I. Introduction :

Les plantes médicinales sont connues sous le nom « Les mines d’or chimiques » elles contiennent des molécules qui ne peuvent pas être parfois synthétisées aux laboratoires [83]. La médecine traditionnelle a exploré la recherche de nouvelles cures et actuellement un nombre impressionnant des médicaments à base de plantes sont utilisés pour traiter de nombreuses maladies et infections. Le *Plumbago europaea* qui est également appelé le Dentelaire européen, il est largement utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies et dans ce chapitre nous avons cité quelques travaux qui ont permis de vous décrire l’origine, la composition chimiques et les propriétés pharmacologiques de cette plantes miraculeuse [83].

II. Origine :

Le *Plumbago* appartient à la famille des *Plumbaginaceae* qui compte environ 24 genres et 400 espèces et le genre *Plumbago* comprend 18 espèces qui poussent comme des arbustes ou des herbes vivaces : (*Plumbago amplexicaulis* Oliv, *Plumbago aphylla* Bojer ex Boiss, *Plumbago auriculata* Lam, *Plumbago ciliate* Engl, *Plumbago caerulea* Kunth, *Plumbago dawei* Rolfe, *Plumbago europaea* L, *Plumbago glandulicaulis* Wilmot-Dear, *Plumbago indica* L, *Plumbago madagascariensis*, *Plumbago montis-elgonis* Bullock, *Plumbago pearsonii*, *Plumbago pulchella* Boiss, *Plumbago stenophylla* , *Plumbago scandens* L, *Plumbago tristis* Aiton, *Plumbago wissii* Friedr. et *Plumbago zeylanica*) [84].

Plumbago europaea L. (*Plumbaginaceae*) est une plante médicinale originaire d’Afrique du nord, la région méditerranéenne, l’Europe et l’Asie (Sud-Ouest), c’est la seule espèce du genre *Plumbago* vivant à l’état sauvage en Iran [84]. En Kurdistan *Plumbago europaea* est appelé ‘*Rashky kalak* [85].



Figure 29: *Plumbago europaea* [86].

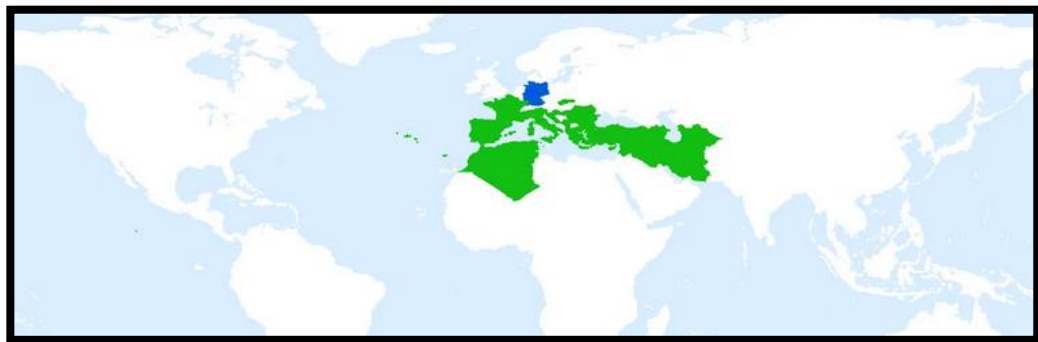


Figure 30: Carte de distribution du *Plumbago.europaea* au monde.

III. Composition chimique :

Plumbago europaea cette plante médicinale est une source de naphthoquinones de plumbagine, des terpénoïdes et des flavonoïdes [87]. Les naphthoquinones, les acides phénoliques et flavonoïdes sont des composés qui ont été isolés dans certaines espèces du genre *Plumbago*, le composé principal est la Plumbagine, qui a été isolée pour la première fois par Dulong D'Astafort dans *P. europaea*, en 1928 Maldinareitia et Gallego ont attribué sa structure naphthoquinone et la position de son groupe méthyle n'était pas résolu mais en 1936 Fieser et Dunn

l'ont synthétisé avec succès et l'ont trouvé pour être du 2-méthyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, dans l'huile essentielles des racines de *P.europaea*, les terpénoïdes ont été également isolés en tant que tri terpènes (stéroïls et saponines)[88]. Des parties aériennes de *P.europaea* (récoltée en Iran) ont été extraites en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, quelques composés ont été isolés et identifiés et les structures des composés isolés ont été identifiés par combinaison de différentes méthodes spectroscopiques telles que la RMN 1D 2D (1H-1H COSY, HMQC, HMBC), la spectroscopie UV, IR et la spectrométrie de masse MS, les structures de ces composés sont représentées dans la figure 38, ils appartiennent à des dérivés de naphthoquinone : (1) plumbagine, (2) isoplumbagine, (3) 5,8-dihydroxy-2-méthyl-[1,4] naphthoquinone, (4) droserone, (5) 7-méthyljuglone, (6) isozéylanone et (7) méthylène-3,3'-diplumbagine [88].

Une analyse GC/MS a été utilisée pour déterminer la composition chimique de l'extrait éthanolique du *Plumbago europae* (feuilles, tiges et racines), la plante a été récoltée en Palestine, l'analyse a permis d'identifier 59 composés dont la Plumbagine qui a été identifiée comme étant la molécule majeure suivie par le β -bisabolène, le nonanal, le limonène et le 1-octène-3-yl acétate [89], le pourcentage de Plumbagine dans l'extrait éthanolique des feuilles, les racines et les tiges ont été déterminés par HPLC, l'extrait des racines contenait la plus haute concentration de Plumbagine (1,65%), alors que l'extrait des tiges possédait le plus faible pourcentage (0,16 %)[89].

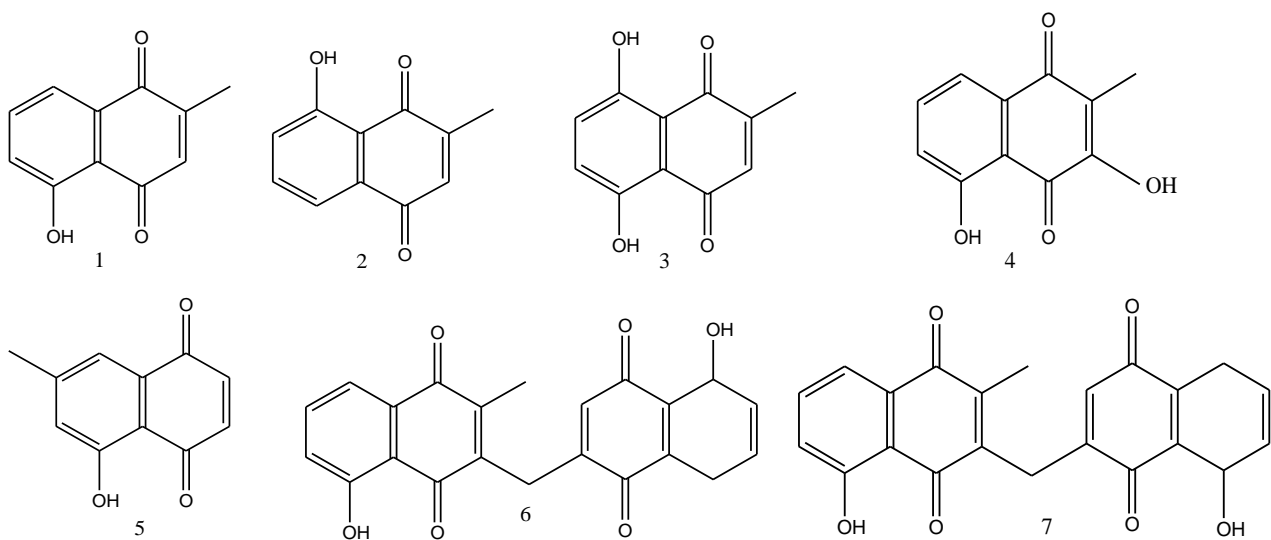


Figure 31: Structure des composés isolés à partir d'extrait des parties aérienne du *Plumbago.europaea*[88].



Figure 32: Chromatogramme des constituants majeurs d'extrait des racines du *P.europaea* [88].

Une hydro distillation des racines de *Plumbago europaea* a été effectuée pour extraire l'huile essentielle qui a été analysée par une combinaison de GC et de GC-MS, 15 composés ont été identifiés figure 50, les principaux constituants de l'huile des racines étaient la Plumbagine (69,1 %), l'acétate de 1-octène-3-yle (9 %) et limonène (5,7 %) [90].

Compounds	RI ^a	percentage
α -Pinene	940	t ^b
Sabinene	975	t
β -Pinene	979	t
Myrcene	991	t
Limonene	1030	5.7
Linalool	1098	1.6
Nonanal	1102	2.5
1-Octen-3-yl acetate	1108	9
Decanal	1202	1.2
Thymol	1288	1.5
Carvacrol	1297	0.7
β -Bourbonene	1382	0.8
Germacrene D	1480	1.1
β -Bisabolene	1507	2.1
Plumbagin	1600	69.1

Figure 33: Composition chimique de l'huile essentielle des racines du *P.europaea* [90].

Trois composés ont été isolés à partir d'un extrait éthanolé des feuilles et des racines du *Plumbago europaea* (récoltée en Sardaigne, Italie), ces composés ont été analysés par RMN et ESI-MS (figure) [89] :

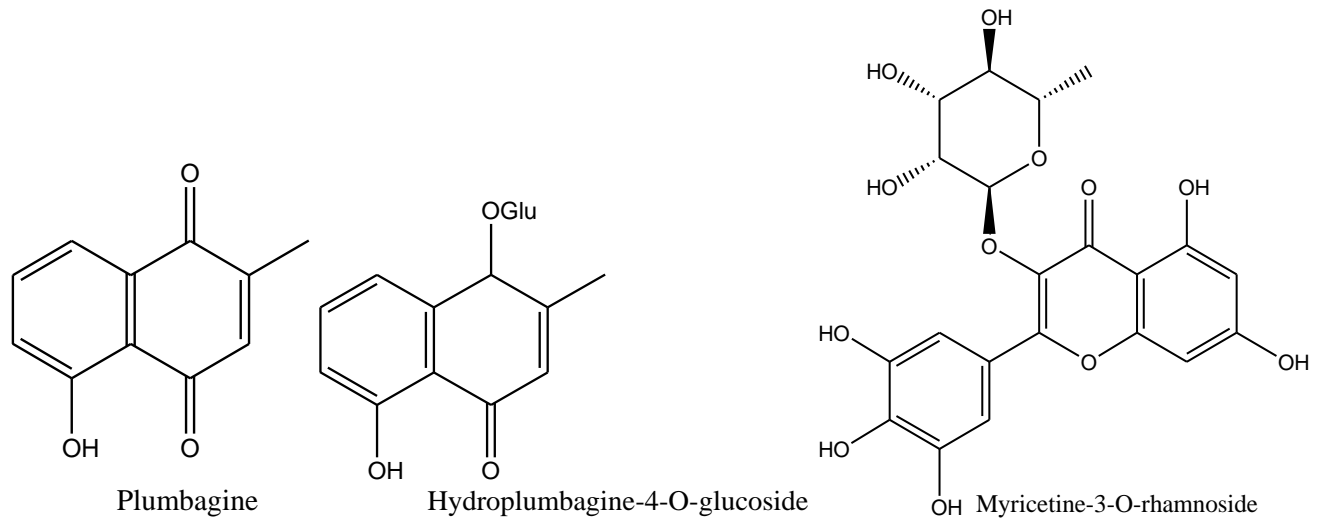


Figure 34: Structure des composés isolés des extraits des feuilles et des racines de *P.europaea* [89].

IV. Propriétés pharmacologiques :

Les racines de *P. europaea* sont connues de leur capacité de produire de grandes quantités d'une molécule qui s'appelle la Plumbagine (5-hydroxy, 2-méthyl, 1-4 naphthoquinone) comme naphthoquinone bioactif et c'est une source principale de ce composé et il a été démontré que ce composé possède un large spectre d'activités pharmacologiques : antimicrobiennes, anti fertilités, antiparasitaires, anticancéreuses, antipaludiques, Antipaludiques, insecticides, antiathérosclérotiques, antioxydants et cardiotoniques [91]. L'utilisation de la Plumbagine thérapeutiquement est très limitée parce que la plante pousse lentement et elle prend plusieurs années (5-6ans) pour produire des racines de qualité [91].

Il a été démontré que le Plumbagine réduit de manière significative les dommages à l'ADN induits par le catéchol et inhibe la peroxydation des lipides acrobate et NADPH-dépendante contre les cellules de lymphome de souris [91].

IV.1. Activité antibactérienne :

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est devenue un problème mondial, c'est pour cela plusieurs études s'efforcent d'améliorer de nouveaux agents antibactériens susceptibles de vaincre cette

résistance ¹ [92]. 11 espèces de plantes médicinales (*Plumbago europaea*, *Ephedra alata*, *Arum Palestinum*, *Centaurea dumulosa*, *Eruca Sativa*, *Teucrium polium*, *Bupleurum subovatum*, *Malva sherardiana*, *Geranium robertianum*, *Ononis speciosa* et *Plumbago auriculata*) ont été collectées de différentes régions de Palestine (les régions montagneuses), des extraits méthanoïques ont été préparés à partir des feuilles de ces plantes pour évaluer leur activité antibactérienne, parmi tous les extraits, l'extrait méthanoïque des feuilles de *P.europaea* a montré la meilleure activité contre le *S.aureus* avec un diamètre d'inhibition DI= 12mm, d'une autre part cet extrait n'a montré aucun effet vis-à-vis les bactéries à Gram-négative (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella sp*, et *Pseudomonas aeruginosa*) [93].

IV.2. Activité diurétique :

Les médicaments diurétiques sont utilisés pour augmenter la production d'urine afin d'ajuster la composition corporelle normale des fluides, donc il est nécessaire de soulager certaines maladies potentiellement mortelles telles que l'hypertension, la toxémie de la grossesse, l'insuffisance cardiaque congestive et le syndrome Néphrétique [94]. *P. europaea* a été récolté dans les montagnes de la région de Jenin, en Cisjordanie, Palestine, un extrait aqueux a été préparé à partir de la plante pour évaluer son activité diurétique, l'extrait aqueux de *P. europaea* a révélé un effet diurétique potentiel et les échantillons d'urine recueillis au cours des quatre heures ont été analysés pour déterminer la teneur en électrolytes (Na⁺ et K⁺) pour étudier l'effet de cet extrait sur la teneur en électrolytes de l'urine, les résultats obtenus ont montré que *P. europaea* a eu tendance à augmenter la perte de sodium Na⁺ et de potassium K⁺ par rapport au groupe témoin [88].

IV.3. Activité anti-obésité :

L'obésité est considéré actuellement comme un problème préoccupant qui peut toucher les adultes les adolescents ainsi que les enfants, l'obésité augmente le risque de plusieurs pathologies tels que les triglycérides élevés, diabète, maladies cardiaques, l'hypertension, tumeurs, troubles du sommeil, et les problèmes respiratoires [88]. Une étude a montré que les extraits organiques et aqueux des feuilles de *P. europaea* qui ont été recueillies dans des régions de Jéricho et de Tubas en Palestine, peuvent agir comme inhibiteurs de la lipase donc ils peuvent être utiles pour le développement des aliments fonctionnels contre l'obésité, le *Plumbago europaea* peut être également utilisé comme source de composés bioactifs d'origine naturels pour la conception de nouveaux médicaments contre l'obésité [87].

IV4. D'autres propriétés pharmacologiques :

P.europaea est largement utilisée dans les pays asiatiques, surtout en Chine pour traiter l'arthrite rhumatoïde, la dysménorrhée et le cancer, des travaux antérieurs ont montré que les racines du *P.europaea* ont une activité anti-tumorale et immunosuppressive, elles sont très utilisées dans la médecine traditionnelle Indienne [93]. Au Kurdistan le *P.europaea* est utilisé traditionnellement pour traiter l'infection de la peau et les verrues [85]. *Plumbago europaea* est également utilisé pour le traitement de l'œdème, des inflammations, de l'hépatite, de la lèpre, des troubles respiratoires, des maux de dents, des cloques et des callosités dans les médecines traditionnelles Palestiniennes, Jordaniennes, Italiennes et Turques [84].

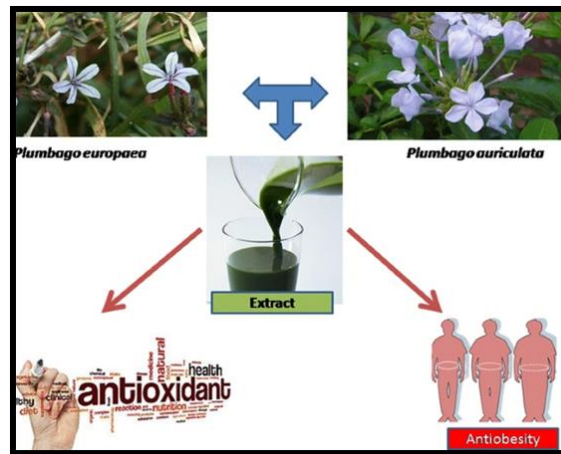


Figure 35: Un schéma récapitulatif de l'activité antioxydante et anti-obésité des extraits des feuilles du *P.europaea*[87].

V. *Plumbago europaea* : agent inhibiteur de la corrosion de l'aluminium :

L'adsorption des composés organiques à la surface métallique réduit la corrosion des métaux en formant une couche protectrice sur cette surface, d'un autre côté plusieurs études ont montré que les plantes sont utilisées aussi comme inhibiteurs de corrosion, des travaux ont été réalisés par Bataneih et al. sur l'extrait de *Plumbago europaea*, ce dernier a montré une efficacité d'inhibition de corrosion sur la surface d'aluminium métal dans une solution alcaline, l'efficacité d'inhibition a augmenté avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de *Plumbago europaea* jusqu'à atteindre un pourcentage de 96,8 % et son efficacité est dû à la synergie entre les composés qui forment une matrice complexe tels que la Plumbagine et l'isoshinanolone comme constituants majeurs [95].

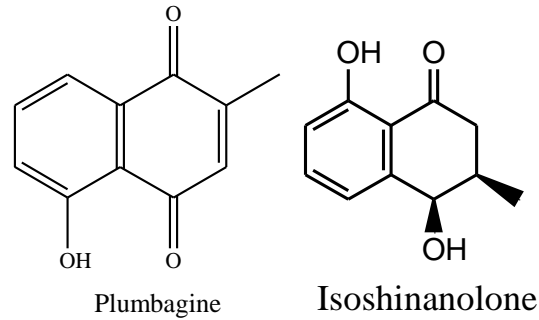


Figure 36: Structure de la Plumbagine et l'isoshinanolone [88].

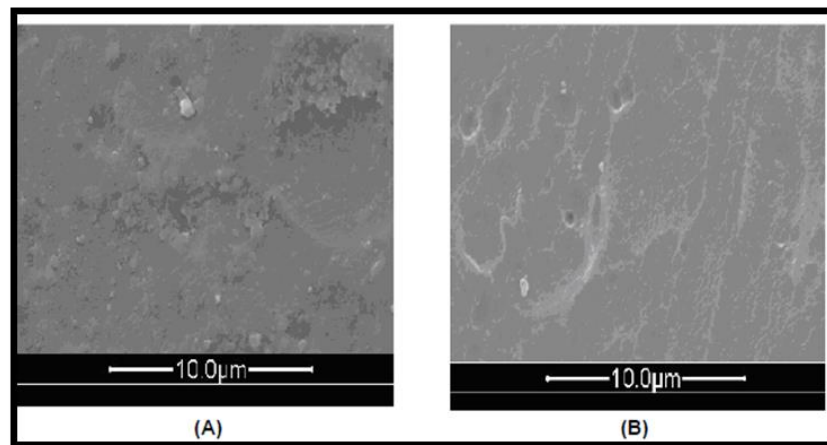


Figure 37: Micrographie électronique de balayage de surface en aluminium (A) : dans une solution de NaOH (0.1M) ; (B) : la surface d'aluminium dans une solution d'extrait de *P.europaea* [95].

Dans cette étude ils ont utilisé le microscope électronique pour étudier le changement de la surface d'aluminium dans une solution corrosive de NaOH (A) et en présence de l'extrait de *P.europae* et la solution alcaline, l'image (B) montre la couche protectrice de l'extrait végétal accumulée qui résiste à la solution corrosive de NaOH, dans l'image (A) on peut observer que la plaque d'aluminium a été infecté par la corrosion de la solution de NaOH [95].

VI. Conclusion du chapitre 5 :

Plumbago europaea est une plante médicinale, originaire d'Afrique du nord, la région méditerranéenne, d'Asie et d'Europe, ses racines sont connues de leur capacité de produire de grande quantité d'une molécule la Plumbagine comme naphthoquinone bioactif, cette plante possède des propriétés pharmacologiques (antibactérienne, anti obésité et diurétique) elle est connue dans plusieurs cultures au monde, ce qui prouve son utilisation dans la médecine traditionnelle Chinoise, Palestinienne, Indienne, Italienne, Kurde et Turques.

Travail effectué

Travail effectué

Au cours de notre travail, toutes les manipulations ont été réalisées dans le laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses *COSNA*, pour l'activité antibactérienne, elle a été réalisée au niveau de laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement *LAMAABE*, l'activité neuroprotective a été réalisée au niveau de centre de recherche de Constantine *CRSP*, l'activité immunostimulante et l'analyse HPLC ont été réalisées au niveau de laboratoire de recherche de Physiologie, Pathophysiologie, Biochimie de Nutrition *PPABIONUT* et les analyses IR et RMN ont été réalisées au niveau de laboratoire de recherche de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique *L.C.S.C.O* à Tlemcen, les analyse HPLC/MS ont été réalisé à Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay *ICMMO*, Université Paris-Saclay, France. L'analyse GC/MS a été effectué au niveau de laboratoire de Chimie des produits naturels, Université Pascal Paoli, Corse, France *UMR CNRS SPE*

I. Indications générales :

a. Chromatographie :

La chromatographie sur couche mince CCM a été réalisée sur des plaques recouvertes de gel de silice avec un support en aluminium (Merck60-F-254nm, SDS de 0.25mm), la révélation avec une lampe UV à 254-365nm et avec les révélateurs chimiques suivants : vanilline-H₂SO₄ et les vapeurs diode.

La chromatographie sur colonne a été réalisée sur une colonne en verre avec un diamètre...

La séparation des sous fraction a été faite par une plaque chromatographique avec un support en verre

b. Analyses spectrales :

RMN : Les spectres RMN-¹H ont été enregistrés sur un appareil « magritek » à la fréquence 300MHz

IR-FTIR : Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier

HPLC, HPLC/MS et GC/MS

c. Point de fusion :

La prise des températures de fusion a été réalisée par un banc *KOFLEK* qui est largement utilisé dans les laboratoires.

d. Analyse UV-Visible :

Les analyses UV ont été réalisées avec un spectrophotomètre *Thermo-scientific Hélios*.

Propolis :

Partie I. Caractérisation chimique (Analyse qualitative/quantitative et Analyse spectrale)

Partie II. Evaluation de l'activité biologique.

Partie III. Etude comparative de l'activité biologique des extraits de la propolis et le complexe propolis-cyclodextrine.

Partie IV. Application en médecine buccodentaire

Partie I. Caractérisation chimique :
Analyse qualitative/quantitative

Réactifs chimiques :

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans cette étude :

Ethanol(EtOH), Méthanol (MeOH), Dichlorométhane (DCM), Cyclohexane, Chlorure ferrique (FeCl₃), Ether de pétrole, Acétate d'éthyle, vanilline, Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium, acide gallique et rutine.

Appareillage :

L'appareillage utilisé pour la réalisation de ce travail : Spectrophotomètre UV-visible, Etuve, Balance, Evaporateur rotatif, colonne chromatographique, Lampe UV (254nm-336nm)

Cette partie se focalise sur les étapes suivantes :

- Préparation des extraits de la propolis.
- Screening phytochimique.
- Quantification des polyphénols et flavonoïdes de la propolis.

1-Matériels et méthodes :

I. Présentation de la matière première

Les échantillons utilisés pour cette étude sont récoltés dans cinq localités de la région de Tlemcen, produits par la race d'abeille *Apis mellifera intermissa*, la propolis récoltée est caractérisée par sa couleur brune et son odeur parfumée, les échantillons à analysés sont présentés ci-dessous :

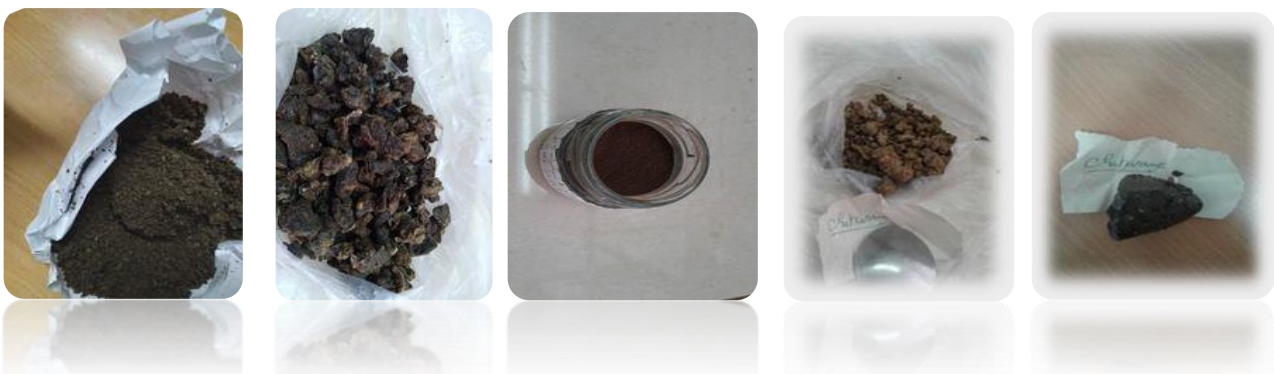


Figure 38: Les échantillons de la propolis récoltés pour cette étude.

Ces régions ont été choisies parce qu'elles sont bien connues pour l'apiculture et représentent des zones montagneuses (Benisnous, Tirney et Elouret) et planes (Chetouan et Chouli), différentes quant à leur végétation. Compte tenu des différents facteurs influençant la composition phytochimique de la propolis, les échantillons étudiés proviennent de la même race d'abeilles et ont été récoltés selon la même méthode. Les seules variables étaient les emplacements géographiques et le mois de récolte (propolis de Terny).

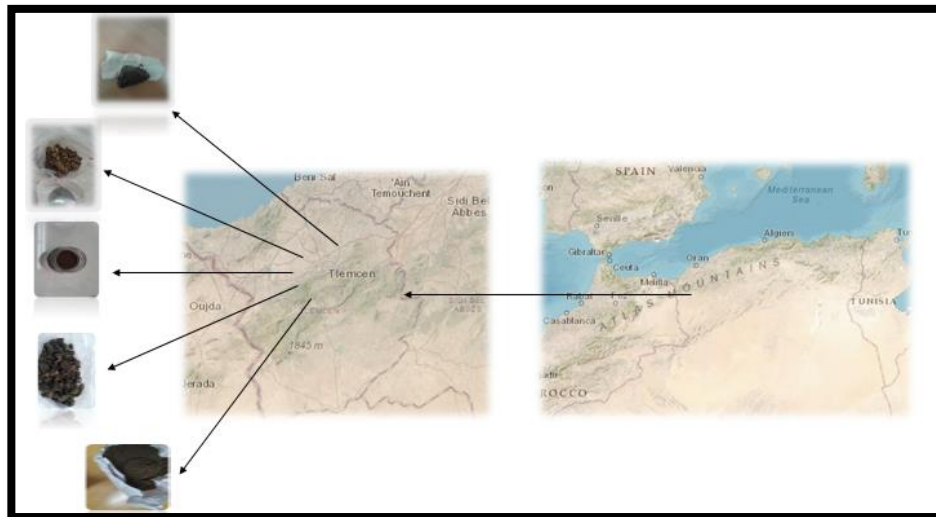


Figure 39: Les sites de récolte des échantillons de la propolis.

Les codes, l'origine des échantillons de propolis, le site, l'année et le mois de collecte, la race d'abeille sont présentés dans le tableau 9 :


Code d'échantillon	Site de collecte	Année et mois de la récolte	Race d'abeille
EPB	Benisnous (34° 41' 38" nord, 1° 31' 07" ouest)	Septembre, 2021	<i>Apis mellifera intermissa</i> (l'abeille noire) 
EPA	Chetouan (35° 02' 07" nord, 1° 14' 24" ouest)	Septembre, 2021	
EPI	Chouli (34° 52' 09" nord, 1° 07' 54" ouest)	Septembre, 2021	
EPE	Elourit (34° 53' 24" nord, 1° 19' 12" ouest)	Septembre, 2021	
EPT	Terny (34° 47' 45" nord, 1° 21' 29" ouest)	Janvier, 2022	

Tableau 8: Le site, l'année et le mois de récolte des échantillons et race d'abeille.

Détermination de la plage de fusion de la propolis brute de différentes régions :

La plage de fusion de la propolis brute a été déterminée, elle est représentée dans le tableau suivant :

Echantillons	Plage de fusion
EPB	90°C
EPA	90°C
EPI	87°C
EPE	85°C
EPT	108°C

Tableau 9: plage de fusion de la propolis brute récoltée.

Les caractéristiques organoleptiques des échantillons de la propolis :

La propolis est une matière collante et résineuse qui présente les caractères organoleptiques suivants :

Echantillons	Couleur	Odeur	Saveur
EPB	Marron foncé	Agréable	Amère
EPA		Agréable et douçâtre	
EPI		Agréable	
EPE		Agréable et douçâtre	
EPT		Pas d'odeur	

Tableau 10: Les caractéristiques organoleptiques des échantillons

Son odeur et sa couleur dépend de son origine, presque tous nos échantillons ont une odeur agréable (un mélange d'odeur de vanille et cannelle) et une couleur marron foncée.

II. Préparation des extraits de la propolis :

Pour les échantillons des régions Benisnous, Chetouan, Chouli, Elourit et Terny nous avons retiré les impuretés telles que les corps d'abeilles les tiges de bois des insectes...etc., ensuite nous avons broyé la propolis triée dans un mortier jusqu'à obtention d'une poudre.

Tous les échantillons ont été conservés à température ambiante et l'obscurité avant leur extraction.

L'extraction est une étape cruciale pour une valorisation des composés actifs d'un extrait et elle dépend de la méthode le type de solvant, la température et le temps d'extraction. Après une recherche bibliographique, les deux premiers choix du solvant sont portés sur le méthanol et l'éthanol, dans cette étude nous avons utilisé l'éthanol (96%).

II.1. Macération alcoolique simple à froid :

La macération à froid est la méthode la plus utilisée pour extraire les composés bioactifs de la propolis. 10g de la propolis ont été extraites par 130 ml de l'éthanol, dans un erlenmeyer emballé avec du papier aluminium. Au bout de sept jours le macérât a été filtré, après avoir congelé le macérât, on l'a filtré une fois de plus pour retenir la cire, puis on l'a évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir un extrait sec.

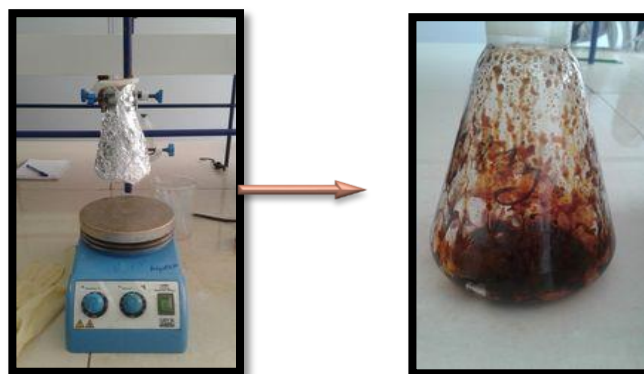


Figure 40: Macération à froid de la propolis.

II.2. Détermination du rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction est le rapport de la masse de l'extrait obtenu sec et la masse de la propolis avant l'extraction.

Le rendement d'extraction a été calculé comme suit :

$$\text{Rdt \%} = (m_f/m_i) \times 100$$

m_f : masse de l'extrait de la propolis sec en g.

m_i : masse de la propolis initiale en g.

Analyse qualitative (Screening phytochimique) des extraits de la propolis :

III.1. Tests phytochimique :

Les différents extraits éthanoliques de la propolis ont été soumis à un criblage phytochimique et les protocoles de caractérisation des groupes chimiques utilisés ont été déjà décrits dans la littérature.

III.1. Caractérisation des alcaloïdes :

1 ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux, l'un est traité par 0.5 ml de réactif de Mayer et l'autre par 0.5 ml de réactif de Wagner, l'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

III.2. Caractérisation des Flavonoïdes :

On ajoute à 1 ml d'extrait de propolis à tester, 1 ml d'acide chlorhydrique et 1 à 2 coupes de magnésium, l'apparition d'une couleur rouge-orangée indique la présence des flavonoïdes.

III.4. Caractérisation des terpénoïdes :

5 ml d'extrait de propolis à tester est ajouté à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré, l'apparition d'une couleur marron à l'interphase et la formation de deux phases indique la présence des terpénoïdes.

III.5. Caractérisation des saponines (test de mousse) :

Dans un tube à essai, on introduit 10 ml d'extrait à tester en agitant pendant quelques secondes puis on le laisse reposer pendant 15 min, l'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

III.2. Criblage phytochimique à l'aide de la chromatographie analytique sur couche mince CCM :

Nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince CCM comme technique analytique pour identifier les différentes classes de composés présentes dans l'extrait de propolis, 30 mg d'extrait de Propolis ont été dissous dans 1 ml d'éthanol et déposés sur une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,05 mm d'épaisseur, les plaques ont été développées dans une phase mobile composée respectivement d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole (3/7), après développement, la plaque a été séchée et visualisée à 254 nm et 366 nm, puis a été pulvérisée avec des

réactifs chimiques tels que l'iode et l'acide vanilline-acide sulfurique pour la détection des classes de composés [96].

Préparation d'une solution de vanilline-acide sulfurique :

Une quantité de 1g de la vanilline a été dissoute dans 100ml d'éthanol à 95°C sous agitation, ensuite nous avons placé le bécher dans un bain de glace pour ajouter 2 ml de l'acide sulfurique concentré goutte à goutte. La plaque CCM a été immergée dans la solution de vanilline ensuite séché, nous avons remarqué l'apparition des taches de couleur bleue-noire, violette et rose.

IV. Analyse quantitative (dosage par spectrophotométrie) des extraits de la propolis :

IV.1. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu :

En présence des polyphénols, le mélange d'acide phosphomolibdique et phosphotungstique est réduit en oxyde de molybdène et tungstène de couleur bleue [97]. La quantité totale en polyphénols a été déterminé par la méthode de **Skergot** et *col* [98].

Procédure :

200µl d'extrait ont été mélangés avec 1ml du réactif Folin-Ciocalteu, après 8 min ,0.8ml de carbonate de sodium à une concentration de 75g/l ont été ajoutés, le mélange a été incubé à 50°C pendant 5 min, après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectromètre à 760 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La quantité en polyphénols est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec de propolis (mg EGA/g), cette quantité est déterminée graphiquement à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($Y = ax + b$) de l'acide gallique à différentes concentrations, dans les mêmes conditions que les échantillons et qui est utilisé comme standard. Avec Y est l'absorbance et x est la quantité des polyphénols.

IV.2. Dosage des flavonoïdes totaux par la méthode d'AlCl₃ :

Les flavonoïdes peuvent former des complexes par chélation avec les métaux lourds comme le fer et l'aluminium, lors du dosage des flavonoïdes un complexe jaunâtre se forme entre la molécule et l'ion d'aluminium, l'aluminium (Al) perd des électrons pour se réunir avec deux atomes d'oxygène de la molécule [99]. Le protocole est cité par Bahri-Sahloul [100].

Procédure :

1 ml de AlCl₃ à 2 % a été ajouté à 1 ml de l'extrait ensuite le mélange a été bien homogénéisé suivi d'une incubation à température ambiante à l'abri de la lumière durant 10 min, l'absorbance est mesuré à 450 nm.

La quantité en flavonoïdes est exprimée mg équivalent de Rutine par g d'extrait de propolis (mg ER/g), cette quantité est déterminée graphiquement par une courbe d'étalonnage de la Rutine ($Y=ax+b$) à différentes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. Avec Y est l'absorbance et x est la quantité des flavonoïdes en mg/g.

2. Résultats et discussion :

I. Rendements d'extraction :

Le tableau 13 montre les résultats du rendement d'extraction éthanoïque des échantillons de la propolis :

Echantillons	Rendement %	Aspect de l'extrait
EPB	45,00	Visqueux
EPA	42,00	Visqueux
EPI	68,00	Visqueux
EPE	43,00	Visqueux
EPT	10,00	Visqueux

Tableau 11: Rendement d'extraction et aspect des extraits obtenus.

Les rendements d'extraction sont compris entre 10% et 68%, le rendement le plus élevé a été obtenu par l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI (68%), l'extrait de la région de Terny EPT a marqué le plus faible rendement (10%). Plusieurs études ont rapporté des rendements d'extraction variables de la propolis dans

différentes régions en Algérie, en 2021 Kouadri et *al* ont rapporté des rendements d'extraction éthanoïques de la propolis algérienne de différente wilaya : Tippaza, Tebessa, Eloued et Constantine allant de 14 à 37 % [101]. Une autre étude de Belfar et *al* sur la propolis algérienne des régions de Mostaganem, Bejaia, Boumerdas et Gherdaia a montré que leur taux d'extraction variait entre 15,57% et 41,10% [102]. Une étude sur la propolis du Brésil a confirmé que le taux d'extraction varie d'un échantillon à l'autre de la même région, cette étude a montré que les taux d'extraction éthanoïques de la propolis du Brésil dans la même région variaient de 40,07 % à 73,9 % [103].

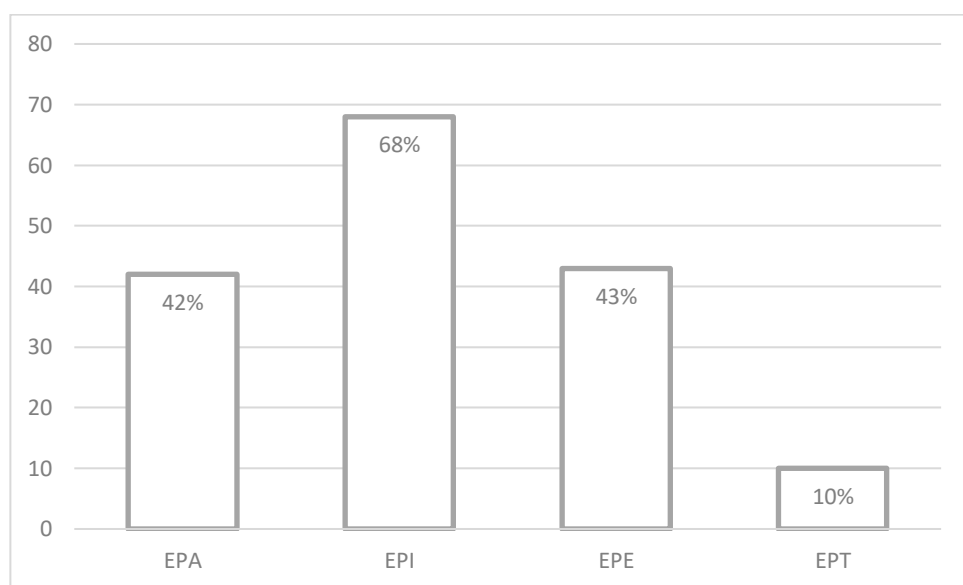


Figure 41: Diagramme représentant le taux de rendement des extraits de la propolis.

II. Résultats du screening phytochimique des extraits de la propolis :

a. Tests photochimiques :

Les résultats du criblage phytochimique sont présentés dans le tableau suivant :

Echantillons	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Terpnoïdes	Saponines
EPB	+	+	+	+
EPA	+	+	+	+
EPI	+	+	+	+
EPE	+	+	+	+
EPT	+	+	+	+

Tableau 12: Résultats des tests phytochimiques.

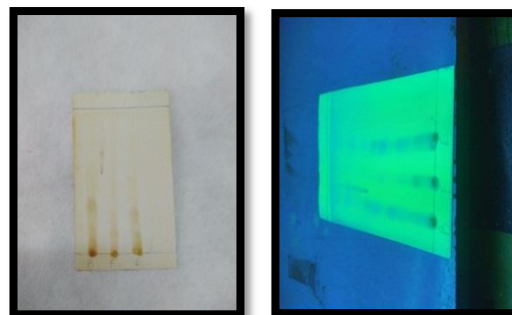
L'apparition d'un trouble ou changement de couleur : (+)

Absence totale du groupe chimique : (-)

Le criblage phytochimique est un ensemble de tests simples pour les substances naturelles, ce criblage détecte la présence de produits appartenant à différentes classes de composés chimiques, les résultats obtenus ont mis en évidence la présence des Alcaloïdes, des flavonoïdes, des Terpnoïdes et des Saponines dans tous les extraits de la propolis.

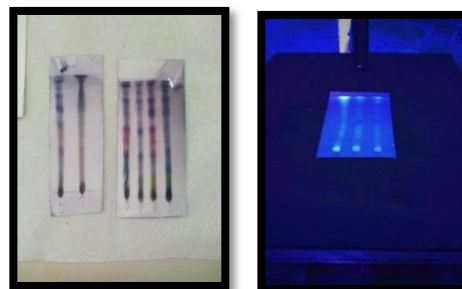
b. Screening phytochimique par chromatographie en couche mince analytique CCM :

Les résultats du criblage phytochimique par CCM sont regroupés dans le tableau :



A : Vapeur d'Iode

B : UV-254nm



C: Vanilline-H₂SO₄

D: UV-366nm

Figure 42: Chromatogramme des extraits de la propolis.

Famille de composés	Couleur détectée	Echantillons					Révélation physique et chimique
		EPB	EPA	EPI	EPE	EPT	
Flavonoïdes	Rose	+	+	+	+	+	Vanilline-Acide sulfurique
Terpenoïdes	Violette	+	+	+	+	+	Vanilline-Acide sulfurique
Coumarines	Bleue	+	+	+	+	+	UV-366nm
Saponines	Noire	+	+	+	+	+	Vanilline-Acide sulfurique
Phénols	Rouge	+	+	+	+	+	Vanilline-Acide sulfurique
Huiles essentielles	Maron/ Bleue-noire	+	+	+	+	+	Lumière visible/UV-254nm
Composés insaturés et aromatiques	Jaune	+	+	+	+	+	Vapeur d'Iode

Tableau 13: Les résultats du screening phytochimique par CCM.

Lorsque la plaque a été pulvérisée avec de la vanilline-Acide sulfurique, des terpenoïdes (violet), des phénols (rouge) et des saponines (Noir) ont tous été détectés dans tous les échantillons de propolis. La plaque CCM a été colorée avec de la vapeur d'iode, les composés insaturés et aromatiques étaient présents dans tous les extraits. Lorsque la plaque CCM a été visualisée sous une vague de lumière UV (sous 366nm), des coumarines étaient présentes dans tous les extraits de propolis. La CCM est une technique pour identifier et séparer les substances dans un mélange et détecter les différentes classes de composés chimiques, elle est largement utilisée en raison de sa simplicité, son faible coût et son court temps de développement.

Les résultats du criblage phytochimique par CCM de la propolis provenant de différentes régions de Tlemcen ont révélé la présence de composés chimiques comme les flavonoïdes, les terpenoïdes, les coumarines, les saponines, l'huile essentielle, les composés insaturés et aromatiques. Les résultats de notre étude ont coïncidé avec les études rapportées par Badiazaman et al [75] Ibrahim et al [66], leurs résultats de criblage phytochimique

utilisant la CCM, ont montré la présence de flavonoïdes, terpénoïdes, coumarines, huiles essentielles, composés aromatiques et insaturés. Les résultats du screening phytochimique par les deux méthodes (tests et CCM analytique) sont en corrélation et prouvent que les extraits de la propolis de différentes zones de la wilaya de Tlemcen sont riches en composés bioactifs.

III. Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes :

Nous avons appliqué la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu et $AlCl_3$ pour déterminer la teneur totale en polyphénols et en flavonoïdes, respectivement, le tableau 14 montre la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes des extraits éthanoliques de propolis EEP.

Echantillons	TFT mg EQ/g	TPT mg EAG/g
EPB	93.00±0.41	145.76±0.14
EPA	91.70±0.36	145.00±0.14
EPI	121.93±0.23	158.00±0.10
EPE	121.16±0.18	153.00±0.37
EPT	19.19±1.06	31.00±1.74

Tableau 14: Taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits

La teneur totale en polyphénols est exprimée en milligrammes d'acide gallique équivalent par gramme d'extrait (mg GAE/g) et la teneur totale en flavonoïdes sont exprimées en milligrammes d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg QE/g).

La teneur totale en polyphénols (TPC) a été mesurée par la méthode de Folin-Ciocalteu et l'acide gallique a été utilisé pour calculer le taux des polyphénols à partir de courbe d'étalonnage ($y=0,091x+0,086$, $R^2=0,9961$).

Concentration (ug/ml)	20	13,33	10	6,67	4	2	1
Absorbance	1,918	1,295	1	0,65	0,43	0,345	0,15

Tableau 15: L'absorbance de l'acide gallique à différentes concentrations.

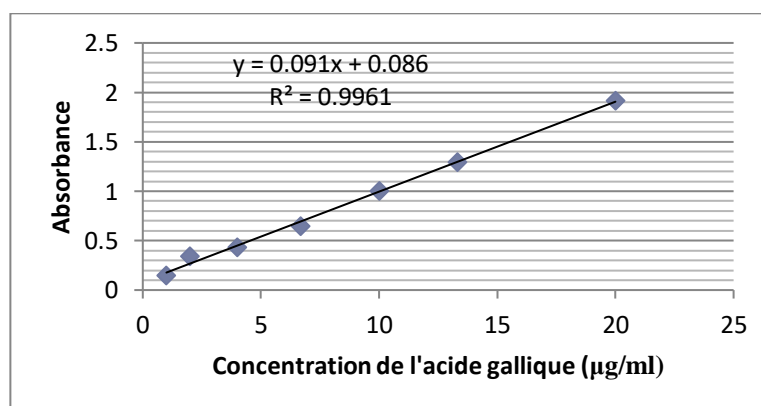


Figure 43: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La teneur totale en flavonoïdes (TFC) a été déterminée à l'aide de la méthode du chlorure d'aluminium, les résultats ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage ($y=0,0265x+0,0325$, $R^2=0,9905$).

Concentration (ug/ml)	100	50	20	10	5	2
Absorbance	2,6	1,538	0,598	0,316	0,128	0,006

Tableau 16: L'absorbance de la Quercétine à différentes concentrations

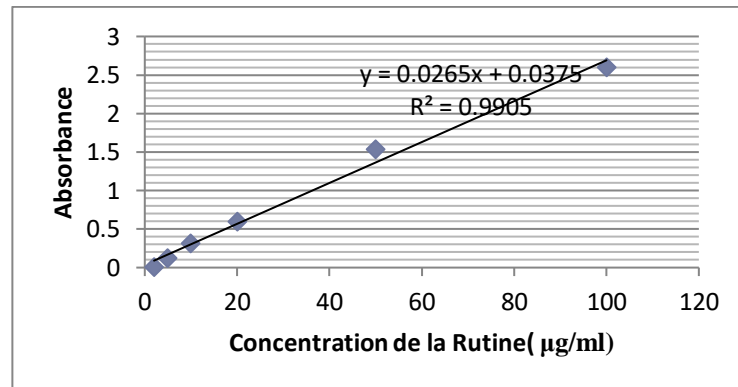


Figure 44: La courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Selon le tableau 14, les quantités de flavonoïdes totaux et de polyphénols ont varié de 31,00 à 121,93 mg EQ/g et de 19,19 à 158,00 mg EAG/g, respectivement. La propolis de la région de Chouli EPI et d'Elourit EPE ont montré une teneur élevée en composés phénoliques avec 158 et 153 mg /g respectivement, tandis que la propolis de la région de Terny EPT a présenté la plus faible teneur en composés phénoliques avec 31,00 mg EAG/g, la plus faible teneur en flavonoïdes a été observée dans la propolis de la région de Terny EPT 19,19 EQ/g et la plus élevée pour la propolis de la région de Chouli, EPI 121,93 mg QE/g. Plusieurs études ont été menées pour la quantification des polyphénols et flavonoïdes dans la propolis dans plusieurs régions du monde, ces études ont montré une plus grande variabilité dans les niveaux de polyphénols et de flavonoïdes dans différentes régions, les investigations qui ont été faites sur la détermination des teneurs en polyphénols et flavonoïdes sont nombreuses et les résultats sont différents d'une étude à l'autre.

La teneur totale en polyphénol de la propolis Algérienne des régions : Seradi, Chetaibi, Berrahel et Elbouni (Annaba) se situait entre 100,90 et 257,40 mg GAE/g [104], Jobir et al ont rapporté des niveaux phénoliques de

propolis éthiopienne de 63 à 82 mg GAE/g [105], Béji-Srairi et *al* ont trouvé un taux de polyphénol de la propolis tunisienne variant entre 35 et 93,16 mg GAE/g [106] et la propolis Iranienne se situaient entre 31 et 187 mg GAE/g [107].

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes, la propolis algérienne de : Seradi, Chetaibi, Berrahel et Elbouni (Annaba) a montré un taux de flavonoïdes variant entre 58,99 et 91,44 mg QE/g [104], La propolis d'Éthiopie contenait des taux de flavonoïdes de 17,26 à 24 mg QE/g [105] et la propolis d'Iran contenait un taux de flavonoïdes variait de 12 à 78 mg QE/g [107].

Cependant, à partir des résultats de la littérature et de notre étude actuelle, nous avons constaté que le contenu en polyphénols et flavonoïdes diffère d'un échantillon à l'autre selon nombreux facteurs : zones géographiques, altitude, saison de récolte, la végétation et plantes régionales préférées visitées par les abeilles [108].

Le faible taux de polyphénols et flavonoïdes de l'extrait de propolis du Terny est peut-être dû à la période de récolte (en mois de Janvier) c'est la période d'hivernation, les abeilles vivent lentement c'est-à-dire que les abeilles volent rarement en dehors de la ruche en raison du froid et de la rareté des aliments (plantes et fleurs). Si on compare les résultats des quatre régions en éliminant la région de Terny, on peut déduire que les extraits de la propolis de la région de Chouli et l'Elourit ont enregistré des valeurs importantes en taux de polyphénols et flavonoïdes en raison de la végétation diversifiée par rapport aux autres régions.

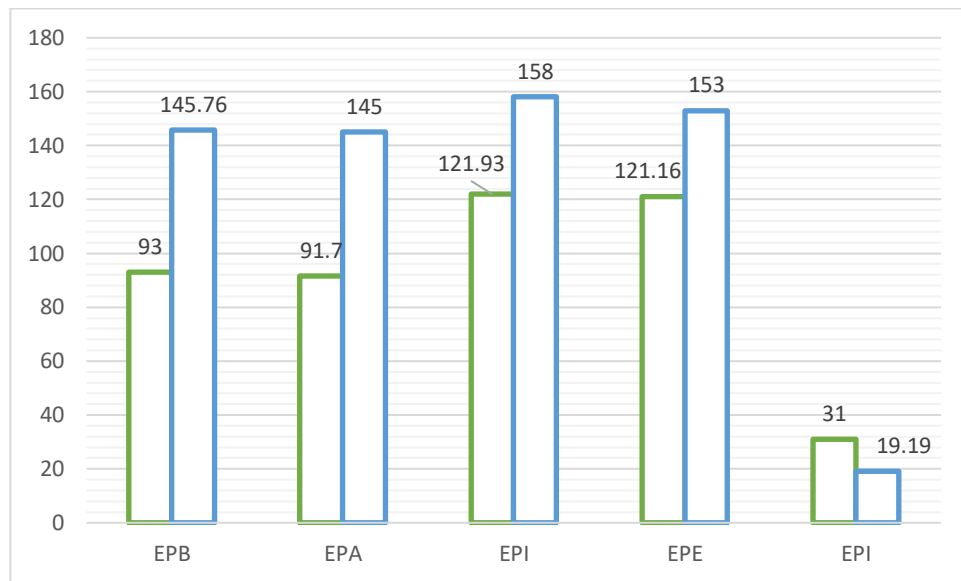


Figure 45: Diagramme représentant le taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits de la propolis.

Partie I. Caractérisation chimique

Analyse spectrale

Appareillage : HPLC, HPLC/MS, FTIR, RMN, bank *Koffler*

Réactifs : Acétate d'éthyle, ether de pétrole, l'acide gallique, l'acide nicotinique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine, l'acide gibbérélique, la riboflavine, la vanilline, l'acide férulique, -Acide p-coumarique, acide salicylique, Quercétine, acide trans-cinnamique, l'acide cinnamique, kaempferol, l'acide tannique, la Chrysin.

Cette partie se focalise sur :

- L'analyse HPLC, HPLC/MS des extraits de la propolis.
- Séparation des composés des extraits de propolis par colonne chromatographique.
- Analyse RMN/IR, détermination de la température de fusion et le rapport frontal des composés isolés.

1. Matériels et méthodes :

I. Analyse HPLC :

L'identification des composés des différents extraits de la propolis a été déterminée à l'aide d'une chromatographie liquide haute performance (système HPLC PerkinElmer) en phase inverse équipée d'une colonne C18 (longueur 4,6 mm 150 mm, granulométrie 5 µm, colonne PerkinElmer) et détecteur UV à 254 nm

(Logiciel Chromira CDS). 20 µL de chaque extrait a été injectée dans la colonne HPLC, maintenue à 40 °C, en utilisant deux phases mobiles différentes : le solvant A (3 % (v/v) acide acétique dans l'eau) et le solvant B(méthanol), avec un débit de 1 mL/min [109][110], l'identification des composés a été déterminée en comparant les temps de rétention avec ceux de référence, y compris l'acide gallique, l'acide nicotinique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine, l'acide gibbérannique, la riboflavine, la vanilline, l'acide férulique, -Acide p-coumarique, acide salicylique, Quercétine, acide trans-cinnamique, acide cinnamique, kaempferol, acide tannique, Chrysin.

Standards	Temps de rétention(min)	Standards	Temps de rétention (min)
Acide Gallique	2.4	Acidep-coumarique	12
Acide Nicotinique	2.8	Acide Salicylique	12.6
Catechine	5.5	Quercetine	14.3
AcideChlorogénique	6.8	Trans-Acide cinnamique	14.6
Epicatechine	9.4	Cis-Acide Cinnamique	14.8
Acide Gibberannique	9.5	Kaempferol	15.3
Riboflavine	9.7	Acide Tannique	16.5
Vanilline	10.2	Chrysin	20
Acide Ferulique	11.5		

Tableau 17: Standards utilisés avec leur temps de rétention dans l'HPLC.

II. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse HPLC/MS :

La chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS), cette technique chromatographique instrumentale a été utilisée pour analyser les extraits de la propolis, elle est constituée d'unAppareil de chromatographie liquide HPLC qui permet la séparation des composés et un spectromètre de masse qui permet l'identification de ces composés séparés. L'extrait éthanoïque de propolis a été dissous dans le méthanol à une concentration de 1mg/ml puis 100µl de la solution mère ont été dilués dans 1 ml de

méthanol, les composés ont été séparés par une colonne de phase (Interchim ; Uptisphere strategy C18-2 100A ; 3.0x150mm ; 3µm, le système de phase mobile était composé du solvant B (méthanol) et du solvant C (eau). L'élution a été effectuée en commençant par 35 % B et 65 % pendant 1 min et en augmentant jusqu'à 60 % B et 40 % C à 22 min, 45 % B à 30 min, 80 % B et 20 % C à 35 min, 95 % B et 5 % C à 44 min afin d'équilibrer colonne. Le solvant a été évaporé par collision avec de l'hélium gazeux. Les composés ont été identifiés en comparant leur temps de rétention, leur formule moléculaire et leurs spectres de masse avec ceux des bases de données.

III. Chromatographie sur colonne :

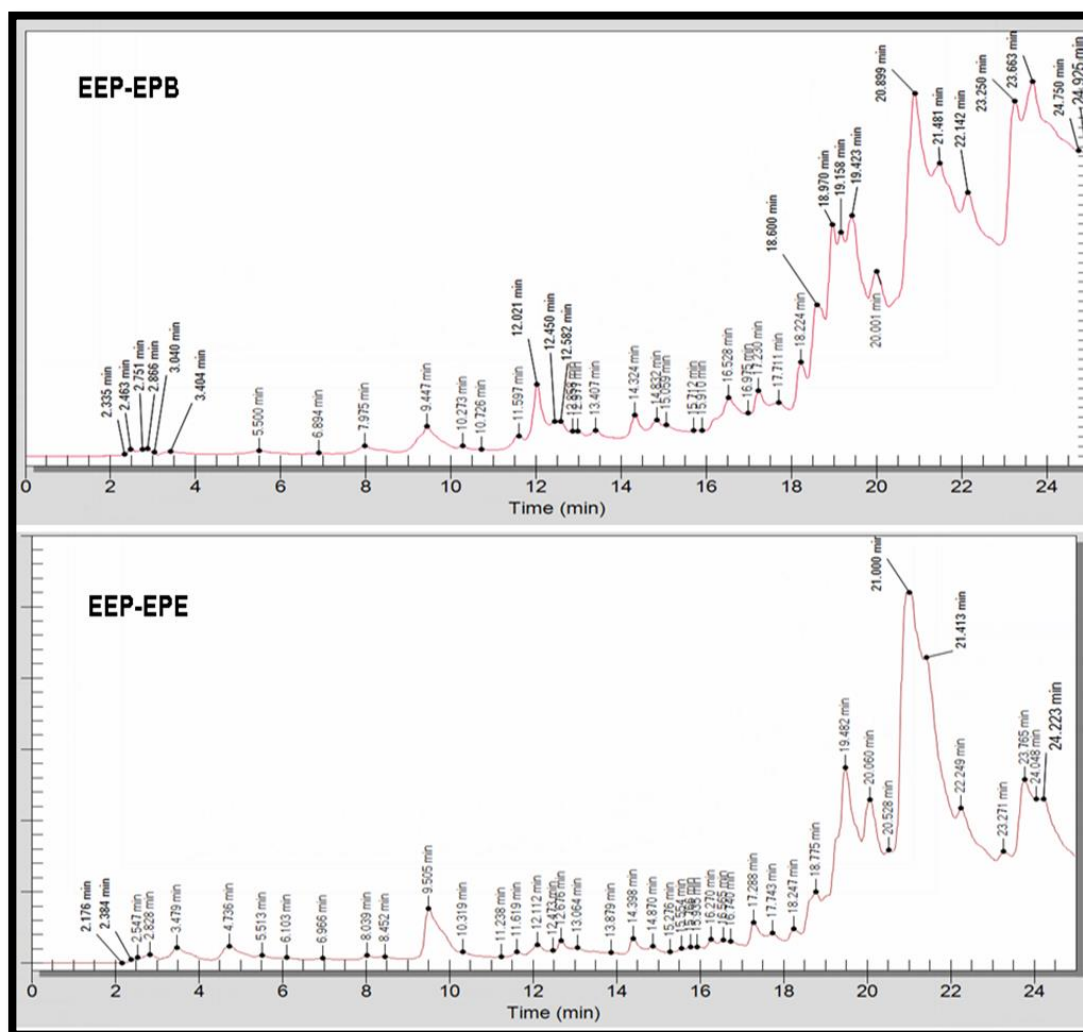
La chromatographie sur colonne est une technique utilisée pour la séparation des composés d'un mélange, utilisée en chimie pour purifier un produit après une synthèse ou isoler des composés d'une substance naturelle après une extraction. Le principe physique de la chromatographie sur colonne est le même que la séparation par Chromatographie sur couche mince CCM, la séparation des composés repose la différence d'affinité des composés à l'égard de deux phases, la phase stationnaire (silice) et la phase mobile (éluant). Le choix de l'éluant est primordial, avant d'envisager une séparation sur colonne il faut commencer par des chromatographies sur couche mince préparatoires. La séparation chromatographique par CCM nous permet de trouver le bon système d'élution comme une première étape pour passer à la chromatographie sur colonne pour séparer les composés de nos échantillons. À fin de trouver le bon éluant nous avons essayé plusieurs solvants de différentes polarités. L'analyse CCM des extraits alcoolique de la propolis qui ont été utilisés dans notre étude a été réalisée sur gel de silice (phase stationnaire) avec le système d'éluant : l'éther de pétrole/acétate d'éthyle en phase mobile avec une proportion de (7 :3), alors ce système d'éluant nous a permis la bonne séparation et qui a montré une richesse considérable en constituants.

2. Résultats et discussion :

I. Identification des composés des extraits de propolis par HPLC (profil chromatographique) :

L'identification des composés par HPLC a été effectuée en comparant les temps de rétention avec des étalons et les chromatogrammes HPLC obtenus des extraits propolis éthanoïques étudiés sont présentés dans la figure 53. La comparaison des temps de rétention des étalons avec ceux enregistrés dans les chromatogrammes des extraits de la propolis a permis d'identifier les composés suivants : l'extrait de propolis EPB a montré la présence de : l'acide gallique (2,4 min), l'acide nicotinique (2,8 min), catéchine (5,5 min), l'acide chlorogénique (6,8 min), épicatechine (9,4 min), vanilline (10,2 min), l'acide férulique (11,5 min),

acide p-coumarique (12 min), quercétine (14,3 min), l'acide cinnamique (14,8 min), l'acide tannique (16,5 min) et chrysine (20 min). Dans l'extrait EPE, on a identifié de l'acide nicotinique (2,8 min), de la catéchine (5,5 min), de l'acide gibbéréllique (9,5 min), de la rutine (11,6 min), de l'acide salicylique (12,6 min), de la quercétine (14,3) et de la chrysine (20 min). Pour l'extrait EPA, on a détecté la présence de l'acide gallique (2,4 min), du kaempferol (15,3. min) et de la chrysine (20 min). L'extrait EPI a été caractérisé par la présence de l'acide gallique (2,4 min), de la riboflavine (9,7 min), de l'acide trans-cinnamique (14,6 min) de l'acide tannique (16,5 min) et la chrysine (20 min).



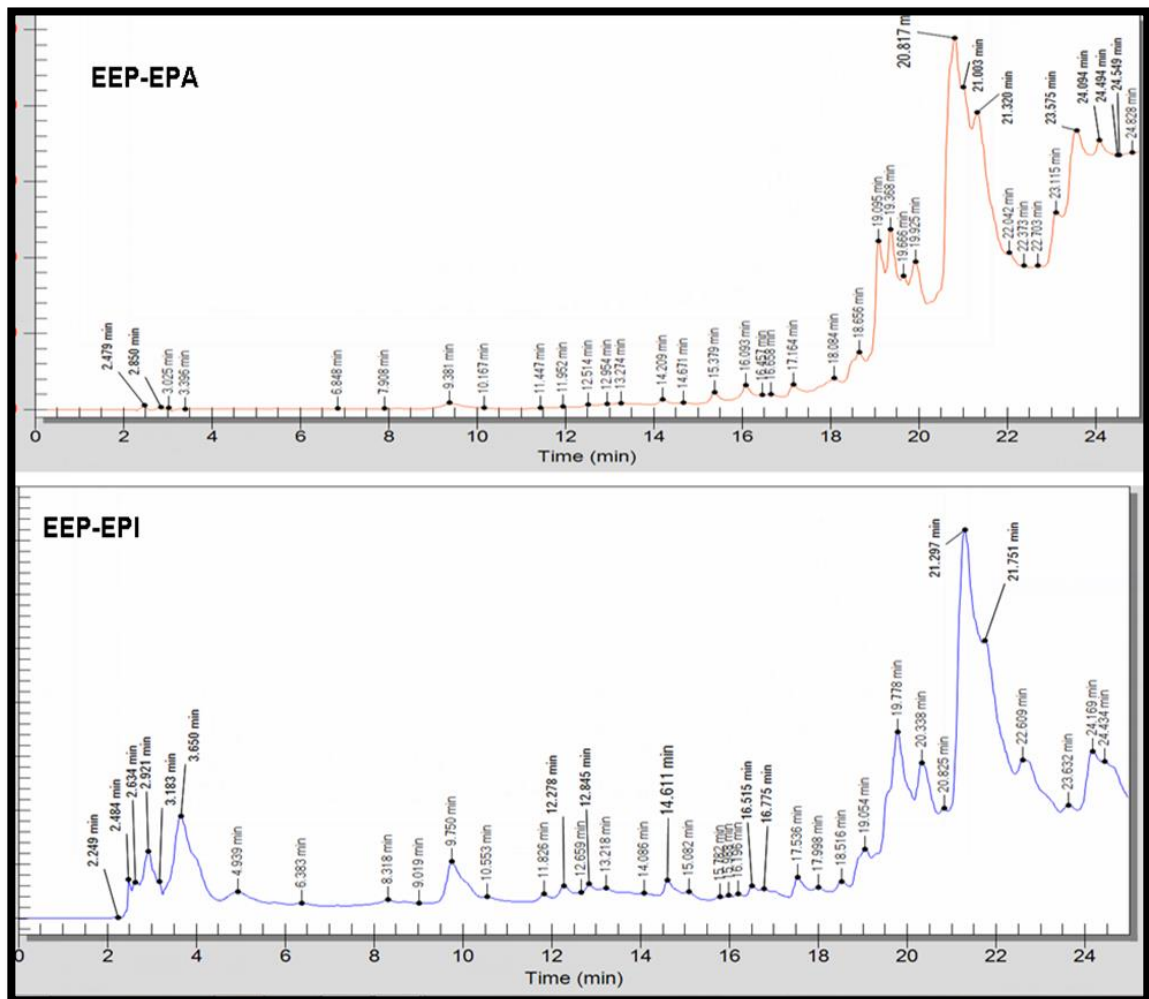
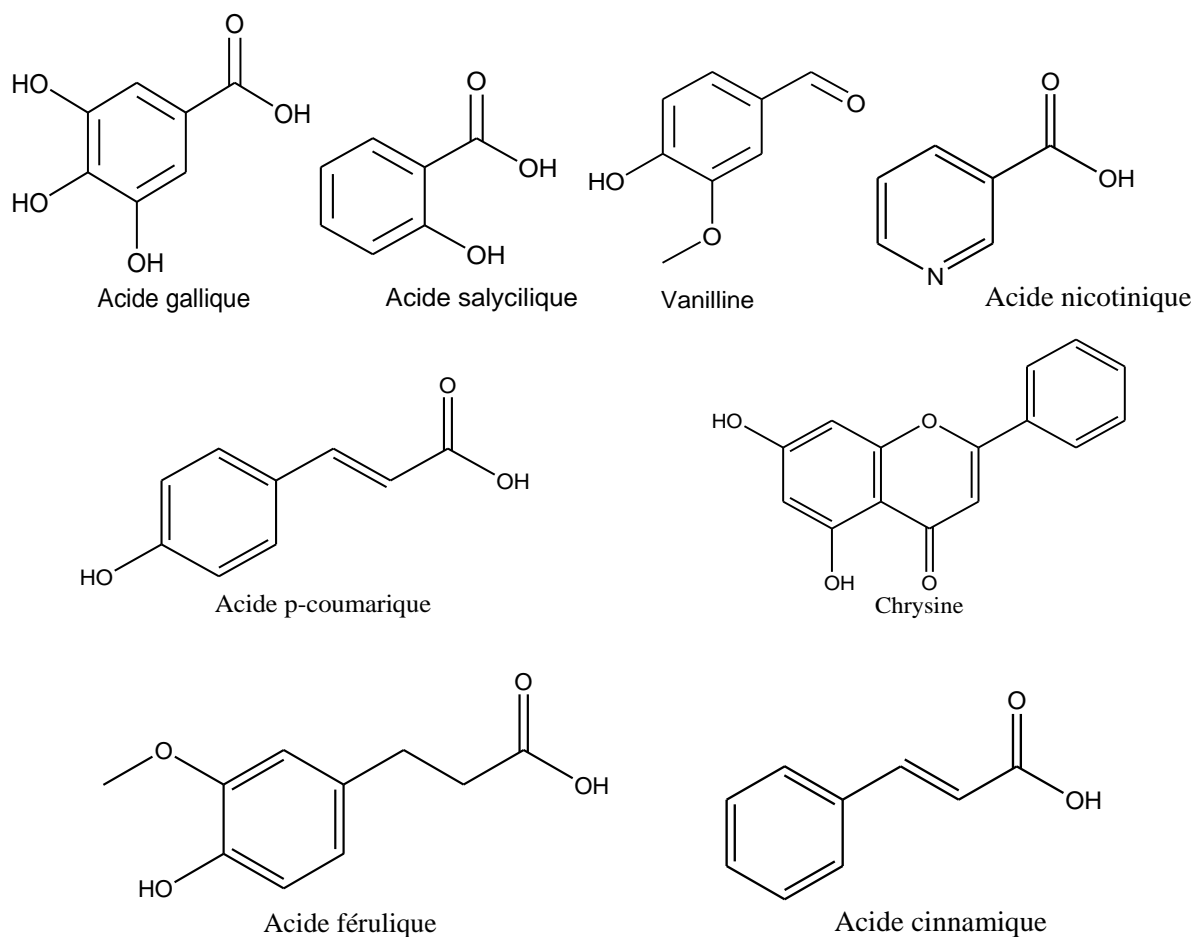
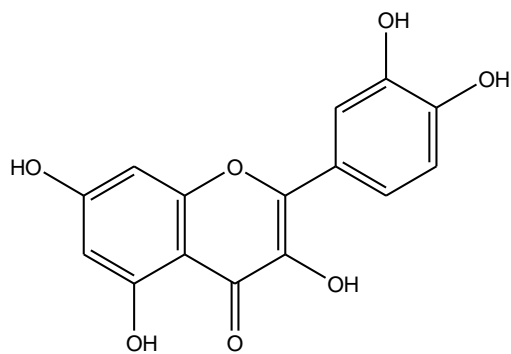


Figure 46: Profil chromatographique des extraits de la propolis de différentes régions de la wilaya de Tlemcen (régions montagnaise : EPB(Benisnous) et EPE (Eouret), régions de plaine : EPA(Chetouan) et EPI(Chouli).

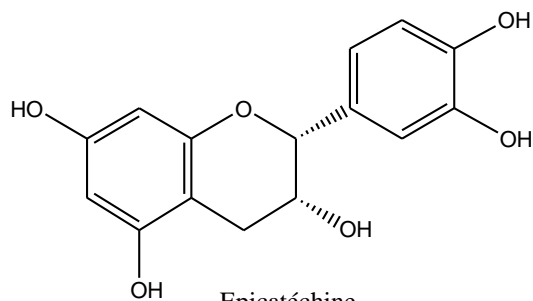
Selon la littérature, l'analyse HPLC de certains échantillons de la propolis Algérienne a révélé la présence de certains composés qui sont déjà présents dans nos échantillons tels que l'acide gallique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'épicatéchine, la vanilline, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, la quercétine, la rutine et le kaempférol, et d'autres composés bioactifs spécifiques comme la tectochrysin, naringénine, galangine,

Methoxychryisine, dérivés de l'acide caféique et l'apigénine [111][112]. L'apigénine, kaempférol, la chryisine, la rutine, la quercétine, l'acide caféique, la naringinine, l'hespériétine, l'acide gallique, l'acide p-coumarinique, l'acide férulique et l'épicatéchine ont été détectés dans des extraits éthanoliques de propolis de la Roumanie, la propolis égyptienne et indienne [113][114][115].

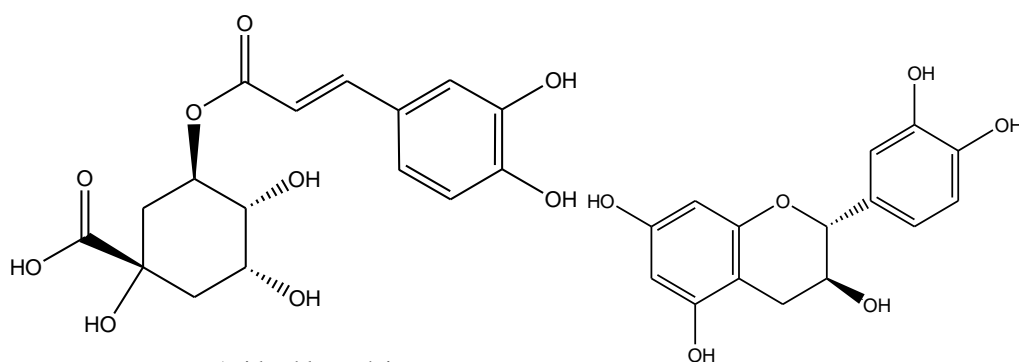




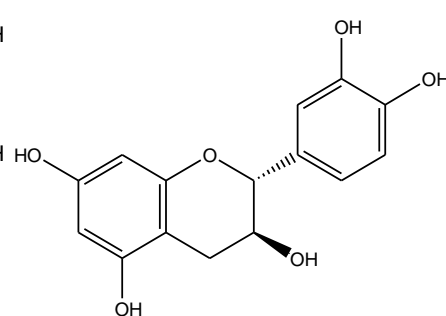
Quercétine



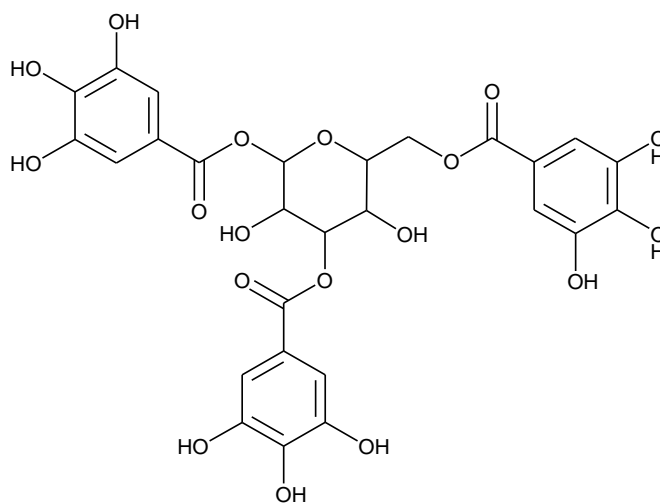
Epicatéchine



Acide chlorogénique



Catéchine



Acide tannique

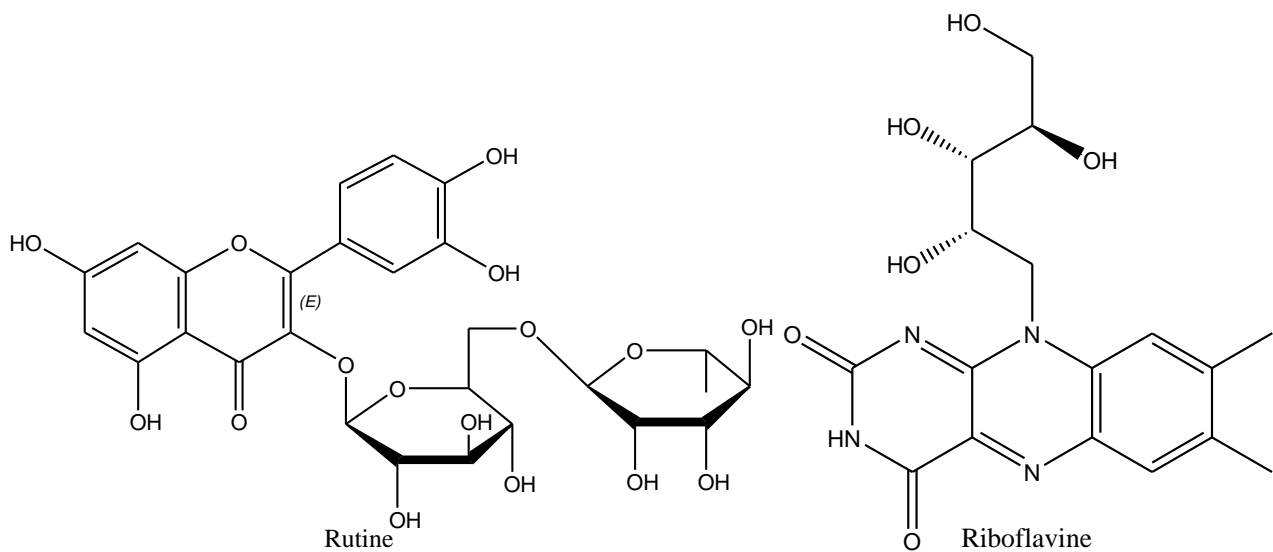


Figure 47: Structure des composés identifiés dans les extraits préparés par HPLC.

II. Identification par HPLC/MS :

La caractérisation des extraits éthanoïques de la propolis a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC/MS, le profil chromatographique des cinq extraits est regroupé dans les figures (55-56-57-58), les composés identifiés : la pinocembrine, la pinobanksine, la pinobanksine 3-acétate et la chryisine se sont révélés être communs dans les cinq échantillons. En outre, certains pics faibles non identifiés ont été observés, ces pics sont associés à des composés mineurs de la propolis, en comparant les deux résultats d'analyse, nous avons observé la présence de la chryisine dans tous les extraits par LC/MS, ce qui confirme les résultats obtenus par la technique HPLC citée précédemment. Les chromatogrammes des extraits des régions de Chouli EPI, Elourit EPE, et Benisnous EPB ont montré une richesse en composés par rapport aux extraits de la région de Chetouan EPA et Terny EPT, nous avons observé que l'intensité des pics des composés (pinocembrine, la pinobanksine, la pinobanksine 3-acétate et la chryisine) est faible pour les extraits EPT et EPA par rapport aux extraits EPI, EPE et EPB, les résultats indiquent que le taux des composés varie en fonction de la zone géographique et le mois de récolte.

Les résultats de l'analyse LC/MS sont rassemblés dans les tableaux et les figures au dessous :

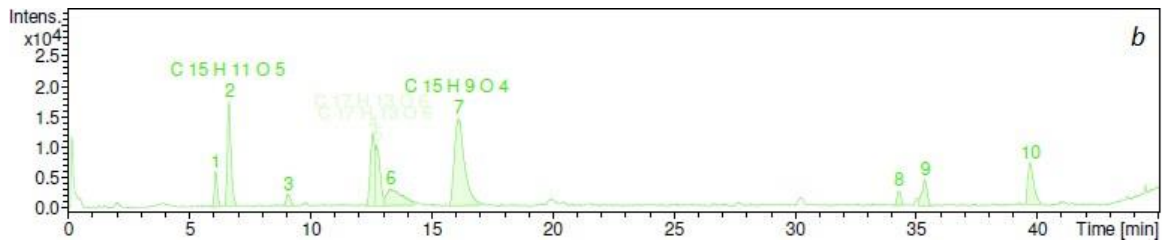


Figure 48: Profil chromatographique de l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI.

Le composé	Temps de rétention (min)	Masse (m/z)	[M-H] ⁻	Erreur (ppm)	Molécule
1	6.1	285.0771	--	--	
2	6.6	271.0611	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	0.3	pinobanksine
3	9.1	269.0449	--	--	
4	12.6	255.0662	C ₁₅ H ₁₁ O ₄		pinocembrine
		313.0717	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	0.2	pinobanksine 3-acetate
5	12.7	255.0661	C ₁₅ H ₁₁ O ₄		pinocembrine
		313.0715	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-0.9	pinobanksine 3-acetate
6	13.3	247.0975	--	--	
7	16.1	253.0509	C ₁₅ H ₉ O ₄	1.1	chrysrine
8	34.3	415.2118	--	--	
9	35.3	355.1192	--	--	
10	39.7	365.2129	--	--	

Tableau 18: Détermination de la composition de l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI.

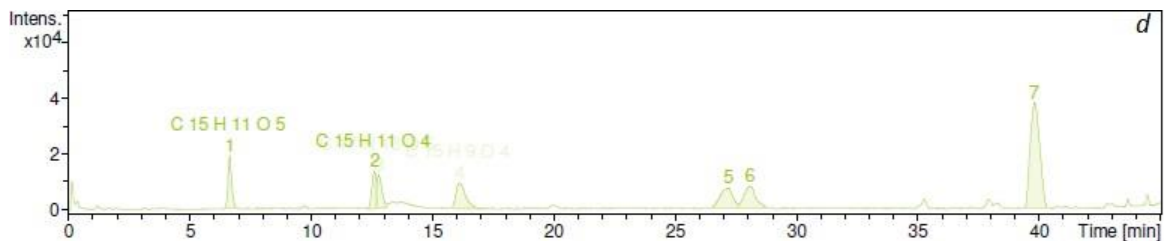


Figure 49: Profil chromatographique de l'extrait de la propolis de la région d'Elouret EPE.

Composé	Temps de rétention (min)	Masse (m/z)	[M-H] ⁻	Erreur (ppm)	Molécule
1	6.7	271.0614	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	0.7	pinobanksin
2	12.6	255.0667	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	1.5	pinocembrine
		313.0720	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-0.7	pinobanksine 3-acetate
3	12.8	255.0666	C ₁₅ H ₁₁ O ₄		pinocembrine
		313.0720	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	0.7	pinobanksine 3-acetate
4	16.1	253.0506	C ₁₅ H ₉ O ₄	0.1	chryisine
5	27.2	381.2063	--	--	
6	28.1	381.2063	--	--	
7	39.8	365.2144	--	--	

Tableau 19: Détermination de la composition de l'extrait de la propolis de la région d'Elouret.

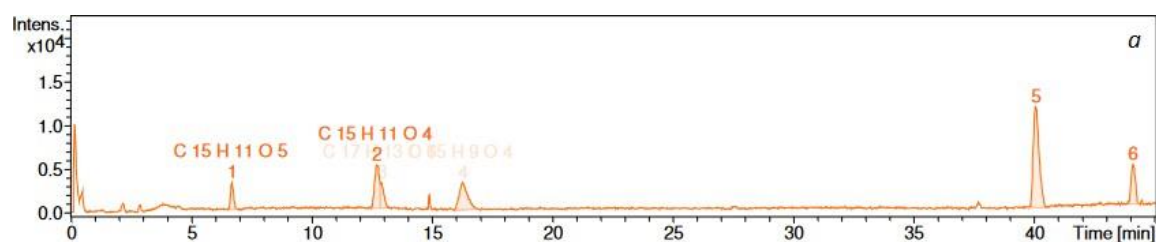


Figure 50: Profil chromatographique de l'extrait de la propolis de la région de Benisnous EPB.

Composé	Temps de rétention (min)	Masse (m/z)	[M-H] ⁻	Erreur (ppm)	Molécule
1	6.7	271.0616	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	1.4	pinobanksine
2	12.7	255.0658	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	-1.9	pinocembrine
		313.0713	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-1.6	pinobanksine 3-acetate
3	12.9	255.0657	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	-2.2	pinocembrine
		313.0709	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	2.6	pinobanksine 3-acetate
4	16.3	253.0502	C ₁₅ H ₉ O ₄	1.9	chryisine
5	40.0	365.2111	--	--	
6	44.1	277.2171	--	--	

Tableau 20: Détermination de la composition de l'extrait de la région de Benisnous EPB.

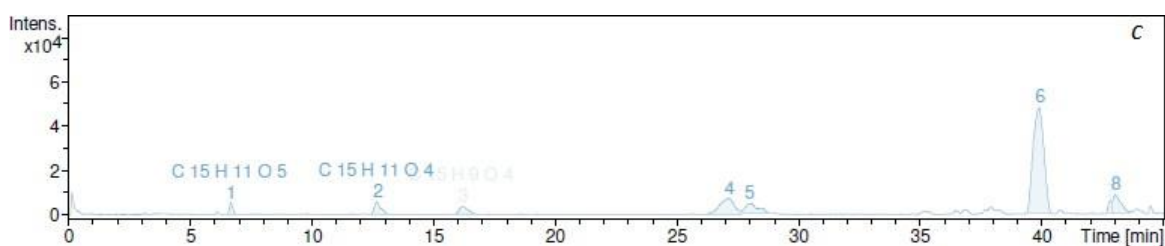


Figure 51: Profil chromatographique de la propolis de la région de Chetouan EPA.

Composé	Temps de rétention (min)	Masse (m/z)	[M-H] ⁻	Erreur (ppm)	Molécule
1	6.7	271.0617	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	1.8	pinobanksine
2	12.7	255.0662	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	-0.3	pinocembrine
		313.0713	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	-1.4	pinobanksine 3-acetate
3	16.2	253.0501	C ₁₅ H ₉ O ₄	-1.9	chrysrine
4	27.1	381.2062	--	--	
5	28.0	381.2059	--	--	
6	39.9	365.2119	--	--	
7	42.8	745.4122	--	--	
8	43.0	745.4121	--	--	

Tableau 21: Détermination de la composition de la propolis de la région de Chetouan EPA.

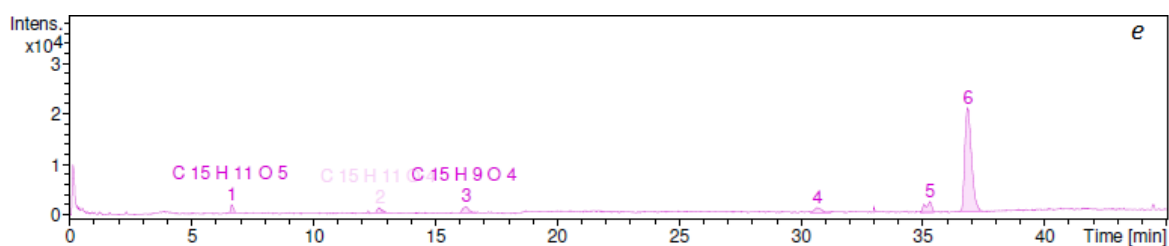


Figure 52: Profil chromatographique de la propolis de la région de Terny EPT.

Composé	Temps de rétention (min)	Masse (m/z)	[M-H] ⁻	Erreur (ppm)	Molécule
1	6.7	271.0597	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	5.6	pinobanksine
2	12.7	255.0660	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	1.2	pinocembrine
		313.0698	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	6.3	pinobanksine 3-acetate
3	16.3	253.0500	C ₁₅ H ₉ O ₄	2.6	chryisine
4	30.7	341.1385	--	--	
5	35.3	319.2272	--	--	
6	36.8	325.1451	--	--	

Tableau 22: Détermination de la composition de la propolis de la région de Terny EPT.

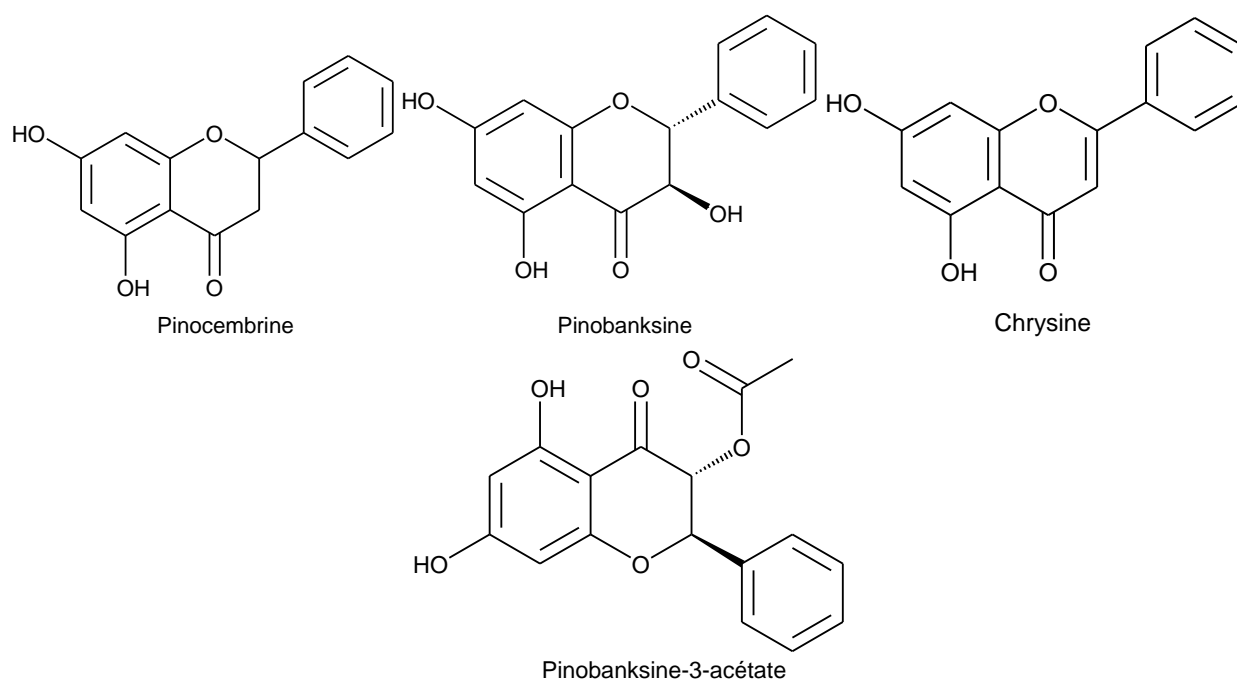


Figure 53: La structure des composés identifiés dans les extraits de la propolis par HPLC/MS.

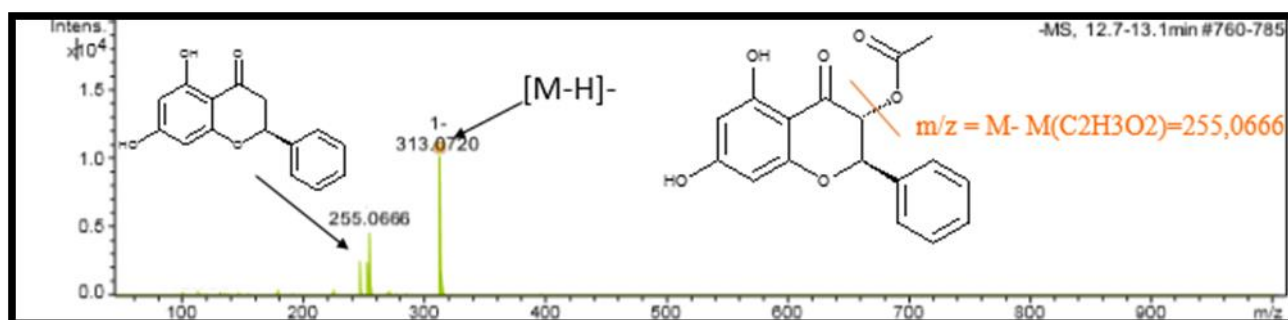


Figure 54: Spectre de masse de Pinobanksine-3-acétate.

Figure 61 : le spectre de masse montre un pic moléculaire à $m/z=313$ correspond à une formule moléculaire $C_{17}H_{14}O_6$ qui a été identifié comme pinobanksin-3-acétate, la présence du pic fragment à $m/z=255$ correspond à la perte de l'ester $[M-C_2H_3O_2]$.

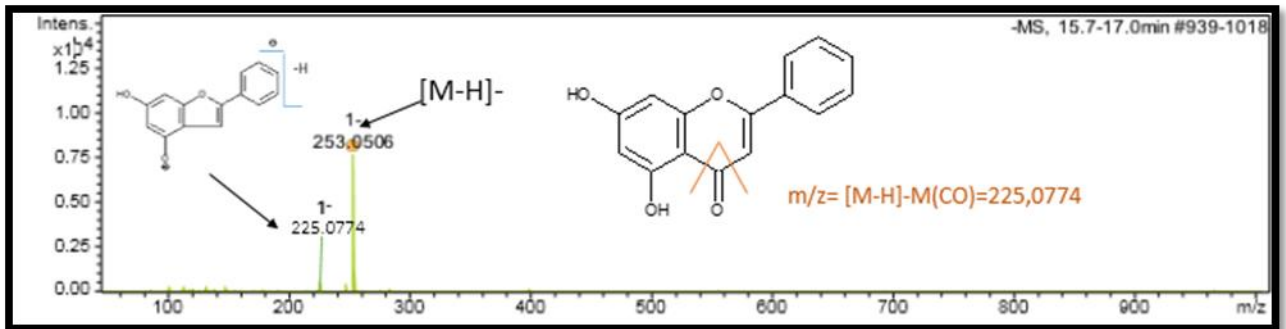


Figure 55: Spectre de masse de la Chry sine.

Figure 62 : un pic moléculaire à $m/z=253$ a été attribué à la chry sine ($C_{15}H_{10}O_4$), la présence du pic fragment à $m/z=225$ dans le spectre en raison de la perte du CO.

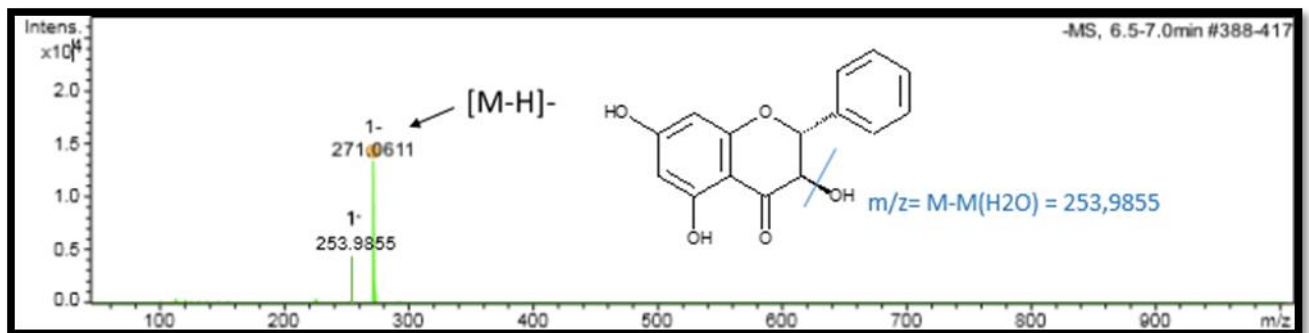


Figure 56: Spectre de masse de la Pinobanksin.

Figure 63 : un pic moléculaire à $m/z=271$ compatible à la formule brute $C_{15}H_{12}O_5$, la présence du fragment à $m/z=253$ qui est généralement considéré comme l'ion moléculaire de la pinobanksin déprotonné et déshydraté.

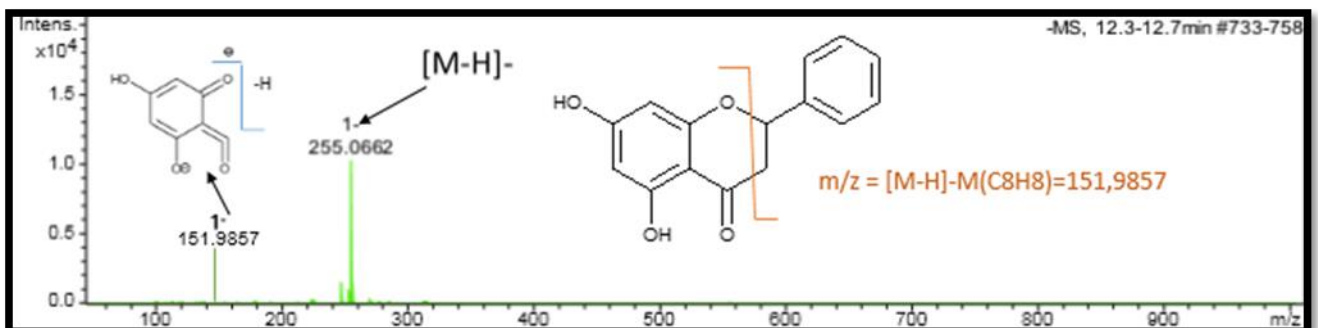


Figure 57: Spectre de masse de la Pinocembrin

Figure 64 : ce spectre a été attribué à la pinocembrine ($C_{15}H_{12}O_4$) avec un abondant pic à $m/z=255$.

Le spectre a montré une fragmentation à $m/z=151$ en raison du clivage du noyau C du flavonone.

III. Isolation des composés par chromatographie sur colonne et plaque chromatographique sur couche mince sur un support en verre :

L'extrait éthanoïque de la propolis (2g, mélange des cinq extraits) a été déposé sur colonne chromatographique en verre (diamètre=10mm/ diamètre=30mm) remplie par le gel de silice, la séparation en gradient a été réalisée avec un éluant Ether de pétrole/Acétate d'éthyle (7 :3). Nous avons isolé quelques composés à partir de quelques fractions (mélanges séparables) en utilisant une plaque Chromatographique sur couche mince sur un support en verre (20cm x20 cm) mais après une analyse RMN, nous avons remarqué la présence d'un grand nombre de signaux, nous avons réalisé une autre CCM des échantillon récupérés après l'analyse RMN, ils n'étaient pas suffisamment purs car nous avons observé la présence de quelques taches en traces sur leurs plaques CCM, ces traces n'apparaissent pas au début dans les fractions. Dans cette étude, nous avons arrivé à séparer trois composés purs avec des spectres RMN et IR , nous avons déterminé leurs rapports frontaux, leurs températures de fusion et nous avons utilisé la spectroscopie RMN-¹H, IR pour avoir une idée sur leurs structures et leurs fonctions. Nous ne pourrons pas déterminer la structure exacte de ces composés sans avoir d'autres paramètres comme par exemple les spectres de masse, RMN 2D.

Composé YF1-15 :

Apparence : solide blanc ; Rapport frontal : $R_f = 0.42$ (Ether de pétrole : 7/acétate d'éthyle : 3) ; Température de fusion : $T_F = 82^\circ\text{C}$

RMN-¹H : (CDCl_3 , MHz), δ ppm : (s, 6.41, 1H, OH phénolique) ; (m, 7.48-7.73, H aromatique); (s.10.05, 1H, aldehyde CHO).

IR-FTIR : 3188 cm^{-1} : OH phénolique ; 2854 cm^{-1} : C-H aliphatique ; 1708 cm^{-1} : C=O ; $1513\text{-}1466\text{ cm}^{-1}$: C=C noyau aromatique ; $1132\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$: C-O.

Composé YF-32 :

Apparence : poudre jaune ; Rapport frontal : $R_f = 0.30$ (Ether de pétrole : 7/Acétate d'éthyle : 3) ; Température de fusion : $T_F = 173^\circ\text{C}$

RMN-¹H: (CDCl_3 , MHz), δ ppm: (s, 7.90, 1H,OH phénolique); (s, 6.54, 1H,OH phénolique); (m, 7.22-7.64, H aromatiques)

IR-FTIR : 3417 cm^{-1} : OH ; 2986 cm^{-1} : =CH ; $1611\text{-}1583\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$: C=C cycles aromatiques ;

1668 cm^{-1} C=O.

Composé YF2-15 :

Apparence : solide cristallin blanc ; Rapport frontal : $R_f = 0.2$ (ether de pétrole : 7/acétate d'éthyle : 3) ;

Température de fusion: $T_f = 43^\circ\text{C}$

RMN- ^1H : RMN- ^1H : (CDCl_3 , MHz), δ ppm: (d, 1.01, 1H, CH/CH $_2$ / CH $_3$) ; (d, 0.9, 1H, CH/CH $_2$ / CH $_3$) (m, 3.31-3.44, 1H).

IR-FTIR: 3237 cm^{-1} : OH; 1000-1300 cm^{-1} : C-O, 1454 cm^{-1} : CH $_3$ CH $_2$.

Le composé **YF1-15** se présente sous forme d'un solide blanc, avec un point de fusion de 82°C . Son analyse par RMN du proton révèle un signal caractéristique à 10,05 ppm, typique d'un aldéhyde, associé à des signaux aromatiques entre 7,48 et 7,73 ppm. La spectroscopie infrarouge confirme la présence d'un groupe carbonyle à 1708 cm^{-1} et d'un noyau aromatique à 1513 cm^{-1} .

Le composé **YF-32** est une poudre jaune qui fond à 173°C . Son spectre RMN montre trois signaux distincts de protons phénoliques à 6,28, 6,54 et 7,90 ppm, caractéristiques d'une structure polyhydroxylée. La couleur jaune et le point de fusion élevé sont typiques des flavonoïdes de type flavone ou flavonol.

Le composé **YF2-15** se présente comme un solide cristallin blanc fondant à seulement 43°C . Son spectre RMN est dominé par des signaux aliphatiques à 0.9 et à 1,01 ppm.

L'interprétation complète des spectres RMN ^1H nécessite une analyse avancée RMN ^{13}C RMN 2D (HSQC HMBC, COSY, NOESY et ROESY) et MS qui sont essentielles pour une identification et une caractérisation structurale.

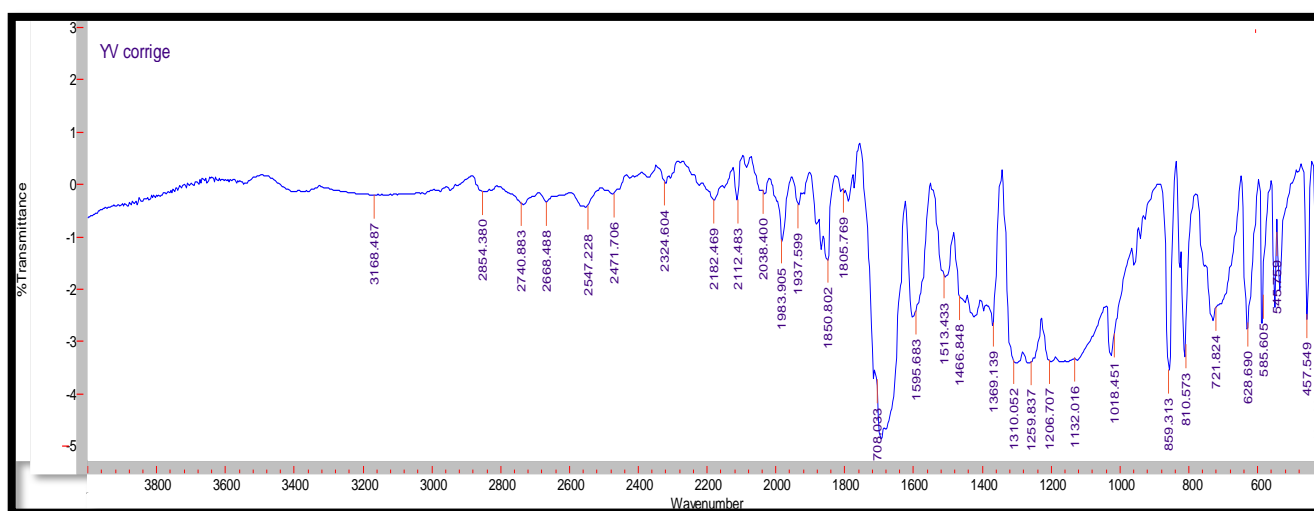


Figure 58: Spectre IR du composé YF1-15.

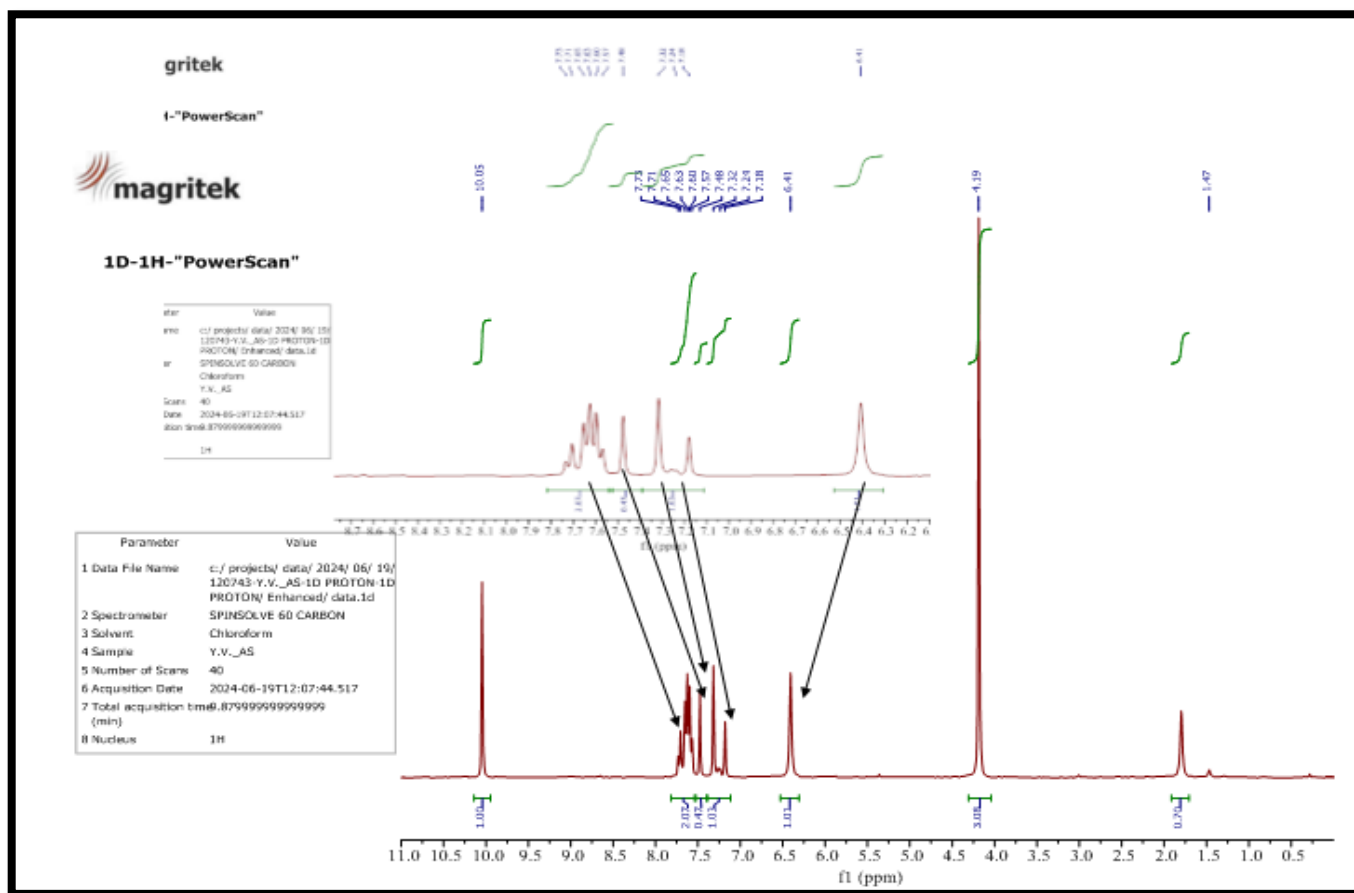


Figure 59: Spectre RMN-¹H du composé YF1-15.

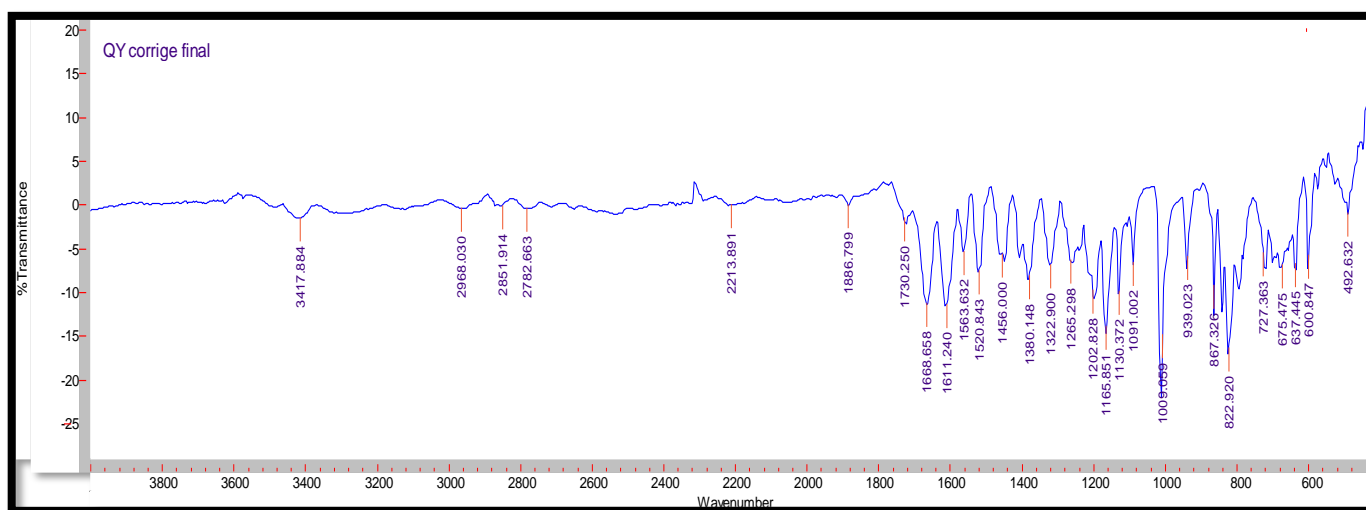


Figure 60: Spectre IR du composé YF-32.

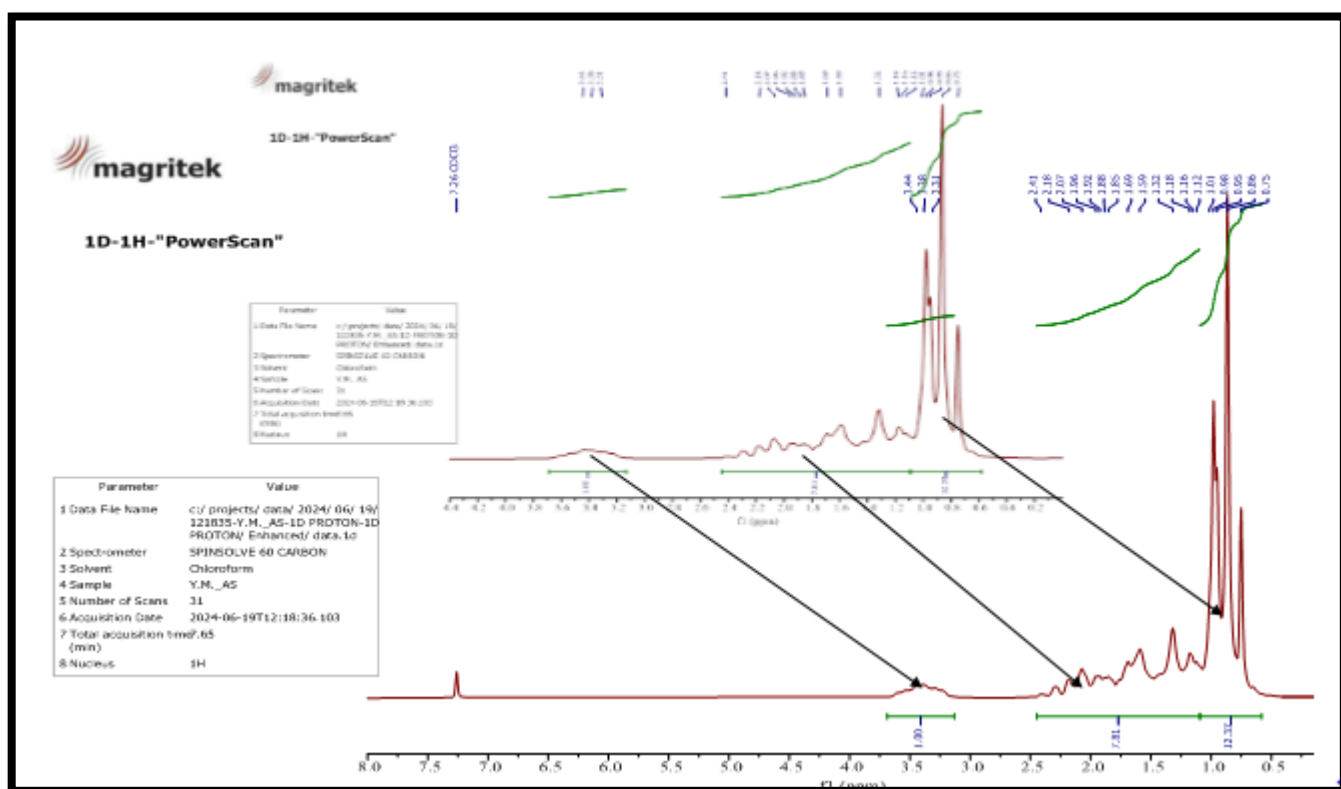


Figure 63: Spectre RMN-H du composé YF2-15.

La plaque CCM des composés isolés a été pulvérisée avec une solution de vanilline-acide sulfurique (révélateur chimique), pour qu'on puisse déterminer la classe chimique des composés isolés, les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

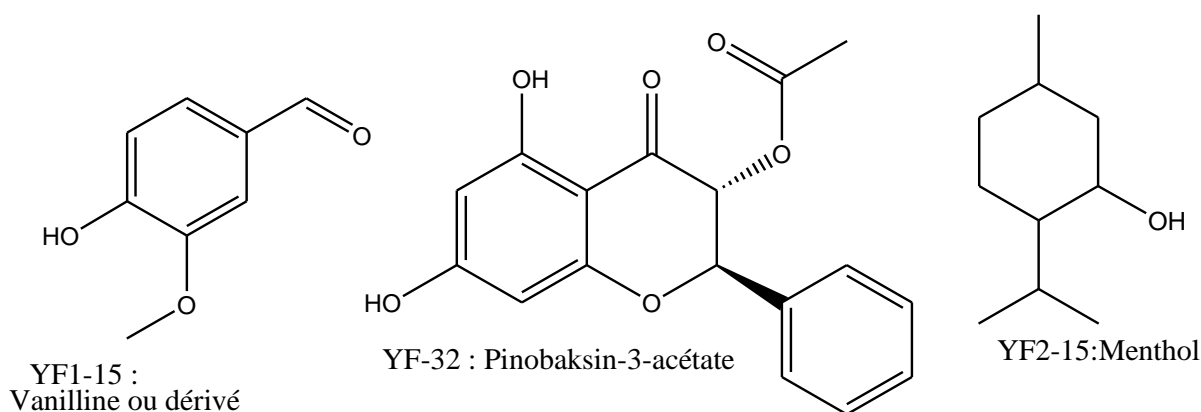
Composé	Couleur détectée	Classe chimique du composé
YF1-15	Rouge	Polyphénols
YF-32	Rose	Flavonoïdes
YF2-15	Violette	Terpénoïdes

Tableau 23: Détermination de la nature de la classe chimique des composés isolés.

Après une pulvérisation de la plaque CCM des composés isolés, nous avons observé, que le composé YF1-15 appartient à la famille des polyphénols nous avons donc affaire à un aldéhyde phénolique, une famille de composés reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes, le composé YF-32 appartient à la famille des

flavonoïdes ces antioxydants naturels par excellence la présence de trois groupements hydroxyles phénoliques lui confère un potentiel antioxydant particulièrement élevé, le dernier composé YF2-15 appartient à la famille des terpénoïdes, composés connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Cette technique nous a permis de classer nos échantillons selon leur nature chimique, nous avons déjà détecté la présence de ce type de composés dans les extraits de propolis, ce dernier a une composition chimique complexe riche en composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les polyphénols et les terpénoïdes et d'autres composés.

L'isolement par chromatographie sur colonne a permis d'obtenir trois composés purs (YF1-15, YF-32, YF2-15), leurs spectres IR et RMN-¹H ont été enregistrés et analysés. Sur la base de ces données spectrales, nous avons pu proposer une structure pour chacun d'eux : YF1-15 appartiendrait à la famille des polyphénols aldéhydiques, YF-32 à celle des flavonoïdes, et YF2-15 à celle des terpénoïdes, en attendant des analyses complémentaires (SM, RMN 2D) pour une confirmation sans ambiguïté.



Proposition 1 – Composé YF1-15 : Vanilline (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde) ou dérivé : $T_F = 82^\circ\text{C}$ (compatible avec 82°C), IR : $\text{C}=\text{O}$ 1708cm^{-1} , RMN CHO 10,05 ppm, cette molécule est un polyphénol aldéhydique.

Proposition 2 – Composé YF-32 : Flavone ou flavonol hydroxylé, Pinobanksine-3-acétate déjà détectée par HPLC-MS dans tous les extraits, point de fusion $\sim 170\text{-}175^\circ\text{C}$ (compatible avec 173°C).

Proposition 3 – Composé YF2-15 : Monoterpène, le point de fusion bas (43°C) est typique d'un terpénoïde de faible masse moléculaire, Sur la base des données disponibles, YF2-15 est très probablement le menthol (racémique ou L-menthol), point de fusion 43°C : C'est exactement la gamme du menthol ($42\text{-}45^\circ\text{C}$), le doublet à 1,01 ppm correspond aux groupes méthyles du menthol, le multiplet entre 3,31 et 3,44 ppm correspond au proton porté par le carbone lié à l'oxygène, $R_f = 0,2$: dans un système éther de pétrole/acétate d'éthyle (7:3), le

menthol migre modérément, ce qui est cohérent avec une polarité moyenne (alcool secondaire). Afin de déterminer le système d'éluion le plus adapté à la séparation des composés des extraits de propolis par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie sur colonne, plusieurs mélanges de solvants de polarités variées ont été testés. Les essais ont porté sur différents systèmes binaires, ternaires ainsi que des **variations de proportions**. Les résultats de ces essais, résumés ci-dessous, ont permis de sélectionner le mélange éther de pétrole / acétate d'éthyle (7:3, v/v) comme le plus efficace en termes de résolution et de reproductibilité.

Système éluant	Proportions variables	Observations
Chloroforme / Méthanol	Oui	Aucune tache sur la plaque
Chloroforme / Eau	Oui	
Dichlorométhane / Éthanol	Oui	
Toluène / Acétate d'éthyle / Acide acétique	Oui	Mélange très complexe
Hexane / Acétate d'éthyle / Éthanol	Oui	
Hexane / Acétate d'éthyle / Eau	Oui	
Hexane / Chloroforme / Acétonitrile	Oui	
Toluène / Acétone / Acide acétique	Oui	
n-Hexane / Acétate d'éthyle / Acide formique	Oui	

Tableau 24: Tableau récapitulant les systèmes de solvants testés.

Partie II. Evaluation de l'activité biologique :

Cette partie se focalise sur les étapes suivantes :

- L'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes (DPPH et le test blanchiment du β carotène).
- L'évaluation de l'activité anti bactérienne antifongique par la méthode de diffusion sur disque.
- L'évaluation de l'activité neuroprotective des extraits de la propolis par la méthode d'inhibition enzymatique de l'Acétylcholinestérase et Butylcholinestérase.
- L'évaluation de l'activité immunostimulante.

1. Matériels et méthodes :**Réactifs chimiques :**

Plusieurs réactifs ont été utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante et anti inflammatoire in vitro des extraits de la propolis : DPPH, acide ascorbique, β -carotène, acide linoléique, chloroforme, tween40, BHT, DMSO.

Souches bactériennes et fongiques utilisées : Les extraits de propolis ont été testés sur deux souches gram-positives, trois gram-négatives et deux levures : *Escherichia. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans ATCC 10231* et *Candida albicans ATCC 26709*.

Milieu de culture utilisé : Nous avons utilisé comme milieu de culture : Gélose Muller et Hinton pour les souches bactériennes et la Gélose Sabouraud pour les souches fongiques.

Remarques : La gélose nutritive a été utilisée pour l'isolement et l'entretien des souches à tester.

Test de prolifération des lymphocytes : Tous les aspects des expériences ont été approuvés et ont été menés conformément aux directives fournies par le comité d'éthique local de l'Université hospitalière de Tlemcen, en Algérie (Protocole N° D01N01UN130120220001).

Evaluation de l'activité biologique des extraits de la propolis :

Il serait intéressant d'évaluer l'activité biologique des extraits de la propolis, pour cette raison, dans cette partie nous avons évalué l'activité antioxydante, antimicrobienne et antifongique et neuroprotective des extraits de la propolis EPE qui a permis la détermination de l'efficacité ou non l'efficacité de nos échantillons sur le plan biologique.

I. Evaluation de l'activité antioxydante par des tests in vitro :

Les méthodes les plus couramment utilisées sont DPPH, FRAP, ABTS, test de blanchiment du β -carotène et la méthode de l'ORAC pour analyser les extraits naturels. Dans notre travail nous avons utilisé que la méthode du DPPH et test de blanchiment du β -carotène.

I.1. Test de piégeage du radical libre (DPPH) :

Principe de la méthode :

La réduction du radical libre DPPH^o de couleur violette se fait par un composé donneur d'atome d'hydrogène H ou un électron ce qui conduit à la formation du DPPH-H et disparition de sa couleur et l'apparition d'une couleur jaune pale [116].

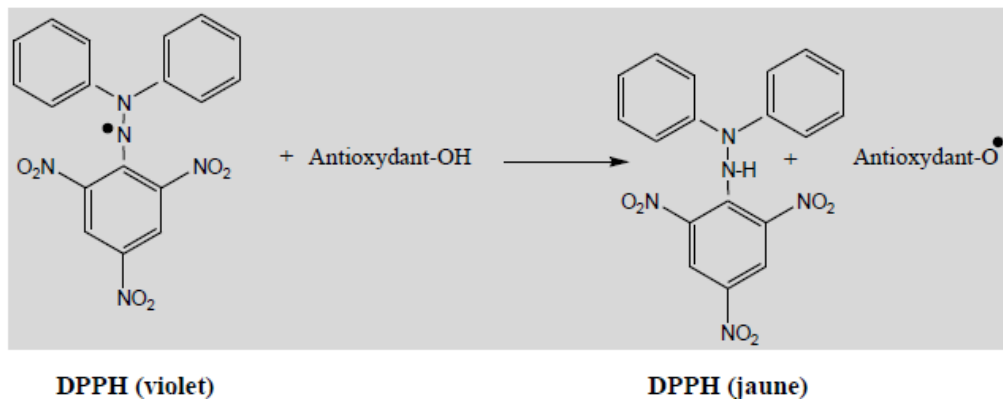


Figure 64: La réduction du DPPH^o par un antioxydant.

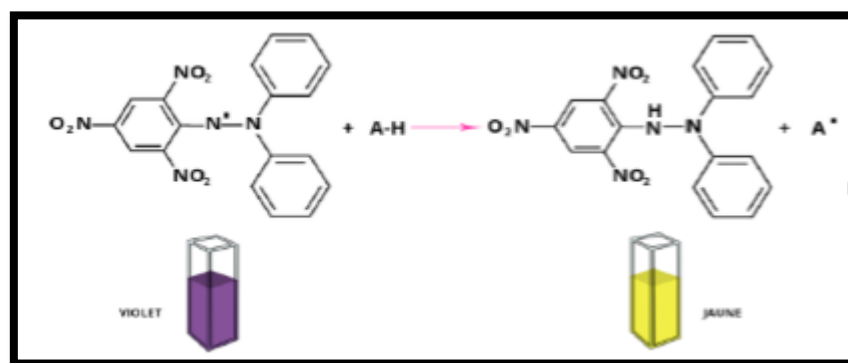


Figure 65: Réduction du radical DPPH.

L'activité anti radicalaire a été déterminée selon la méthode décrite par Blois [117] en utilisant le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

Procédure :

En premier temps, une solution éthanoïque de DPPH a été préparé en solubilisant 2mg des cristaux de DPPH dans 50 ml d'éthanol, la solution préparée est conservée à l'abri de la lumière et au frigo pendant 30 min avant son utilisation, des solutions éthanoïque de propolis de différents extraits ont été préparées à partir des solutions mères, 1.95ml de la solution DPPH a été ajouté à 50 µl de chaque solution de la propolis préparée, après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, les absorbances ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm contre le contrôle négatif ,le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante ¹²⁵:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec :

A₀ : Absorbance du contrôle négatif

A₁ : Absorbance de l'échantillon après 30 min

L'étalon de référence utilisé est l'acide ascorbique, ce dernier a été analysé selon la même procédure que les échantillons. L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en IC₅₀. Pour chaque extrait l'IC₅₀ est déduite de la droite d'étalonnage correspondante.

I.2. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique :***Principe de la méthode :***

Le principe de cette méthode se repose sur la capacité d'un composé à inhiber la dégradation du β-carotène Par l'acide linoléique, si le composé est capable d'inhiber la dégradation du β-carotène, la couleur reste orange, sinon il y aura un blanchiment de ce dernier (disparition de la couleur orange) [118].

Procédure :

Le protocole est décrit par Bougatef et *al* [119]:

Une quantité de 0.5mg de β carotène a été mélangée avec 1 ml de chloroforme, puis 2.5 μ l d'acide linoléique et 200mg de Tween 40 ont été ajoutées à la solution (β carotène-chloroforme). Le chloroforme a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C, ensuite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutées au mélange. Un volume de 0,5 ml de chaque solution éthanoïque des extraits de la propolis ou l'antioxydant de référence BHT) a été mélangé avec 2,5 ml de l'émulsion acide linoléique/Tween40/ β carotène, le mélange a été incubé au bain mari à 50 °C pendant 2h ,l'absorbance a été mesurée à 470 nm ,la première lecture de l'absorbance des extraits a été faite toute suite avant l'incubation à t=0 min , ensuite à des intervalle de 15 minutes jusqu'à t= 120 min. Un contrôle négatif contenant 0,5 ml de l'eau distillée au lieu de l'extrait a été effectué en parallèle.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition} = [1 - (A_{t0 \text{ min}} - A_{t120 \text{ min}}) \text{ échantillon} / (A_{t0 \text{ min}} - A_{t120 \text{ min}}) \text{ Contrôle négatif}] \times 100.$$

Avec :

$A_{t0 \text{ min}}$: Valeur d'absorbance du β -carotène en présence du composé (extrait) à t=0 minutes.

$A_{t120 \text{ min}}$: Valeur d'absorbance du β -carotène en présence du composé (extrait) à t=120minutes.

II. Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique par des tests *in vitro* :

II.1. Test antimicrobien et antifongique :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier de Wattman.

II.1.1. Méthode des disques (méthode de diffusion sur gélose ou l'antibiogramme) :

➤ **Préparation de l'inoculum :**

Toutes les suspensions bactériennes ont été préparé dans des tubes de 5 ml d'eau physiologique par une dilution d'une ou deux colonies de bactérie ou de levures, ensuite les tubes à essai ont été placés dans un vortex pour bien homogénéiser le milieu de culture, puis la charge de chaque tube à essai a été mesuré à l'aide d'un densitomètre ((DEN-1) Mc Ferland Densitometer Grant-bio) et l'opacité (turbidité) doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland.

➤ **L'ensemencement des souches :**

Les différents extraits de la propolis ont été solubilisés dans le DMSO à une concentration de 20 mg/ml et les souches ont été ensemencées sur des boites de pétri contenant de la gélose de Sabouraud pour les levures et la gélose Muller Hinton pour les bactéries. L'ensemencement de chaque inoculum a été réalisé en frottant la surface de la boite à pétri qui contient la gélose à l'aide des écouvillons stériles trempés dans la suspension bactérienne, la surface gélosée doit être ensemencée de bas en haut ,cette opération a été répétée trois fois en tournant la boite à 60° à chaque fois, ensuite des puits (des disques de papier de Wattman stériles de 6mm de diamètre) ont été placés dans les boites à pétri et imbibés de 20µl de la solution d'extrait à l'aide d'une micropipette, l'ensemble a été incubé pendant 24h à 37°C ,après l'incubation le diamètre d'inhibition a été mesuré à l'aide d'une règle graduée, le diamètre est exprimé en millimètre (mm).

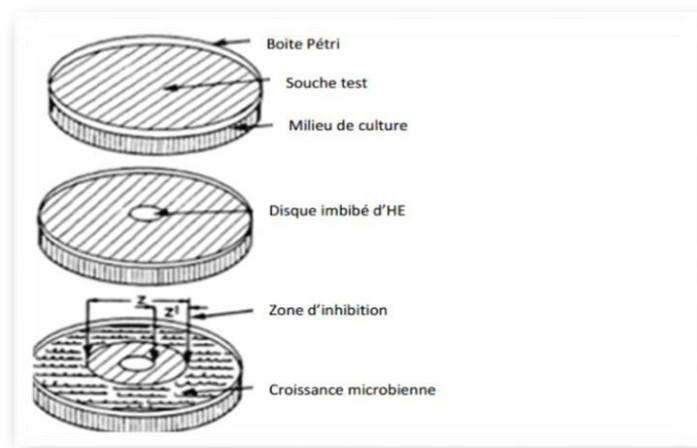


Figure 66: La méthode des disques (l'antibiogramme) [120].

III. Evaluation de l'activité neuroprotective :

III.1. Activité anti cholinestérase :

L'activité neuroprotective a été évaluée par l'inhibition des enzymes Ache (Acétylcholinestérase) et BChE (Butyrylcholinestérase) selon la méthode de Bensaad et *al* [121].

Procédure :

Brièvement, un mélange de 150 µL de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8), 10 d'extraits à différentes concentrations (dilués dans l'éthanol) et 20 µL d'AChE (5,32 x 10⁻³ U) ou de BChE (6,85 x 10⁻³ U) ont été préparés et incubés à 25 °C pendant 15 minutes. Ensuite, 10 µl de DTNB (0,5 Mm) ont été ajoutés, après l'ajout de 10 µl d'acétylthiocholineiodide (0,71 mM) ou de 10 µl de chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM), la réaction a démarré. L'absorbance a été lue à 412 nm par un lecteur de microplaques à 96 puits. La galantamine a été utilisée comme étalon.

Le pourcentage d'inhibition des enzymes AChE ou BChE a été déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$(E-S)/E \times 100$$

Avec :

E : l'activité de l'enzyme sans les échantillons testés

S : l'activité de l'enzyme avec les échantillons testés.

IV. Evaluation de l'activité immunostimulante :

Procédure :

Les lymphocytes ont été isolés à partir du sang d'un donneur sain par centrifugation (400g pendant 40 minutes) sur un gradient de densité Histopaque 1077. Les lymphocytes ont été recueillis à l'interface du plasma et de l'histopaque, puis lavés dans un milieu de culture RPMI 1640. Après comptage cellulaire, les cellules ont été resuspendues dans RPMI 1640 à une concentration de 4 10⁶ cellules/ml. Des aliquotes de 4

cellules 10 ont été cultivées en triple dans des microplaques avec un milieu RPMI complété d'un tampon HEPES de 25 mM, de sérum foetal pour veau inactivé à 10 %, de 2 mM de l-glutamine, de 5,9 10 M de 2-mercaptoéthanol, de 100 UI/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine, en présence de 5 µg/ml du mitogène Concanavalin A. Les cultures ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO pendant 48 heures [122]. Pour évaluer les effets des extraits de propolis éthanoliques, on a traité les lymphocytes avec différentes concentrations d'extraits d'EEP (0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL). Après incubation, les cellules ont été lavées avec RPMI 1640 et la viabilité et la prolifération ont été évaluées par le test MTT, la prolifération des lymphocytes a été estimée par l'indice de stimulation (SI) en utilisant la formule suivante :

$$SI = [(abs_M - abs_S) / abs_{NS}] \times 100$$

Avec :

SI : l'indice de stimulation.

Abs_M : absorbance du mitogène.

Abs_S : absorbance des cellules stimulées à blanc.

Abs_{NS} : absorbance des cellules non stimulées à blanc.

Marqueurs oxydants/antioxydants des lymphocytes :

Après 48 heures d'incubation, de collecte et de lavage des cellules, les lymphocytes ont été resuspendus dans un tampon de phosphate (pH 7,0), centrifugés à 15.000 x g pendant 20 minutes. Les fractions surnageantes ont ensuite été aliquotées pour évaluer les marqueurs redox intracellulaires. Les malondialdéhyde des lymphocytes (MDA, marqueur de peroxydation lipidique) et les protéines carbonylées (CARP, marqueur d'oxydation protéique) ont été déterminées par des méthodes spécifiques utilisant respectivement l'acide thiobarbiturique ou la réaction de 2,4-dinitrophényl hydrazine.

Les teneurs en glutathion réduit par lymphocytes (GSH) ont été estimées par la méthode colorimétrique basée sur le taux de formation d'acide 2-nitro-5 thiobenzoïque après réduction médiée par GSH de l'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque.

L'activité de la catalase des lymphocytes a été évaluée par la méthode spectrophotométrique basée sur le taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène médié par la catalase (H_2O_2 , 35 mM) à 240 nm. La libération d'oxyde nitrique NO a été déterminée par la méthode Griess à l'aide du kit de dosage d'oxyde nitrique.

2. Résultats et discussion :

I. Détermination des IC_{50} des extraits pour l'activité antioxydante :

Les IC_{50} sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des droites tracées, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés. Plus IC_{50} est petites, plus l'antioxydant a une activité plus importante, l'étude de l'activité antioxydante nous permet de sélectionner l'extrait le plus actif. Les concentrations inhibitrices médianes (IC_{50}) pour chaque extrait en utilisant les deux méthodes sont regroupées dans le tableau suivant et sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$:

Echantillons	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
	DPPH	β -carotène
EPB	58.24 \pm 0.41	16.91 \pm 0.10
EPA	55.89 \pm 0.22	16.65 \pm 0.10
EPI	53.76 \pm 0.19	16.12 \pm 0.10
EPE	54.76 \pm 0.10	16.52 \pm 0.10
EPT	>200	>200
Acide ascorbique	48.00 \pm 0.19	/
BHT	/	1.79 \pm 0.37

Tableau 24 : IC_{50} de l'activité antioxydante des extraits.

Tous les extraits ont montré une activité antioxydante, les IC_{50} des différents extraits testés avec la solution de DPPH varient de 53,76 à 232 $\mu\text{g/ml}$, selon les résultats obtenus, l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI est considéré comme l'extrait le plus actif avec $IC_{50} = 53,76\mu\text{g/ml}$, suivi par l'extrait d'Elourit EPE, de Chetouan EPA et de Benisnous EPB avec $IC_{50} = 54,76\mu\text{g/ml}$ 55,89 $\mu\text{g/ml}$ 58,24 $\mu\text{g/ml}$, respectivement, l'extrait de propolis de la région Terny EPT a montré le plus faible pouvoir antiradical avec une $IC_{50} > 200\mu\text{g/ml}$. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard, montrant une activité anti-radicalaire autour de 48 $\mu\text{g/ml}$, l'acide ascorbique était plus actif que tout extrait de propolis, les résultats du tableau indiquent que l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI, est considéré comme le plus actif des quatre

autres extraits et en même temps il a une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique. Boufadi et *al* ont testé l'activité antioxydante de l'extrait éthanoïque de propolis de Tizit et l'extrait a montré une activité anti radicalaire significative avec IC_{50} entre 19,4 et 16,3 $\mu\text{g/ml}$ [123], Bouaroura et *al* ont également évalué l'activité antioxydante par DPPH de la propolis collectée dans certaines régions d'Algérie, les extraits ont montré un pouvoir anti radical impressionnant avec une IC_{50} entre 10,03 et 17 $\mu\text{g/ml}$ [124], ces extraits sont plus actifs que ceux collectés pour notre étude. Béji-Srairi et *al* ont évalué l'activité anti radicalaire des extraits de propolis éthanoïques tunisiennes, les valeurs IC_{50} se situaient entre 244 et 616 $\mu\text{g/ml}$ [106].

Concernant les résultats de l'activité antioxydante par la méthode d'oxydation de l'acide linoléique, la meilleure activité a été obtenue par l'extrait de propolis de la région de Chouli EPI avec une $IC_{50} = 16,12 \mu\text{g/ml}$, l'extrait de la propolis de la région de Terny a marqué une $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ c'est-à-dire la plus faible activité antioxydante par rapport aux autres extraits, le BHT a été utilisé comme référence, enregistrant une $IC_{50} = 1,79 \mu\text{g/ml}$, l'extrait de la région de Chouli EPI est considéré comme l'extrait le plus actif, a une IC_{50} supérieure à celle du BHT ce qui signifie une activité antioxydante plus faible que le BHT.

Bouaroura et *al* ont évalué la capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique par le test de blanchiment du β -carotène de certains échantillons de propolis algérienne, les valeurs IC_{50} obtenues sont comprises entre 11,34 et 40,38 $\mu\text{g/ml}$ [124], nos résultats sont meilleurs que ceux rapportés par Beji-Srairi et *al* de la propolis Tunisienne qui ont des IC_{50} allant de 1300 à 2000 $\mu\text{g/mL}$ [106]. En se basant sur les résultats de notre étude et les travaux déjà réalisés sur l'activité antioxydante des extraits de la propolis, nous avons constaté que l'activité antioxydante semble être influencée par le contenu en polyphénols et flavonoïdes, nos résultats sont en accord avec la littérature, plusieurs études ont montré que la propolis est largement influencée par le taux des polyphénols et de flavonoïdes, plus l'extrait est riche en composés phénoliques plus l'activité antioxydante est meilleure [124].

Les résultats obtenus par la méthode de DPPH sont en corrélation avec ceux de la méthode d'oxydation de l'acide linoléique, nous avons observé que l'extrait de la propolis de la région Chouli EPI a montré la meilleure activité antioxydante par les deux méthodes et l'extrait de la propolis de la région de Terny a marqué la plus faible activité antioxydante que se soit par le test DPPH ou la méthode d'oxydation de l'acide linoléique.

Test qualitatif par une solution de DPPH (HPLTC bio-autographique) :

Dans le but de confirmer le pouvoir antioxydant des fractions isolées des extraits de propolis par colonne chromatographique, un test qualitatif a été réalisé, c'est un test antioxydant qui nécessite une pulvérisation des plaques CCM par une solution méthanoïque de DPPH (0.004%) qui permet de visualiser des taches jaunes. Après la pulvérisation des plaques CCM nous avons observé l'apparition de la couleur jaune dans les plaques CCM de quelques fractions, qui signifie un piégeage des radicaux libres, c'est-à-dire ces fractions contiennent des composés qui ont un pouvoir antioxydant, ce qui nous a permis de sélectionner les bonnes fractions pour passer à une autre séparation pour isoler des composés purs.

II. Détermination du diamètre d'inhibition des extraits pour l'activité antibactérienne et antifongique :

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

	<i>E.Coli</i>	<i>P.aeruginae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.feacalis</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>Cand10231</i>	<i>Cand2679</i>
EPB	6	8	15	12	8	9	6
EPI	7	9	25	13	8	9	7
EPA	7	8	21	13	8	9	6
EPE	6	8	25	12	8	9	6
EPT	-	6	7	7	6	6	-

Tableau 25: Diamètre d'inhibition de la croissance microbienne exprimé en mm.

Les quatre extraits éthanoïques (EPB, EPI, EPA et EPE) ont montré une activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées et nous nous avons constaté que nos extraits avaient une bonne activité antibactérienne, en particulier contre les bactéries à Gram positif (*S.aureus* et *E.faecalis*), le diamètre d'inhibition variait de 7 à 25mm pour *S.aureus* suivi par *E.faecalis* avec un diamètre variant de 7mm à 13 mm, *K. pneumoniae* (6mm à 9 mm), *E.coli* (6mm à 7 mm), *Candida Albicans ATCC 10231* (6mm à 9 mm) et *Candida Albicans ATCC2679* (6mm à 7 mm). Les meilleures activités antibactériennes ont été observées par EPI et EPE contre *S.aureus* avec $DI = 25mm$, ce potentiel antimicrobien élevé pourrait être lié à leur valeur élevée de polyphénols et flavonoïdes et l'extrait éthanoïque de propolis de la région de Terny présentait une faible activité antibactérienne il n'était actif que contre *S.aureus*, *P.aeruginae*, *K.pneumoniae*

et *Candida Albican ATCC 102321*, cette faible activité pourrait être liée à ses faibles niveaux de polyphénols et de flavonoïdes.

Quatre échantillons de propolis ont été prélevés dans quatre régions d'Annaba, leur activité antibactérienne a été évaluée, les résultats obtenus ont montré que tous les extraits éthanoliques inhibaient toutes les souches bactériennes avec un diamètre d'inhibition variant entre 9mm et 12 mm pour *S.aureus*, *P.aeruginae* (7mm à 9 mm) et *E.coli* (8mm à 9mm) [125], nos résultats ont montré que nos échantillons de la propolis récoltée dans différentes régions de Tlemcen semblent très efficaces contre les souches pathogènes *S.aureus* et *E.coli* par rapport à ceux des régions d'Annaba.

La propolis possède une importante activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram positives et les levures, elle a montré une activité antibactérienne contre *Enterococcus sp*, *Escherichia Coli*, et surtout *Staphylococcus aureus* en raison des acides phénoliques et les flavonoïdes présents dans la propolis qui sont considérés comme des molécules pharmacologiquement actives ayant un effet sur les champignons, les virus et les bactéries [126][127]. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature, qui montrent que les extraits de la propolis ont une meilleure activité contre les bactéries à Gram-positives que contre les bactéries à Gram-négatives.

III. Détermination des IC₅₀ pour l'activité anti cholinestérase :

L'activité anti cholinestérase des extraits éthanoliques de la propolis de Tlemcen a été évaluée à l'aide de deux méthodes : l'analyse de l'inhibition de l'activité inhibitrice de l'acétyl cholinestérase AchE et de la butyl cholinestérase BchE, les résultats sont représentés dans le tableau suivant (Tableau 21) et Galantamin a été utilisé comme médicament standard.

Samples	IC ₅₀ µg/ml	
	AchE inhibition	BchE inhibition
EPB	55.73±0.31	5.36 ±1.11
EPA	47.87±0.41	4.72 ±0.80
EPI	38.23±0.27	4.03 ±1.12
EPE	49.16±0.20	4.59 ±0.70
EPT	Na	Na
Galantamin	6.27±1.15	34.75 ±1.99

Tableau 26: IC₅₀ de l'activité neuroprotective des extraits.

Na : pas d'absorbance.

Galantamine : référence.

Les valeurs des IC₅₀ des extraits éthanoïques de la propolis pour l'inhibition d'AChE variaient de 38,23 à 55,73 µg/ml et pour l'inhibition de BChE, les valeurs de la IC₅₀ allaient de 4,03 à 5,36 µg/ml, d'après les résultats obtenus, les valeurs ont montré que les extraits éthanoïques de propolis provenant des régions de Chouli EPI, Chetouan EPA, Benisnous EPB, Elourit EPE et Galantamin inhibent l'activité AchE et BchE, nous avons constaté que la propolis de la région de Terny EPT ne montrait aucune inhibition des deux enzymes, ce qui indique qu'elle n'a pas d'activité anti-cholinestérase. Les extraits éthanoïques d'EPI, EPE, EPA et EPB ont montré une activité inhibitrice moindre contre AChE par rapport à la Galantamin (IC₅₀=6,27µg/ml), au même temps ces échantillons ont montré une activité inhibitrice plus élevée contre BchE, encore supérieure à celle de la Galantamin (IC₅₀=34,75µg/ml). L'extrait de la propolis de la région de Chouli EPI a montré la meilleure activité contre AchE et BchE, cette activité élevée pourrait être liée sa teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes. Les valeurs d'IC₅₀ des extraits éthanoïques d'Egypte se sont situées entre 360-600µg/ml contre AchE [128], la comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature sur la propolis égyptienne, suggère que notre propolis a une meilleure activité inhibitrice contre l'enzyme AChE.

IV. Effets de la propolis sur la prolifération des lymphocytes :

Les résultats de la réponse proliférative cellulaire (indice de stimulation SI) des lymphocytes des différents extraits de la propolis sont présentés dans le tableau 22 :

	EEP-EPB	EEP-EPA	EEP-EPI	EEP-EPE
Con A	175.68 ± 25.34 ^c	175.68 ± 25.34 ^c	175.68 ± 25.34 ^b	175.68 ± 25.34 ^b
Con A + 0.25 mg EEP/mL	189.24 ± 22 ^b	185.44 ± 26.75 ^b	220 ± 23.64 ^c	204 ± 21.87 ^c
Con A + 0.50 mg EEP/mL	198.65 ± 20.51 ^b	192.47 ± 21.47 ^b	243.66 ± 20.74 ^b	240.33 ± 20.08 ^b
Con A + 1 mg EEP/mL	235.33 ± 22.44 ^a	228 ± 20.62 ^a	365 ± 30.21 ^a	344 ± 28.75 ^a
Con A + 2 mg EEP/mL	100.98 ± 28.54 ^c	89.31 ± 22 ^c	105.33 ± 35.07 ^d	101.85 ± 30.26 ^d
P ANOVA	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Tableau 27: Réponse proliférative cellulaire (indice de stimulation SI) des lymphocytes à différentes concentrations des extraits éthanoloïques de la propolis.

Les valeurs représentent la moyenne ± SD d'essais en trois exemplaires effectués. Con A : mitogène concanavaline A

Les comparaisons multiples ont été effectuées par le test ANOVA à sens unique, suivi du test post hoc de Tukey. Les différences statistiques ($P < 0.01$) ont été représentées par différentes lettres (a, b, c, d), la lettre a représentant la valeur la plus élevée.

Les cellules témoins exposées à la Con A (facteur mitogène) seule présentaient un indice de stimulation de base d'environ 175,68. Au fur et à mesure que les concentrations en extrait éthanoloïque de la propolis augmentaient (de 0,25 mg/mL à 1 mg/mL), l'indice de stimulation SI augmentait généralement pour les quatre extraits étudiés. L'indice de stimulation le plus élevé a été enregistré avec 1 mg/mL d'extrait éthanoloïque de la propolis, ce qui montre une réponse proliférative lymphocytaire plus forte pour tous les types de propolis. Entre 0,25 mg/mL et 1 mg/mL, les extraits de propolis EPI (Chouli) et EPE (Elouret) ont entraîné une plus forte activation de la prolifération lymphocytaire que les extraits EPB (Benisnous) et EPA (Chetouan). Cependant, à 2 mg/mL, il y a eu une diminution marquée de la prolifération des lymphocytes, ce qui suggère un effet inhibiteur potentiel à des concentrations plus élevées, quel que soit l'extrait de propolis.

Notre présente étude a démontré que les extraits éthanoloïques de propolis (EEP) des différentes régions de la wilaya de Tlemcen modulent la prolifération des lymphocytes et les défenses antioxydante de manière dose-dépendante. Nos résultats indiquent que nos échantillons, dans une gamme de concentrations de 0,25 à 1 mg/mL, augmente la prolifération des lymphocytes, la protection oxydative et la défense antioxydante, avec des réponses optimales observées à 1 mg/mL. Plus précisément, l'indice de stimulation des lymphocytes a augmenté progressivement de 0,25 à 1 mg/mL d'EEP pour les quatre extraits de propolis

testés, ce qui suggère que l'EEP peut favoriser l'activation des cellules immunitaires. Il a été démontré que la propolis induit la production de la cytokine IL-2 dans les lymphocytes, stimulant ainsi l'activation des cellules T.5 Cependant, à une concentration élevée (2 mg/mL), nous avons observé une diminution marquée de la prolifération, ce qui indique que la propolis peut exercer un effet inhibiteur sur l'activité des lymphocytes. Cette réponse biphasique est en accord avec d'autres résultats qui ont montré que la faible concentration de propolis a un effet stimulant sur la réponse immunitaire des lymphocytes T, tandis que la forte concentration induit des cellules apoptotiques [129].

Effets in vitro de sur le statut redox des lymphocytes :

La figure 75 et le tableau 28 présentent les marqueurs du stress oxydatif intracellulaire dans les lymphocytes exposés à différentes concentrations d'extraits éthanoïques de propolis. Les niveaux de malondialdéhyde (MDA) et de protéines carbonylées (CARP) des lymphocytes ont généralement diminué à mesure que la concentration des extraits éthanoïques de la propolis augmentait jusqu'à 1 mg/mL, ce qui indique une réduction de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines, quel que soit l'extrait de propolis. Cependant, à 2 mg/mL, les niveaux de MDA et de CARP augmentent de manière significative, suggérant que le stress oxydatif peut augmenter à des concentrations plus élevées d'EEP. Les extraits de propolis EPI et EPE ont entraîné des dommages oxydatifs plus importants à cette concentration plus élevée que les extraits EPB et EPA. La libération de monoxyde d'azote par les lymphocytes a diminué à mesure que la concentration d'EEP augmentait jusqu'à 1 mg/mL, quel que soit l'extrait de propolis, à 2mg/mL les niveaux d'oxyde nitrique augmentent significativement pour tous les extraits, à cette concentration élevée, l'EPI et l'EPA ont induit la plus forte libération d'oxyde nitrique par les lymphocytes. Les niveaux de glutathion réduit (GSH) des lymphocytes et l'activité de la catalase ont augmenté avec l'augmentation de la concentration des extraits de la propolis, atteignant un pic à 1 mg/mL, indiquant une défense antioxydante renforcée, quel que soit l'extrait de propolis. Cependant, à 2 mg/mL, les niveaux de GSH et l'activité catalase ont diminué de manière significative, suggérant une réduction de la capacité antioxydante à des doses plus élevées.

	EPE	EPC	EPB	EPA
MDA (nM/10⁶ cells)				
Con A	3.75 ± 0.38	3.75 ± 0.38	3.75 ± 0.38	3.75 ± 0.38
Con A + 0.25 mg EEP/mL	3.69 ± 0.21	3.54 ± 0.34	3.77 ± 0.37	3.66 ± 0.29
Con A + 0.50 mg EEP/mL	3.49 ± 0.27	3.36 ± 0.23	3.39 ± 0.21	3.32 ± 0.32
Con A + 1 mg EEP/mL	2.19 ± 0.19	2.21 ± 0.24	2.34 ± 0.36	2.41 ± 0.12
Con A + 2 mg EEP/mL	5.78 ± 0.30	5.41 ± 0.27	4.55 ± 0.31	4.66 ± 0.28
CARP (nM/10⁶ cells)				
Con A	2.88 ± 0.25	2.88 ± 0.25	2.88 ± 0.25	2.88 ± 0.25
Con A + 0.25 mg EEP/mL	2.98 ± 0.35	2.89 ± 0.23	2.87 ± 0.32	2.85 ± 0.34
Con A + 0.50 mg EEP/mL	2.53 ± 0.22	2.55 ± 0.16	2.61 ± 0.11	2.58 ± 0.19
Con A + 1 mg EEP/mL	2.14 ± 0.23	2.11 ± 0.13	2.19 ± 0.19	2.20 ± 0.11
Con A + 2 mg EEP/mL	3.66 ± 0.21	3.54 ± 0.25	3.87 ± 0.22	3.95 ± 0.19
GSH (nM/10⁶ cells)				
Con A	22.63 ± 1.58	22.63 ± 1.58	22.63 ± 1.58	22.63 ± 1.58
Con A + 0.25 mg EEP/mL	33.45 ± 1.32	30.22 ± 1.21	26.34 ± 1.20	27.55 ± 1.11
Con A + 0.50 mg EEP/mL	45.66 ± 1.56	47.43 ± 1.32	35.88 ± 1.21	38.79 ± 1.19
Con A + 1 mg EEP/mL	50.15 ± 1.33	53.55 ± 1.31	42.78 ± 1.34	44.78 ± 1.26

Con A + 2 mg EEP/mL	14.98± 1.29	15.73 ± 1.19	17.56 ± 1.37	16.95 ± 1.15
Catalase (U/10⁶ cells)				
Con A	34.07 ± 2.11	34.07 ± 2.11	34.07 ± 2.11	34.07 ± 2.11
Con A + 0.25 mg EEP/mL	46.98± 2.08	45.76 ± 2.01	43.65 ± 1.98	42.76 ± 1.09
Con A + 0.50 mg EEP/mL	55.99 ± 2.12	52.89 ± 2.04	46.09 ± 2.14	45.99 ± 1.10
Con A + 1 mg EEP/mL	60.78 ± 2.06	58.89 ± 2.11	48.15 ± 1.09	47.89 ± 1.94
Con A + 2 mg EEP/mL	24.91 ± 2.05	22.65 ± 1.79	24.78 ± 2.11	25.08 ± 1.87
Nitric oxide release (nM/10⁶ cells)				
Con A	26.64 ± 1.77	26.64 ± 1.77	26.64 ± 1.77	26.64 ± 1.77
Con A + 0.25 mg EEP/mL	21.98± 1.65	22.47 ±1.75	24.24 ±1.27	24.32 ± 1.12
Con A + 0.50 mg EEP/mL	18.48±1.55	17.62 ±1.39	20.39 ±1.63	21.81±1.22
Con A + 1 mg EEP/mL	16.15± 1.43	15.56 ±1.05	19.09 ±1.21	19.22 ±1.13
Con A + 2 mg EEP/mL	30.76 ± 1.56	33.93 ± 1.43	28.99 ± 1.40	29.93 ± 1.08

Tableau 28 : Marqueurs de stress oxydatif intracellulaire des PBMC en présence de différentes concentrations d'extraits d'éthanol de la propolis.

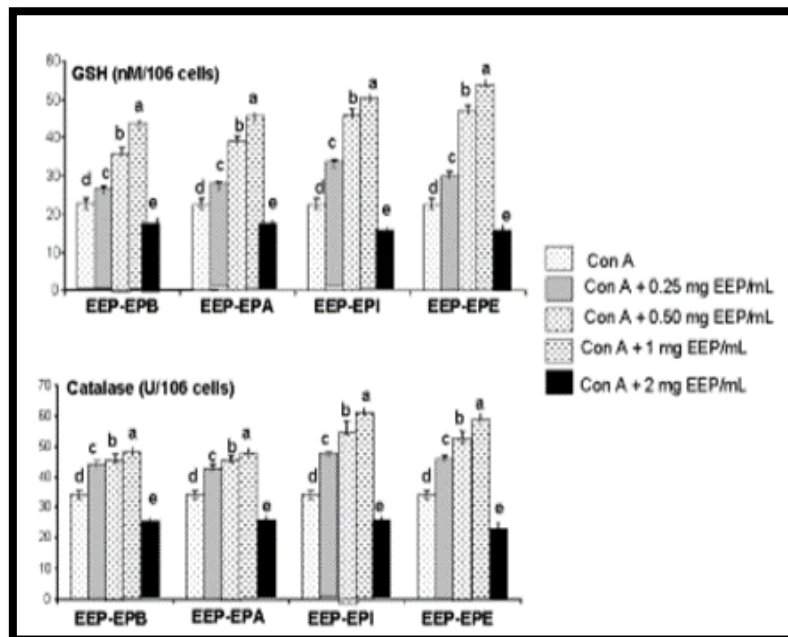
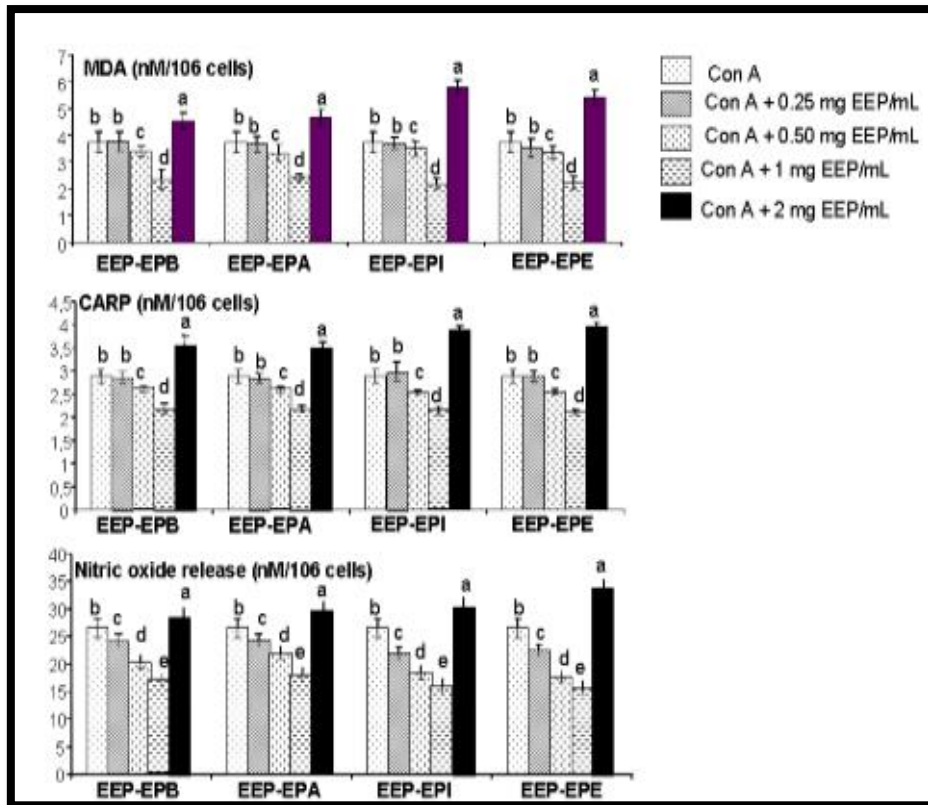


Figure 67: Marqueurs de stress oxydatif et marqueurs antioxydants des lymphocytes exposés à différentes concentrations d'extraits éthanøiques de propolis.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD d'essais en trois exemplaires. Les comparaisons multiples ont été effectuées par le test ANOVA à sens unique, suivi du test post hoc de Tukey. Les différences statistiques ($P < 0.01$) ont été représentées par différentes lettres (a, b, c, d), la lettre a représentant la valeur la plus élevée.

Les marqueurs du stress oxydatif : le malondialdéhyde (MDA) et les protéines carbonylées (CARP) ont généralement diminué à mesure que les concentrations des extraits éthanoliques de la propolis augmentaient jusqu'à 1 mg/mL, quel que soit le type de la propolis, cette réduction indique un effet protecteur contre la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines, contribuant probablement à l'amélioration de la fonction lymphocytaire à des concentrations modérées. Cependant, à 2 mg/mL, les niveaux de MDA et de CARP ont augmenté de manière significative, en particulier dans les extraits EPI et EPE, ce qui suggère que des concentrations plus élevées des extraits de la propolis peuvent induire un stress oxydatif, ceci est cohérent avec la nature biphasique observée dans d'autres extraits de plantes, où les effets antioxydants prédominent à des concentrations plus faibles mais passent à des effets pro-oxydants à des doses plus élevées. L'effet paradoxal de doses plus élevées ou plus faibles d'antioxydants est bien documenté [130].

Des données antérieures confirment que les composants de la propolis peuvent avoir des propriétés à la fois pro-oxydantes et antioxydante [131]. En outre, les défenses antioxydante des lymphocytes, représentées par les niveaux de glutathion réduit (GSH) et l'activité de la catalase, ont atteint leur maximum à 1 mg/mL des extraits éthanoliques de la propolis, confirmant une protection accrue contre les dommages oxydatifs. Comme pour la prolifération, ces marqueurs antioxydants ont diminué à 2 mg/mL, ce qui suggère une limite supérieure aux effets bénéfiques des EEP sur les systèmes antioxydants cellulaires. Ces résultats impliquent que la propolis exerce un effet hormétique, où des doses faibles à modérées sont bénéfiques, mais des doses plus élevées peuvent dépasser la capacité antioxydante cellulaire. Il existe de nombreux rapports concernant le potentiel antioxydant de l'extrait d'éthanol de la propolis. Compte tenu de nos

résultats et des résultats précédents, il est possible d'affirmer que l'activité antioxydante de la propolis est corrélée à son profil phytochimique, en particulier les polyphénols et les flavonoïdes [133][134][135][136]. Plusieurs composés bioactifs de la propolis ont montré une réponse diphasique à la dose et sont considérés comme des composés hermétiques, ce qui suggère que les composés phénoliques peuvent avoir des effets à la fois antioxydants et pro-oxydants en fonction de la concentration, ce qui confirme nos résultats [137]. Les doses plus élevées de composés poly phénoliques ont eu des effets pro-oxydants, potentiellement dus à l'autoxydation des polyphénols ou à une surcharge cellulaire des défenses antioxydante.

La diminution de la libération d'oxyde nitrique (NO) à des concentrations allant jusqu'à 1 mg/mL suggère une réduction des médiateurs inflammatoires, ce qui soutient le potentiel anti-inflammatoire de la propolis à des doses modérées. En revanche, l'augmentation des niveaux de NO à 2 mg/mL, notamment avec les extraits d'EPI et d'EPA, indique un changement pro-inflammatoire, cohérent avec l'augmentation du stress oxydatif à cette dose plus élevée. Il a été démontré que les extraits de propolis diminuent l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS) et la production de NO liée à l'inhibition de la voie NF-Kb[138].

Partie III. Etude comparative de l'activité biologique des extraits de la propolis et le complexe propolis/ β -cyclodextrine

Dans cette partie, nous avons préparé des complexes d'inclusion de l'extrait éthanolique de la propolis de différentes régions de la wilaya de Tlemcen en β -cyclodextrine et évaluer leur activité antioxydante à l'aide de deux méthodes (test de blanchiment du β -carotène et DPPH et) et étudié l'effet de la combinaison de ces complexes d'inclusion contre les souches pathogènes : *E.Coli*, *P.aeruginae*, *S.aureus*, *E.feacalis*, *K.pneumoniae*, *Cand10231* et *Cand2679* par la méthode de diffusion du disque.

Nous avons déjà décrit les protocoles d'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne dans la partie précédente.

1. Matériels et méthodes :

Préparation des complexes d'inclusion extrait-Cyclodextrine en mode solide :

Dans cette étude, l'extrait sec éthanoïque de propolis a été utilisé pour préparer un mélange physique à rapport massique 1:1 avec la β -cyclodextrine, le mélange physique a été pétri pendant une heure avec un pilon pour obtenir une pâte, deux gouttes d'éthanol ont été ajoutées pour homogénéiser le mélange, et le mélange a été stocké à la température ambiante loin de la lumière jusqu'à l'évaluation de l'activité biologique.

Le choix d'un rapport massique 1:1 (extrait de propolis / β -cyclodextrine) pour la préparation des complexes d'inclusion a été guidé par plusieurs considérations issues de la littérature (plusieurs études ont utilisé un rapport massique 1:1 pour la complexation d'extraits de propolis avec la β -cyclodextrine).

D'une part, la β -cyclodextrine possède une cavité hydrophobe de dimension adaptée à l'encapsulation de molécules aromatiques de type flavonoïdes et acides phénoliques, dont le poids moléculaire est généralement compris entre 250 et 350 g/mol, un rapport 1:1 est classiquement utilisé pour assurer une complexation stœchiométrique lorsque l'hôte et l'invité sont de tailles compatibles.

D'autre part, plusieurs études antérieures sur la complexation d'extraits naturels (propolis, polyphénols de plantes) avec la β -cyclodextrine ont rapporté que le rapport 1:1 permet d'obtenir un bon équilibre entre efficacité d'encapsulation et activité biologique résiduelle.

Nous considérons ce rapport comme un point de départ. Une optimisation plus fine (par exemple par des rapports 1:2 ou 2:1) pourrait être envisagée dans des études ultérieures pour améliorer encore l'activité biologique

Notre objectif principal était de comparer l'activité biologique des extraits de propolis seuls versus sous forme de complexes, le choix d'un rapport 1:1 permet de :

- ✓ Standardiser la préparation des complexes pour l'ensemble des cinq extraits.
- ✓ Observer un éventuel effet de la complexation (diminution ou augmentation de l'activité) sans biais lié à un excès massif de cyclodextrine.
- ✓ Proposer une formulation de base pouvant faire l'objet d'optimisations ultérieures (variation du rapport, type de cyclodextrine, méthode de préparation).

2. Résultats et discussion :

I. Résultats de l'activité antioxydante des complexes d'inclusion extrait EPE/ β -Cyclodextrine :

Les résultats de l'activité antioxydante par le test de blanchiment du β -carotène et DPPH sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Complexe d'inclusion	IC ₅₀ (μ g/ml)				Extraits de la propolis (référence)
	DPPH	β -carotene	DPPH	β -carotene	
EPB/ β -CD	67.63	28.47	58.24	16.91	EPB
EPA/ β -CD	63.62	27.36	55.89	16.65	EPA
EPI/ β -CD	62.50	26.12	53.76	16.12	EPI
EPE/ β -CD	62.99	26.22	54.76	16.52	EPE

Tableau 29: Les valeurs d'IC₅₀ des extraits de propolis et des complexes d'inclusion EEP/ β -CD.

Selon les résultats obtenus par la méthode DPPH et β -carotène, tous les échantillons ont montré une activité antioxydante. Concernant les complexes d'inclusion préparés à partir des extraits éthanoïques de la propolis avec la β -cyclodextrine, les valeurs de l'IC₅₀ variaient entre 62,50 μ g/ml et 67,63 μ g/ml, le complexe d'inclusion EPI/ β -CD ayant montré la meilleure activité

(IC₅₀ = 62,50 μ g/ml suivi par EPE/ β -CD, EPA/ β -CD et EPB/ β -CD (62.99, 63.62 et 67.63 μ g/ml, respectivement).

La meilleure activité antioxydante par la méthode du blanchiment du β -carotène a été obtenue par le complexe EPI/CD avec IC₅₀=26,12 μ g/ml, suivi par les complexes EPE/ β -CD, EPA/ β -CD et EPB/ β -CD avec IC₅₀= 26,22, 27,36 et 28,47 μ g/ml, respectivement, les résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par la méthode du DPPH.

En comparant les résultats des extraits éthanoïques EEP avec ceux des complexes d'inclusion, nous avons observé une augmentation des valeurs de l'IC₅₀ qui signifie une diminution de

l'activité antioxydante. Selon la littérature l'activité antioxydante des extraits de propolis et des extraits de Propolis encapsulés dans la β -cyclodextrine a été évalué, l'extrait de propolis avait d'excellentes propriétés antioxydante (absorbance relative du résidu <10%) avec un taux de réaction relativement plus élevé, par rapport aux EEP/ β -CD qui avaient un taux de consommation de DPPH plus faible, probablement en raison de la libération moindre de flavonoïdes provenant de la cavité de la β -cyclodextrine [138]. Cette diminution peut s'expliquer par le mécanisme même de la complexation, la β -cyclodextrine, grâce à sa cavité hydrophobe, encapsule les molécules bioactives, cette inclusion réduit temporairement la disponibilité des groupements fonctionnels actifs, qui sont essentiels pour le piégeage des radicaux libres, En d'autres termes, les molécules antioxydantes deviennent moins accessibles au radical DPPH° ou aux espèces radicalaires générées lors de la peroxydation de l'acide linoléique.

II. Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des complexes d'inclusion extrait EPE/ β -Cyclodextrine

Après incubation de 24 heures à 37 °C, nous avons obtenu les résultats suivants comme indiqué dans le tableau :

Souches bactérienne	Diamètre d'inhibition (mm) des échantillons ID								
	Extraits de la propolis (Référence)				Complexes d'inclusion EEP/ β -CD				
	EPB	EPA	EPI	EPE	β -CD	EPB/ β -CD	EPA/ β -CD	EPI/ β -CD	EPE/ β -CD
<i>E.coli</i>	6	7	7	6	NI	6	6	6	6
<i>P.aeruginae</i>	8	8	9	8	NI	6	6	6	6
<i>S.aureus</i>	15	21	25	25	NI	10	16	18	17
<i>E.feacalis</i>	12	13	13	12	NI	8	8	9	8
<i>K.pneumonia</i>	8	8	8	8	NI	6	6	6	6
<i>Cand10231</i>	9	9	9	9	NI	6	6	6	6
<i>Cand 2679</i>	6	6	7	6	NI	6	6	6	6

Tableau 30: Le diamètre d'inhibition des extraits et complexes extraits/ β -CD.

NI : pas d'inhibition

Les complexes d'inclusion EEP/ β -CD ont montré une activité antibactérienne plus élevée contre *S.aureus*, une inhibition modérée contre (*E.feacalis*) et une faible activité antibactérienne et antifongique contre les bactéries gram-négatives (*E.coli*, *K.pneumoniae* et *P.aeruginae*) et les levures (*Candida Albican10231* et *Candida Albican2679*). En comparant les résultats des extraits de propolis EEP et des complexes d'inclusion EEP/ β -CD présentés dans le tableau, nous avons constaté une diminution des diamètres d'inhibition, qui prouve que la complexation de propolis avec la β -cyclodextrine diminue l'activité antibactérienne et antifongique.

Une étude a été réalisée par Moreira et al, ils ont évalué l'activité antimicrobienne et antifongique de l'extrait éthanoïque de la propolis EEP et du complexe de propolis/ β -CD, contre les souches orales (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans* et *C. albicans*), les résultats ont montré que le complexe propolis/ β -CD était très actifs contre *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.mutans* et *C.albicans*, avec des concentrations inhibitrices minimales (CMI) entre 32 et 256 $\mu\text{g/mL}$, l'extrait de propolis rouge seul a montré la meilleure activité contre toutes les souches microbiennes avec CMI entre 8 et 64 $\mu\text{g/ml}$ [139]. Notre étude actuelle et celle de Moreira montrent que la complexation de la propolis avec la β -cyclodextrine diminue son activité antibactérienne, la β -cyclodextrine n'a pas montré une activité antibactérienne et antifongique.

La β -cyclodextrine, grâce à sa cavité hydrophobe, forme des complexes d'inclusion avec les composés antibactériens majoritaires de la propolis, notamment les flavonoïdes (chryisine, pinocembrine, pinobanksine) et les acides phénoliques. Cette encapsulation a deux conséquences immédiates sur l'activité antibactérienne, les sites fonctionnels responsables de l'interaction avec la paroi bactérienne, sont temporairement protégés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine, ce qui réduit leur disponibilité pour interagir avec les cibles bactériennes.

En raison de la présence de multiples composants dans la propolis, ses molécules s'engagent en compétition pour créer des complexes d'inclusion avec la cyclodextrine, l'encapsulation entraîne l'entrée des molécules dans la cavité, diminuer leur réactivité et leur interaction avec le milieu extérieur par conséquent une diminution de l'activité biologique, probablement en raison d'une libération plus lente des composés actifs depuis la cavité de la cyclodextrine, il est important de noter que cette diminution n'est pas nécessairement un inconvénient, dans une perspective pharmaceutique, une libération prolongée peut être recherchée pour maintenir une concentration thérapeutique constante dans le temps, réduisant ainsi la fréquence d'administration.

Partie IV. Application en médecine buccodentaire :

I. Formulation pharmaceutique :

Le but de cette étude est de développer notre propre formulation d'un bain de bouche à base de la propolis d'origine algérienne.

Il faut bien noter que le matériel utilisé a été bien stérilisé avant la préparation du produit, car la bonne hygiène est très importante pour une meilleure formulation pharmaceutique. Nous avons contrôlé les caractéristiques organoleptiques (odeur, pH, couleur, le goût, aspect et homogénéité) une fois par deux semaine pendant six mois à température ambiante et pendant six semaines à 45°C, le bain de bouche est conditionné dans une bouteille de 125 ml en verre et en opaque, il doit être conservé à l'abri de la chaleur pour éviter la décomposition des composés bioactifs de la propolis et les huiles essentielles par les conditions environnementales (lumière et chaleur).

Le bain de bouche préparé est sous forme d'une solution liquide de couleur marron foncée, d'odeur aromatique et agréable et du goût d'un mélange de citron et de la lavande qui donne une sensation de Fraicheur dans la cavité buccale.

I.1. Mode de préparation :

Ce bain de bouche classique est une solution hydro alcoolisée, composé généralement de propolis et des huiles essentielles, il va compléter l'action du dentifrice avec son odeur agréable de la propolis il a un rôle rafraîchissant qui permet une meilleure santé bucco-dentaire.

Préparation :

Phase A :

Eau distillée

Propolis (poudre) : 4%

Fleurs de la lavande : 3%

Bicarbonate de sodium : 2%

Benzoate de sodium : 0.5%

β - cyclodextrine : 0.5%

Phase B :

Ethanol 96° : 4%

Huiles essentielles (HE) :

HE de clou de girofle : 0.1%

HE de la lavande : 0.1%

HE de citron : 0.1%

Extrait de propolis : 0.5%

Phase C :

Glycérine végétale : 10%

Acide lactique : stabilisant du pH, on l'ajoute jusqu'à l'obtention d'un pH neutre (pH=7), dans notre cas nous avons choisi un pH neutre pour obtenir un bain de bouche prêt à l'emploi sans dilution, on peut le diminuer encore pour obtenir une solution de bain de bouche concentrée à utiliser après dilution.

Nous avons mélangé les ingrédients de la phase **A** dans un flacon en verre (un erlenmeyer) en agitant la solution pendant une heure, ensuite nous avons dilué l'extrait de propolis dans l'éthanol 96° à 40°C nous avons laissé ce mélange se refroidir, après nous avons ajouté les huiles essentielles pour les diluer dans l'alcool en agitant à l'aide d'un barreau magnétique pendant deux heures pour une bonne homogénéisation (forte agitation), à la fin nous avons mélangé les deux phases **A** et **B** ensuite nous avons ajouté la phase **C**, nous avons laissé la solution préparée pendant deux semaines sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière après nous l'avons filtré soigneusement, pour éliminer la propolis poudre et récupérer une solution de bain de bouche de couleur marron.

II. Contrôle des caractéristiques physiques du bain de bouche :

Nous avons contrôlé les caractéristiques du bain de bouche préparé à partir de la propolis (odeur, pH, couleur, le goût, aspect et homogénéité) pendant six semaines à 45°C qui est équivalent de six mois à température ambiante, ce qu'on appelle le test de vieillissement accéléré, nous avons laissé un échantillon à température ambiante comme témoins et les résultats d'évolution des caractéristiques sont représentés dans les tableaux suivants :

Semaine	Couleur	Odeur	Aspect	pH	Homogénéité
S1	Marron	Agréable	Liquide	7.4	Homogène
S2					
S3	Identique	Identique	Identique	Identique	Identique
S4	à la	à la	à la	à la	à la
S5	première	première	première	première	première
S6	semaine	semaine	semaine	semaine	semaine

Tableau 31: L'évolution des caractéristiques physiques du bain de bouche préparé à 45°C.

Semaine et mois	Couleur	Odeur	Aspect	pH	Homogénéité
S1	Marron	Agréable	Liquide	7.4	Homogène
S2					
S3					
S4					
Mois 2	Identique	Identique	Identique	Identique	Identique
Mois 3	à la	à la	à la	à la	à la
Mois 4	première	première	première	première	première
Mois 5	semaine	semaine	semaine	semaine	semaine
Mois 6					

Tableau 32: L'évolution des caractéristiques physiques du bain de bouche à température ambiante.

D'après les observations au cours du contrôle des caractéristiques physiques du bain de bouche, aucune modification n'a été observée que ce soit pendant les six semaines à 45°C ou à température ambiante, donc on peut dire que la durée de stabilité de notre produit peut être estimée jusqu'à 15-18 mois.

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne du bain de bouche :

Souches utilisées :

Le test antimicrobien a été réalisé contre trois micro-organismes à Gram positive : *S.aureus-SARM*, *S.aureus-MSSA* et *S.pyogenes*.

Travail effectué

Propolis

L'activité antimicrobienne a été évalué par la méthode de diffusion sur disque (le protocole a été déjà décrit dans la **partie III**), 20µl de la solution préparée du bain de bouche a été imprégnée sur un disque de papier stérile de 6 mm de diamètre et il a été placé sur la gélose, les boîtes de pétri ont été laissées 30 minutes à température ambiante pour la diffusion des solutions avant d'être incubées pendant 24 heures à 37°C.

Détermination du diamètre d'inhibition :

Les résultats de l'activité sont présentés dans le tableau suivant :

Micro-organismes testés	Diamètre d'inhibition DI (mm)
S.aureus-SARM	33±0.01
S.aureus-MSSA	31±0.03
S.pyogenes	30±0.01

Tableau 33: Diamètre d'inhibition du bain de bouche contre des micro-organismes.

Comme indiqué dans le tableau 32, la formulation préparée à partir de la propolis sous forme de bain de bouche a présenté une zone d'inhibition importante contre le *S.aureus-MRSA* (33 mm) et *S.aureus-MSSA* (30mm), en outre elle a montré la plus grande zone d'inhibition (40 mm) contre le *S.pyogenes*.

La formulation préparée à partir de la propolis qui est riche en composés bioactifs tels que l'acide cinnamique, l'acide chlorogénique, Quercétine, Chrysin, Pinocembrine...etc. et à partir des huiles essentielles (de la lavande, de clou de girofle et du citronnelle) semble efficace et montre une bonne activité antimicrobienne contre l'ensemble des souches sélectionnées.

Plumbago europaea

***Partie I : préparation de l'extrait et détermination
de sa composition chimique.***

Partie II : évaluation de l'activité biologique.

Partie I : préparation de l'extrait et détermination de sa composition chimique :

1. Matériels et méthodes :

Réactifs chimiques utilisés : Hexane.

Appareillage : la chromatographie en phase gazeuse Perkin Elmer Auto system XL

Cette partie a comme objectif :

- Préparation d'un extrait hexanoïque à partir des racines d'une plante (*Plumbago europaea*).
- Détermination de la composition chimique de l'extrait préparé par CPG et CPG/MS.

I. Récolte de la matière première :

Les racines du *P.europaea* ont récoltées en mois de Septembre (au stade de floraison) en 2022 au niveau de la wilaya de Tlemcen (dans la région d'Ain El Houtz), la plante a été identifiée botaniquement au niveau de laboratoire d'écologie et de gestion des écosystèmes à l'Université de Tlemcen.

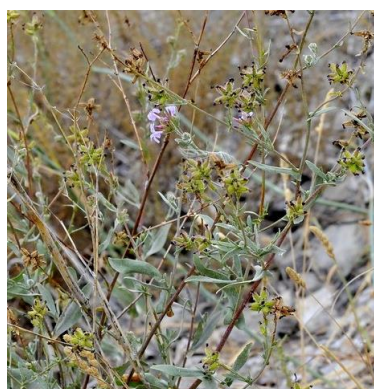


Figure 68:Plumbago.europaea.

II. Préparation de l'extrait :

100 g des racines séchées de *P. europaea* ont été placées dans un erlenmeyer contenant 500 ml d'hexane, macérées pendant une semaine à température ambiante, le mélange a été filtré et évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pour éliminer l'hexane, l'extrait obtenu a été conservé dans un flacon en verre opaque à une température de 4 °C à l'abri de la lumière.

III. Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CG) et par spectrométrie de masse (CG/SM) :

L'analyse a été réalisée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse Perkin Elmer Auto system XL, équipée de deux colonnes capillaires (60 m de long, 0,22 mm de diamètre interne et une épaisseur de film de 0,25 µm). La température du four a été programmée pour passer progressivement de 60 °C à 220 °C à un taux de 2 °C/min, puis maintenue à 230 °C pendant 35 minutes, les températures de l'injecteur et du détecteur ont été réglées à 280 °C, avec un volume d'injection de 0,1 µL.

L'analyse CPG/MS a été réalisée avec un détecteur de masse Perkin Elmer Turbo, couplé au système Auto XL, équipé de colonnes capillaires en silice fondue, la température de la source d'ions était de 150 °C, l'énergie d'ionisation (IE) était de 70 eV et les spectres de masse ont été enregistrés dans une plage de 35 à 350 Da. Les composés ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention et leurs spectres de masse avec des bibliothèques commerciales.

Partie II. Evaluation de l'activité biologique :

Réactifs chimiques utilisés : La gentamicine, l'amphotéricine B, l'albumine, tampon phosphaté (pH 6,4), solution saline de phosphate tamponnée stérile (pH 7,4), diclofénac sodique.

Appareillage : Centrifugeuse, Spectrophotomètre UV.

Souches bactériennes et fongiques utilisées :

Cette étude a porté sur sept souches bactériennes : *Escherichia coli* (ATCC 25912), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), ainsi que deux souches de levures : *Candida albicans* (ATCC 26790) et *Candida albicans* (ATCC 10231). Pour les tests bactériologiques, on a utilisé l'agar de Mueller-Hinton, tandis que l'agar de Sabouraud enrichi avec 2 % de glucose, a été utilisé pour les cultures de levures.

Remarque : Une quantité du sang a été prélevée d'un donneur sain: la quantité du sang prélevée a été mise dans une sonde contenant de l'héparine pour l'évaluation de l'activité hémolytique.

Cette partie se focalise sur :

- L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf.

- L'évaluation de l'activité hémolytique *in vitro*.

Travail effectué

Plumbago.europaea

I. Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique :

a. Par la méthode de disque :

La méthode de diffusion de disque a été réalisée selon les lignes directrices du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [140].

Procédure :

Les surfaces des milieux ont été inoculées avec les micro-organismes sélectionnés à l'aide d'un tampon stérile, et l'inoculum a été laissé sécher, des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre ont ensuite été imprégnés avec 10 µl d'extrait d'hexane et placés sur les plaques inoculées. Les plaques ont été incubées à 37 °C pour les bactéries et à 28 °C pour la levure pendant 24 heures. La gentamicine (10 µg/disque) et l'amphotéricine B (10 mg/disque) ont été utilisées comme témoins positifs pour les tests antibactériens et antifongiques, respectivement.

b. Détermination des concentrations inhibitrices minimales CMI :

Les concentrations inhibitrices minimales CMI ont été déterminées en utilisant la méthode des microplaques (96 puits).

Procédure :

100 µl de chaque inoculum ont été préparés (5 10⁵ UFC/ml pour les bactéries et 1 à 5 10⁴ UFC/ml pour les levures). Ensuite, 100 µl de bouillon stérile ont été ajoutés à chaque rangée de microplaque. Après, 100 µl de l'extrait ont été introduits dans le premier puits de chaque rangée, un mélange de 100 µl ont été transférés du premier puits au second et ainsi de suite jusqu'au dixième puits, après les 100 µl restants ont été retirés, ce qui a permis d'obtenir une dilution en série 1:2. Enfin, 100 µl de chaque inoculum ont été ajoutés à chaque puits. Les deux derniers puits ont été utilisés comme témoins négatifs : le onzième contenait uniquement le milieu et l'inoculum, tandis que le douzième contenait uniquement le milieu. Les Microplaques ont été scellées et incubées à 37 °C pour les bactéries et à 28 °C pour la levure pendant 20 heures. Chaque essai a été effectué en triple. CMI a été définie comme la plus faible concentration d'extrait qui inhibe la croissance visible des micro-organismes.

II. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*) :

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'hexane de *P. europaea* a été évaluée à l'aide de la méthode de dénaturation de l'albumine.

Procédure :

Brièvement, on a préparé un volume total de 5 ml, composé de 0,2 ml d'albumine d'œuf, de 2,8 ml de tampon phosphaté (pH 6,4) et de 2 ml de l'extrait à des concentrations allant de 10 à 40 µg/ml. La solution de contrôle a été préparée en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes, puis chauffés à 70 °C pendant 5 minutes dans un bain d'eau. Après refroidissement, les mesures d'absorbance ont été prises à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV. Le diclofénac sodique a été utilisé comme médicament de référence et soumis aux mêmes conditions expérimentales pour la comparaison des absorbances. Le pourcentage de la dénaturation des protéines a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [A_t / A_c - 1] \times 100.$$

Avec:

Ac = absorbance à 660 nm du contrôle.

At = absorbance à 660 nm de l'échantillon.

III. Evaluation de l'activité hémolytique :

L'activité hémolytique a été réalisée en utilisant la méthode décrite par Li et Liu [141].

Procédure :

Le sang prélevé a été centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le plasma a été prélevé et les globules rouges restants ont été lavés trois fois avec une solution saline de phosphate tamponnée stérile (pH 7,4), avant d'être re-suspendus pour obtenir une suspension à 0,05 %. Dans des tubes d'hémolyse, 990 µL de cette suspension érythrocytaire ont été mélangés avec 10 µL d'extrait à différentes concentrations (200 à 1000 µg/mL). Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant une heure, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 548 nm pour évaluer la concentration d'hémoglobine libre. Des témoins négatifs et positifs ont été utilisés pour établir les niveaux de référence de l'hémolyse.

2. Résultats et discussion :

I. Détermination du rendement et la composition chimique de l'extrait hexanoïque du *P.europaea* :

Après l'élimination du solvant nous avons récupéré l'extrait hexanoïque des racines de la plante *P.europaea* et nous avons déterminé le rendement d'extraction qui est d'ordre de 1,8 %.

Echantillons	Taux de rendement %
Extrait hexanoïque du <i>P.europaea</i>	1.8

Tableau 34: Rendement d'extraction de l'extrait des racines du *P.europaea*

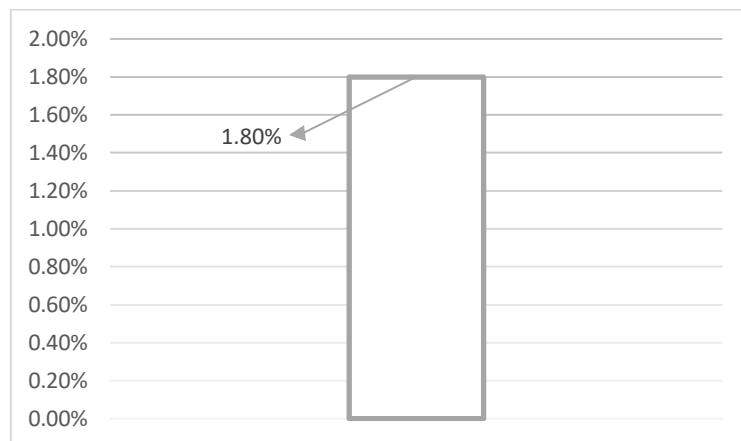


Figure 69: Taux de rendement d'extraction de l'extrait des racines de *P.europaea*.

II. Détermination de la composition chimique de l'extrait hexanoïque du *P.europaea* :

Pour la composition chimique l'analyse CPG et CPG/MS a permis d'enregistrer la présence de neuf composés majoritaires représentant 88,8% de la composition totale, la composition chimique de l'extrait a montré une concentration prédominante de plusieurs composés bioactifs importants, parmi lesquels le Plumbagine est majoritaire 58,4 %, suivi du Nonanal 16,6 %, du Thymol 6,2 % et du Carvacrol 4,5 %.

N°	Composés	Lit/RI ^b	Ria ^c	RI _p ^d	%
1	α-Pinène	931	932	1021	0.5
2	Myrcène	980	976	1160	0.5
3	p-Cymène	1011	1012	1272	0.1
4	Limonène	1020	1023	1197	1.5
5	Linalool	1081	1089	1545	0.5
6	Nonanal	1083	1086	1392	16.6
7	Thymol	1266	1268	2190	6.2
8	Carvacrol	1281	1283	2287	4.5
9	Plumbagine	1580	1601	2823	58.4
% d'identification					88.8
% Monoterpènes oxygénés					0.5
% Monoterpène hydrocarbures					2.6
% Composés phénoliques					10.7
% Naphtoquinones					58.4
% Autres					16.6

Tableau 35: Résultats d'analyse CPG et CPG/MS de l'extrait hexanoïque du *P.europaea*.

b : Indices de rétention sur colonne apolaire issus de la littérature ; c : Indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1 ; d : Indices de rétention sur colonne polaire Rtx-wax.

Une étude a été réalisée par Navaei et *al.* sur l'huile essentielle des racines du *P.europaea*, cette étude a permis l'identification des principaux constituants de l'huile qui étaient la plumbagine 69,1 %, l'acétate de 1-octène-3-yle 9 % et le Limonène 5,7 % [142], Muhammad et *al.* ont montré que le pourcentage de la molécule plumbagine dans l'extrait des racines et celui des feuilles était 1,9 % et 1,5 %, respectivement [143].

Une étude sur l'huile essentielle de la plante *P.europaea* récoltée de la région ouest- algérienne a marqué la présence de la plumbagine comme constituant principal avec un pourcentage de 69.1% [144].

La composition chimique des huiles essentielles extraites des parties aériennes de *P. europaea* était principalement composée de Plumbagine 32,4 %, d'acide hexadécanoïque 13,79 %, d'hénicosane 9,03 % et de 2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol 8,40 % , dans les feuilles, on trouve du Phytol 17,97 %, du

Phtalate de dibutyle 15,45 %, de l'hénicosane 6,91 % et de l'acétone hexahydrofarnésyle 6,72 % [145].

Les variations de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. europaea* peuvent s'expliquer par des différences génétiques, des conditions écologiques ou divers autres éléments tels que la nature du sol et les conditions climatiques qui ont un impact sur la plante [146].

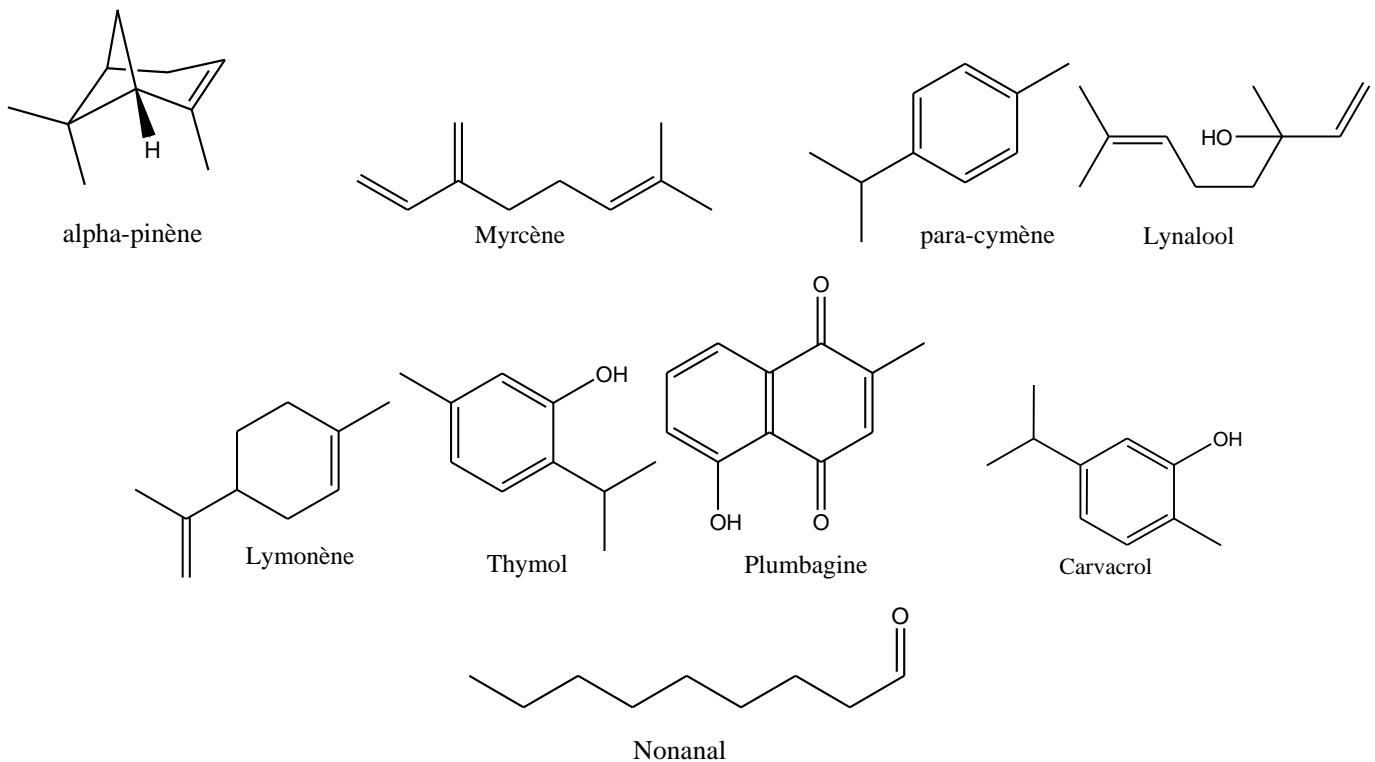


Figure 70: Structure des composés identifiés dans l'extrait hexanoïque du *P.europaea*.

III. Résultats de l'activité antibactérienne :

Les résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion de disque sont représentés dans le *tableau 30*, les diamètres d'inhibition de l'échantillon variaient entre 10 et 35 mm, ce qui indique des différences dans la sensibilité du micro-organisme à l'extrait, les bactéries à Gram-positives se sont révélées plus sensibles que les bactéries à Gram-négatives. Parmi les souches testées, l'inhibition la plus élevée a été observée chez *M. luteus* (35 mm), suivi de *B. cereus* (31,7 mm) et *S. aureus* (30,1 mm).

L'extrait d'hexane a également montré une activité antifongique, l'effet antifongique a été observé sur

C. albicans ATCC 26790 et *C. albicans* ATCC 10231, avec des zones d’inhibition 41 mm et 38 mm, respectivement.

Micro- organismes		Extrait hexanoïque de <i>P.europaea</i>	Gentamicine	Amphotéricine B
Bactérie	<i>S. aureus</i>	30.1±0.78	33.5±0,56	-
Gram- positive	<i>M. luteus</i>	35±0.56	19.5±0.33	-
	<i>L. monocytogenes</i>	15.1±12	12.5±0,57	-
	<i>B. cereus</i>	31.7±0.65	22.5±0.70	-
	Batérie à	<i>E. coli</i>	10.7±0.65	23.2±0,52
Gram- négative	<i>P. aeruginosa</i>	10.5±1.2	25.3±0.33	-
	<i>S. typhimurium</i>	16.5±0.78	26.5±0.33	-
	Levures	<i>C. albicans</i> ATCC 26790	41.2±0.65	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231		38.5±0.33	-	32±0.33

Tableau 36: Zone d'inhibition de l'extrait de *P.europaea*, Gentamicine et l'amphotéricine.

Les CMI ont été déterminés à l’aide de la méthode de micro dilution du puits les résultats sont représentés dans le tableau. Par rapport aux agents antimicrobiens classiques comme la gentamicine et l’amphotéricine B, l’extrait d’hexane de *P. europaea* a montré un effet inhibiteur significatif sur la croissance des micro- Organismes testés.

Micro-organismes		CMI (µg/mL)		
		Extrait	Gent	Amph B
Bactérie à Gram- positive	<i>S. aureus</i>	1.2±0.1	0.56±0.0	-
	<i>M. luteus</i>	6.5±0.6	8.5±0.2	-
	<i>L. monocytogenes</i>	7.5±0.8	8.5±0.2	-
	<i>B. cereus</i>	0.2±0.01	0.6±0.01	-
Bactérie à Gram- négative	<i>E. coli</i>	15±0.5	0.54±0.0	-
	<i>P. aeruginosa</i>	65±0.4	0.54±0.0	-
	<i>S. typhimurium</i>	25±0.6	0.32±0.	-
Levures	<i>C. albicans</i> ATCC 26790	2.5±0.1	-	4±0.0
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	2.5±0.2	-	8±0.0

Tableau 37: Concentration minimale inhibitrice CMI de l'extrait d'hexane, Gentamicine et l'amphotéricine.

L'activité antibactérienne la plus importante de l'extrait d'hexane a été observée contre *M. luteus* avec

Travail effectué

Plumbago.europaea

CMI= 6,5 µg/ml, *L. monocytogenes* avec une CMI= 7,5 µg/ml et *B. cereus* avec une CMI= 0,2 µg/ml, tandis que l'activité antibactérienne modérée à faible a été observée contre d'autres micro-organismes testés. L'extrait d'hexanoïque de *P.europaea* a montré une bonne activité antifongique contre *C. albicans* (ATCC 26790) et *C. albicans* (ATCC 10 231) avec une CMI de 2,5 µg/ml, d'après les résultats obtenus de l'activité antibactérienne, antifongique et l'analyse de la composition chimique de l'extrait, il est clair que son activité antimicrobienne est probablement liée à la forte concentration de Plumbagine (58,4 %), ainsi qu'à la présence de nonanal, de thymol et de carvacrol. Des recherches antérieures ont démontré que la plumbagine présente un large éventail de propriétés pharmacologiques [147][148]. De plus, le thymol et le carvacrol sont deux composés phénoliques bien connus pour leurs puissantes activités antimicrobiennes. Lorsqu'ils sont utilisés ensemble, le thymol et le carvacrol peuvent avoir un effet synergique, améliorant l'efficacité antimicrobienne globale. Cette synergie est particulièrement bénéfique pour surmonter la résistance aux antimicrobiens.

IV. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire :

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'hexane a été évaluée *in vitro* par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf. Les résultats obtenus montrent que cet extrait possède des propriétés anti-inflammatoires significatives avec une IC₅₀= 12,3 µg/mL, environ 2,5 fois supérieure à celle du diclofénac (IC₅₀ = 35,2 µg/mL).

Echantillon	IC ₅₀ µg/ml
Extrait du <i>P.europaea</i>	12.3 ±0.1
Diclofenac	35.2 ±0.2

Tableau 38: Les valeurs d'IC₅₀ de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait et du Diclofenac.

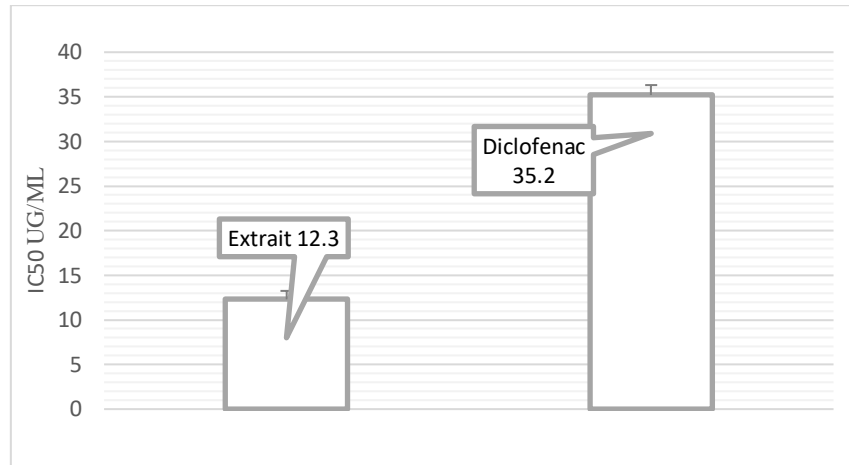


Figure 71: Les valeurs d'IC50 de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait et du diclofenac de sodium.

Ces propriétés sont probablement liées au pourcentage relativement élevé de Plumbagine, de Carvacrol et de Thymol. Il a été démontré que l'administration orale de la Plumbagine a des effets anti-inflammatoires et analgésiques significatifs, tout en impliquant le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) et les cytokines pro-inflammatoires [150][151], la Plumbagine a le pouvoir de réduire de manière significative l'oedème induit par carraghénane des pattes de rat, ainsi que l'action de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et la prostaglandine E2, d'une manière dose-dépendante [152].

Le Thymol possède également des propriétés anti-inflammatoires bien connues, il agit en bloquant les mêmes substances qui provoquent l'inflammation, comme la COX-2 et certaines cytokines [153]. Des études ont montré que le Carvacrol peut calmer l'inflammation en influençant les voies de signalisation, y compris NF-kB, qui est responsable de l'activation des gènes liés à l'inflammation [154].

IV. Les résultats de l'activité hémolytique :

Nous avons effectué un test d'hémolyse sur l'extrait hexanoïque de *P. europaea* pour évaluer leur cytotoxicité, l'activité hémolytique a été évaluée *in vitro* à l'aide d'un modèle d'érythrocytes.

Les pourcentages d'inhibition des différents échantillons ont été enregistrés à des concentrations variables, comme le montre le tableau 39. L'évaluation de la toxicité pour les érythrocytes humains a montré que l'extrait d'hexane de *P.europaea* avait des taux d'hémolyse très faibles, soit 12,86 %, même à des concentrations élevées 1000 µg/mL.

Les résultats obtenus ont montré une toxicité très limitée de cet extrait, même à des concentrations plus élevées et après une période d'incubation de 60 minutes, pour les érythrocytes humains isolées.

Concentration (µg/mL)	% d'hémolyse d'extrait hexanoïque de <i>P.europaea</i>
200	02,33±0,01
400	03,65±0,02
600	6,66±0,02
800	9,69±0,02
1000	12.86±0,06

Tableau 39: Le pourcentage d'hémolyse de l'extrait de P.europaea en fonction de la concentration.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de doctorat s'inscrit dans le cadre de la chimie des substances naturelles appliquée à la recherche pharmaceutique. Son objectif principal était la caractérisation chimique et la valorisation biologique *in vitro* de deux substances naturelles issues de la région de Tlemcen (Algérie) : la propolis, produit apicole complexe, et *Plumbago europaea* L, plante médicinale spontanée. Il s'agissait, d'une part, d'identifier les composés bioactifs majoritaires de ces matrices, d'autre part, d'évaluer leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, neuroprotectrices, immunostimulantes, anti-inflammatoires et hémolytiques, dans une perspective de découverte de nouveaux candidats médicament.

Ce travail de thèse a permis de caractériser chimiquement cinq échantillons de propolis de la région de Tlemcen, en identifiant leurs composés majoritaires (flavonoïdes de type peuplier) et en établissant une corrélation entre la teneur en polyphénols/flavonoïdes et les activités biologiques. Démontrer pour la première fois l'activité anti-cholinestérase des extraits de propolis algérienne provenant de la région de Tlemcen, ouvrant des perspectives dans la prévention des maladies neurodégénératives. Mettre en évidence un effet immunostimulant dose-dépendant (hormétique) des extraits de propolis sur les lymphocytes humains. Formuler un bain de bouche stable à base de propolis, actif contre des souches bactériennes résistantes (SARM). Caractériser l'extrait hexanique de *P. europaea* d'origine algérienne, riche en plumbagine, et démontrer ses puissantes activités antibactériennes, antifongique, anti-inflammatoire et sa faible toxicité hémolytique.

Ainsi, ce travail illustre parfaitement la démarche de la chimie des substances naturelles : de l'extraction et l'identification des composés à l'évaluation de leurs propriétés biologiques *in vitro*, en passant par la formulation préliminaire et la comparaison de deux chimiotypes complémentaires issus d'un même écosystème. Les résultats obtenus constituent une base solide qui ouvrent la porte à plusieurs perspectives, des études *in vivo* ultérieures et pour le développement de nouveaux candidats médicaments d'origine naturelle, dans le respect des principes de la chimie verte et de la valorisation des ressources locales, développer des formulations galéniques optimisées (gels, films buccaux, nanoparticules) pour une meilleure biodisponibilité, isoler la plumbagine à l'échelle semi-préparative et tester son activité sur un panel élargi de bactéries résistantes (y compris les souches cliniques), étudier la possibilité de synthèse ou d'hémisynthèse de dérivés de la plumbagine et les composés de la propolis pour améliorer leur activité et leur stabilité et envisager le dépôt de brevet pour la formulation du bain de bouche à base de propolis, après études cliniques.

Une limite importante de ce travail réside dans l'absence de caractérisation structurale des complexes d'inclusion à l'aide de techniques avancées, ainsi que d'essais de stabilité (thermique, oxydative et

cinétique de dégradation). Ces analyses sont pourtant indispensables pour confirmer de manière non équivoque la formation des complexes et démontrer expérimentalement leur stabilité.

Par conséquent, les résultats présentés doivent être considérés comme préliminaires et constituent une base pour de futurs travaux intégrant à la fois l'évaluation de l'activité biologique et une caractérisation physicochimique approfondie des complexes de β -CD.

REFERENCES BIBILOGRAPHIQUE

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. I.Kizilpınar Temizer, A.Guder, ö.Gençay Celemlı. Botanical origin and antioxidant activities of propolis from the Irano-Turanian region.*Istanbul J Pharm.***2017.**47.107-111.
2. R.S.Carvalho, F.Baltazar, C.Almeida-Aguiar.Propolis : A complex natural product with a plethora biological activities than can be explored for drug development.*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.***2015.**01 .1-29.
3. S.Larbi, L.Hamdi.Etude de synthèse sur les travaux réalisés sur la propolis en Algérie.Thèse de doctorat en vétérinaire, Sous la direction de R.Kaidi.*Université Saad Dahlab Blida-1-***2018.**1-63.
4. W.Golder.Propolis.The bee glue as presented by the graeco-roman literature.*Wurzburg Medizinhist Mit.***2004.**23.133-145.
5. C.Viel, JC, Dore.History and uses of honey, mead and hive products.*Rev Hist Pharm (Paris).***2003.**51.7-20.
6. S.Peycheva,E.Apostolova,P.Gardjeva,Z.Peychev,V.Kokova,A .Angelov,A.Slavov,M.Murdjeva.Effect of Bulgarian propolis on the oral microflora in adolescents with plaque-induced gingivitis .*Brazilian Journal of Pharmacognosy.***2019.**29.271-277.
7. F.Berardini,C.Tunis,A.Coppa,L.Mancini,D.Dreossi,D.Eichert,G.Turco,M.Biasotto,F.Terrasi,N.De Cesare,Q.Hua,V.Levtchenko.Beeswax as dental filling on a neolith human tooth.*PLOS ONE.***2012.**7.1-9.
8. U.Kamble. Use of liquid chromatography for assay of flavonoids as key constituents and antibiotics as trace elements in propolis.Thèse de doctorat, Sous la direction de K.H.Assi, A.R.Paradkar .*Bradford University.***2016.**9-227.
9. A.L.Dudnik.Apithérapie en médecine bucco-dentaire.Thèse de doctorat, Sous la direction de K. Yasukawa, J.Y.Raguin.*Université de Lorraine.* **2017.**16-78.
10. N.Cardinault, M.O.Cayeux, P.Percie du Sert.La propolis : origine, composition et propriétés.*Phytothérapie.***2012.**10.298-304.
11. F.C.Lavina, B.C.Macedo, B.L.Sà.F.Amaral, R.A.Silver, M.B.Azevedo, A.Vierra, S.Domingos, B.Vermelhos, S.Carneiro, A.Rodrigues. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis : promising sources of biologically active compounds.*Brazilian Journal of Pharmacognosy.***2019.**29.389-399.
12. D.Wagh.Propolis: A wonder bee's product and its pharmacological Sciences.*Advanced in Pharmacological Sciences.***2013.**13.1-11.
13. V.S.Bankova, S.L.De Castro, M.C.Marcucci, Propolis: Recent advances in chemistry and plants origin.*Apidologie.***2000.**31.3-15.
14. S.Boisard, Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extrait de propolis, Thèse de doctorat en Pharmacochimie, Sous la direction de J.Boustie, F.Tomi.*Université Nante Angers Le Mans.***2014.**9-399.
15. R. Krell. Value-Added products from beekeeping. *FAO Agricultural services.***1996.**124.
16. M.Gharbi. Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles –Composition Propriétés thérapeutiques Apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de docteur.*Université de Claude Bernard, Lyon I. France.***2011.**1-82.
17. A.Arvoet-Grand,B. Vennat, A. Pourrat ,P. Legret. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique.* **1994.** 4 . 462–468.
18. I.Przybyłek, T.M.Karpinski.Anti-bacterial Properties of Propolis.*Molecules.***2019.**24.2-17.
19. H.Shuai, Z.Cui-Ping, W.Kai, G.Q.Li, H.Fu-Liang.Recent advances in the chemical composition of propolis.*Molecule.***2014.**19.19610-19636.
20. M.Popova, I. Chinou, I.Marekov, V. Bankova. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry.* **2009.**70.1262–1271.
21. A.A.Righi, T.R.Alves, G.Negri, L.M.Marques, H. Breyer, A.Salatino. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J. Sci. Food Agric.* **2011.**91.2363–2370.
22. R. Raghukumar, L. Vali, D.Watson, J. Fearnley, V.Seidel. Antimethicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavonones. *Phytother. Res.* **2010.**24.1181–1187.
23. El-Guendouz.S, Lyoussi.B, Miguel.G.M.Insight on propolis from Mediterranean countries: Chemical composition, Biological activities and Application fields.*Chem.Biodiversity.***2019.**16.1-35.
24. Li.F. Awale, S. Tezuka, Y. Esumi, H. Kadota. Study on the Constituents of Mexican Propolis and Their Cytotoxic Activity against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Natural Products.* **2010.**73. 623–627.

25. T.Usia, A.H. Banskota, Y.Tezuka, K. Midorikawa,K. Mat sushige, S. Kadota. Constituents of Chinese Propolis and Their Antiproliferative Activities. *Journal of Natural Products*. **2002**.65.673–676.
26. F.Mainho,J.Antonio Pêgas Henrikes.Red propolis :Chemical composition and pharmacological activity.*Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine*.**2017**.07.591-598
27. A.Petrova, M.Popova, C.Kuzmanova, I.Tsvetkova, H.Naydenski, E.Muli, V.Bankova. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* .**2010**.81.509–514
28. S.Inui, Y. Shimamura, S. Masuda, K.Shirafuji, R.T.Moli, S. Kumazawa. A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**.76.1038–1040
29. N. E. Bayram, K. Sorkun, G. C. Öz, B. Salih, G. Topçu. ‘Chemical characterization of 64 propolis samples from hakkari, Turkey’ .*Rec. Nat. Prod.* **2018**. 12. 569–581
30. M.Popova, B.Trusheva, D.Antonova, S. Cutajar, D.Mifsud, C. Farrugia, I. Tsvetkova, H.Najdenski, V.Bankova, V. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* **2011**. 126. 1431–1435
31. G.Negri. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes. *Apidologie* .**1998**.29.305–314
32. M. Lahouel, K. Boutabet, W. Kebsa, M. Alyane. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*.**2010**.04.712-720.
33. S. Boulechfar, Z. Akbulut, H. Dilek Tepe, A. Zellagui, R. Gulhan Aktas, C. Bensouici, F. Doyuk, L. Khattabi, G. Demire, M.Lahouel. LC–MS/MS analysis, antioxidant and anticancer effects of phenolic-rich extracts from Algerian propolis: a comparative study. *Journal of Food Measurement and Characterization*.**2023**.17.564-575
34. E.K. Soltani, R. Cerezuela, N. Charef, S. Mezaache-Aichour, M. Angeles Esteban, M.M. Zerroug. Algerian propolis extracts chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*.**2017**.62.57-67.
35. N. Segueni, A. Zellagui, F. Moussaoui, M. Lahouel, S. Rhouati. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*.2016.9.425-428
36. A.I.Piccinelli, T. Mencherini, R. Celano, Z. Mouhoubi, A. Tamendjari, R. Aquino, L. Rastrelli. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian propolis. *J. Agric. Food Chem.***2013**.61 (21).5080-5088
37. K. Boutabet, W. Kebsa, M. Alyane, M. Lahouel. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin.*Indian Journal of Nephrology*.**2011**.21.101-106
38. Zuhendri.F,Felitti.R,Fearnley.J,Ravalia.M.The use of propolis in dentistry ,oral health and medicine :A review.*Journal of Oral Biosciences*.**2021**.63.1-12
39. Anjum.S. I, Ullah. A, Khan. K. A, Attaullah. M, Khan. H, Ali.H, Bashir. M. A, Tahir.M, Ansari.M. J,Ghramh. H. A, Adgaba. N, Dash.,C. K. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*.**2019**. 26.1695–1703
40. Abdel-Daim. M. M, El-Tawil. O. S, Bungau. S. G, Atanasov.A. G. Applications of antioxidants in metabolic disorders and degenerative diseases: Mechanistic approach. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**. 29.1-3.
41. Yeung.A. W. K, Tzvetkov.,N. T, El-Tawil.O. S, Bungau. S. G, Abdel-Daim. M. M, Atanasov. A. G. Antioxidants: Scientific literature landscape analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.**2019**.1.1-11.
42. Bungau. S, Abdel-Daim. M. M, Tit. D. M, Ghanem.,E, Sato. S, Maruyama-Inoue. M, Yamane.S, Kadonosono. K. Health benefits of polyphenols and carotenoids in age-related eye diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**.12.1-22
43. S.Castaldo , F.Capasso. Propolis, an old remedy used in modern medicine.*Fitoterapia*.**2002**. 73.1-6
44. A.Parolia, M.S.Thomas, M.Kundabala, M. Mohan. Propolis and its potential uses in oral health. *Int. J. Med. Med. Sci.* **2002**.02.210–215
45. H.Fokt, A. Pereira, A. Ferreira, A. Cunha, C. Aguiar. How do bees prevent hive infections ,The antimicrobial properties of propolis.*Microbial. Biotechnol.* **2010**.01.481–493
46. S.Martinotti, E.Ranzato. Propolis: a new frontier for wound healing.*Burns Trauma*.2015. 03.1-9.
47. J.M.Sforcin. Biological properties and therapeutic applications of propolis.*Phytother*.**2016**. 30.894–905
48. S.Silici, S.Kutluca. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*.**2005**. 99.69-73
49. K.Salomão, E.M. de Souza, A. Henriques-Pons, H.S.Barbosa, S.Lde Castro. Brazilian green propolis: effects in vitro and in vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complement. Alternat. Med.***2011**.01.1-11
50. J.Sforcin. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* **2007**.113.1–14
51. G.CChan, K.W. Cheung, D.M.Sze. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2013**.44. 262–273

52. J.M. Sforcin. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res.* **2016.** 30. 894–905
53. S.Martinotti, E. Ranzato. Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns/Trauma.* **2015.** 11.151.121
54. B.Kouidhi, T.Zmantar, A.Bakhrouf. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe* **2010.** 16.566–571.
55. V.H.Seda, k.Sorkun , S .I. Deliloğlu Gurhan, F. Ozdal-Kurt, E. Turkoz, O.Gencay, B.Salih. Propolis from Turkey induces apoptosis throughactivating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem.* **2010.** 112. 546–556.
56. A. Carolina Pagliarone, C.L. Orsatti, M. C. Búfalo, Fa. Missima, T.F. Bachiega, J.P Araújo Júnior, J. Maurício Sforcin . The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *J ApiProd ApiMed Sci* .**2009.** 1. 11–15.
57. H. Pratsinis , D.Kletsas, E. Melliou, I. Chinou. Antiproliferative activity of Greek propolis. *J Med Food* .**2010.** 13.286–290.
58. H. Wei-Jan , H. Chih-Hsiang, W. Chia-Li , L. Jen-Kun , C. Yue-Wen , L. Chun-Liang, C. Shuang-En , H. Chung-Yang , C. Chia-Nan. Propolin G, a prenylflavanone, isolated from Taiwanese propolis, induces caspase-dependent apoptosis in brain cancer cells. *J Agric Food Chem* .**2007.** 5.7366–7376.
59. B.Machado, T.N. Pulcino, A.L.Silva, D.Tadeu, R.G.S.Melo, I.G. Mendonça. Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *Immunity.* **2017.** 19.1-24.
60. Król, W., Bankova, V., Sforcin, J.M., Szliszka, E., Czuba, Z., Kuropatnicki, A.K. Propolis: properties, application, and its potential. Evidence-Based Complement. Alternat. Med. **2013.** 1. 1-2.
61. J.Ni, Z.Whu, J.Meng, A.Zhu, X.Zhong. The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2017.** 1.1-13.
62. A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, W.Krol. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* **2013.** 1.1-11.
63. F. Zulhendri, R. Felitti, J. Fearnley , M. Ravalia. The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *Journal of Oral Biosciences.* **2021.** 1.1-12.
64. Gazzani.G, Daglia.G , Papetti.A, Food components with anticaries activity. *Current Opinion in Biotechnology.* **2012.** 23.153-159.
65. Khurshid.Z, Naseem.M, Zafar.M, Sharik.N, Zohaib.S, Propolis : a natural biomaterial and oral health care. *Journal of Dental reaserch, Dental clininc, Dental propects.* **2017.** 11.265-274.
66. Stähli.A, Schröter.H, Bulitta.S, Serralutzu.F, Dore.A, Nietzsche.S, Milia.E, Sculean.A, Eick.S, In vitro activity of propolis on Oral micoorganisms and biofilms. *Antibiotics.* **2021.** 10.1045.
67. T.Robert, I.B.Kallon, A.Schoonees. Efficacy and safety of propolis for treating recurrent aphtous stomatitis (RAS) : a systematic review and meta-analysis. *Dentistry Journal.* **2024.** 12.19-20.
68. S.A. De Carvalho Duailibe, A. G. Gonçalves , F. J .M. Ahid. Effect of a propolis extract on *streptococcus Mutans* counts in vivo. *J Appl Oral Sci.* **2007.** 5.3-420.
69. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002.** 46.2-9.
70. Duailibe SADC, Gonçalves AG, Ahid FJM. Effect of a propolis extract on Streptococcus mutans counts in vivo. *J Appl Oral Sci* .**2007.** 15.
71. H. Koo, J.A. Cury, P.L. Rosalen, G.M. Ambrosano, M. Ikegaki, Y.K. Park. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res.* **2002.** 6.8-445.
72. R.Cairo, R.T.Gomes, W.Marci, R.Santo, S. Lemos, R.Abreu. Periodontitis treatment with Brazilian green propolis gel. *Pharmacologyonline.* **2006.** 03.36-41.
73. M.Sato, S.Fujiwara, M.Nagayama, R.Yamaguchi, C. Tokuda, H.Takeuchi H. Effect of propolis and propolis-containing toothpaste on the formation of dental plaque in vitro. *ORAL Ther Pharmacol.* **2001.** 20(1).5-10.
74. R.Vanni , N.M.Waldner-Tomic, G.N.Belibasakis, T. Attin, P.RSchmidlin , T. Thurnheer. Antibacterial Efficacy of a Propolis Toothpaste and Mouthrinse Against a Supragingival Multispecies Biofilm. *Oral Health Prev Dent.* **2015.** 13(6).5-31.
75. A.P.Iswari, E.Riyanti, D.Hadidjah. Plaque index differences before and after teeth brushing with and without propolis dentifrice. *Padjadjaran J Dent.* **2019.** 22(1).2549-6212
76. S.Mohsin, B.Manohar, S. Rajesh, Y.Asif. The effects of a dentifrice containing propolis on Mutans Streptococci: a clinico-microbiological study. *Ethiop J Health Sci.* **2015.** 25(1).9-16

77. S. Peycheva, E.Apostolova , P.Gardjeva , Z.Peychev, V. Kokova, A.Angelov. Effect of Bulgarian propolis on the oral microflora in adolescents with plaque-induced gingivitis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **2018**.29.271-277.
78. N.Malhotra, S.P.Rao, S. Acharya, B.Vasudev. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Candida albicans*. *Oral Health Prev Dent*. **2011**.9(3).1-8.
79. A.E.Akca, G. Akca, F.T.Topçu , E.Macit, L.Pikdöken, I.Özgen. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Res Int. févr*. **2016**.20(16).362-463.
80. K.S.Hegde, S.S.Bhat, Rao, S.Sain. Effect of Propolis on *Streptococcus mutans* Counts: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. **2013**.6(1).5-22.
81. E.M.R. Pereira , J.L.D.C.da Silva, F.F.Silva, M.P.De Luca, E.E.F.Ferreira , T.C.M.Lorentz. Clinical Evidence of the Efficacy of a Mouthwash Containing Propolis for the Control of Plaque and Gingivitis: A Phase II Study. *Evid-Based Complement Altern. Med ECAM*. **2011**.20.49-75.
82. A. da Silva Barboza, J. P. Aitken-Saavedra, M. Lamas Ferreira, A. Maria Aranha , R.Guerra Lund. Are propolis extracts potential pharmacological agents in human oral health? - A scoping review and technology prospecting. *Journal of Ethnopharmacology*.**2021**.271.1-8.
83. J.Dhanik, N.Arya, V.Nand. A review on *Zingiber officinale*.*Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.**2017**.6(3).174-184.
84. H. A. S. A. Priyanjani, R. M. U. S. Senarath, W. T. P. S. K Senarath, M. L. A. M. S. Munasinghe. Propagation, Phytochemistry and Pharmacology of *Plumbago. Indica*-A review .*British Journal of Pharmaceutical Research*.**2021**.33.188-202.
85. M. Beigmohamadi, A. Movafegh ,S.Jafari, A.Sharafi. Efficient in vitro organogenesis, micropropagation, and plumbagin production in *Plumbago europaea L.* *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*.**2021**.57.820-830.
86. H. M. Muhammad, Y.Kawkab, A. M. Naqishbandi. Quantitative and Qualitative Analysis of Plumbagin in the Leaf and Root of *Plumbago europaea* Growing Naturally in Kurdistan by HPLC. *Iraqi J Pharm Sci*.**2009**.18.54-59
87. Nidal. Jaradat, A. Zaid, F. Hussein. Investigation of the antiobesity and antioxidant properties of wild *Plumbago europaea* and *Plumbago auriculata* from North Palestine. *Chem. Biol. Technol. Agric*.**2016**.31.2-9.
88. B. Rahhal, N. Jaradat, W. Basha, M. Shraim, A. Zyoud, S. Hattab. The Diuretic Activity of *Ephedra alata* and *Plumbago europaea* in Mice using an Aqueous Extract. *Moroccan Journal of Chemistry*.**2018**.06.569-576.
89. A.M. Serrilli , V. Sanfilippo , M. Ballero , C. Sanna , F.Poli , P. Scartezzini , M. Serafini, A. Bianco. Polar and antioxidant fraction of *Plumbago europaea L.*, a spontaneous plant of Sardinia. *Natural Product Research*.**2010**.24.633-639.
90. M. Beigmohamadi, A. Movafeghi, A.Sharafi, S.Jafari, H. Danafar. Cell Suspension Culture of *Plumbago europaea L.* Towards Production of Plumbagin. *Iranian J Biotech*.**2019**.17(2).47-53.
91. M. Sobhani1, M. A.Mohammadi, S. N.Ebrahimi, A. Aliahmadi. Tracking leading anti-*Candida* compounds in plant samples:*Plumbago europaea*.*Iranian Journal of Microbiology*.**2018**.10.187.193.
92. N.Jaradat, A. I. Khasati, N. Al-Maharik, A. M. Eid, W.Jundi, N. A. Zatar, M.S.Ali-Shtayeh, R. Jamous. Isolation, identification, and antimycotic activity of plumbagin from *Plumbago europaea L.* roots, leaves and stems. *Pak. J. Pharm. Sci*.**2021**.34.1421.1428.
93. K. Singh, Y. Naidoo, H. Baijnath. A comprehensive review on the genus *Plumbago* with focus on *Plumbago auriculata* (PLUMBAGINACEAE). *Afr J Tradit Complement Altern Med*.**2018**.15.199-215.
94. N. Shawarb, N. Jaradat , H. Abu-Qauod, R. Alkowni, F. Hussein. Investigation of antibacterial & antioxidant activity for methanolic extract from different edible plant species in Palestine. *Moroccan Journal of Chemistry*.**2017**.05.573-579
95. T.T. Bataineh, M. A. Al-Qudaha, N. Ea, A..M.Ajlounib. Corrosion Control of Aluminium Alloy in Alkaline Solution Using Leave Extract of *Plumbago Europaea*. *Jordan Journal of Chemistry*.**2013**.08.167-178.
96. N.Ibrahim, N.F.S.Niza, M.M. Rodi, A.J. Zakaria, Z. Ismail, K.S. Mohd. Chemical and biological analyses of Malaysian stingless bee propolis extracts. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*.**2016**.20(2). 413-422.
97. A.L.Waterhouse. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.**2002**.11.1-11.
98. M.Skerjet, P.Kotnik, M.Hadolin, A.R.Hras, M.Simonc, Z.Knez. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*.**2005**.89.191-198.
99. X.Zhou, J.Peng, G.Fan, Y.Whu. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledbouri* using high-speed counter-current chromatography by step wise increasing the flow-rate of mobile phase. *Journal of Chemistry*.**2005**.2.216-221.
100. B.Sahloul, S.Ammar. R.B.Fredj. S.Saguem. F.H.Trotin Skhiri. Polyphenol content and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus L.* varieties. *Pak J Biol Sci*.**2009**.9.660-668.

101. I. Kouadri, A. Rebiai, H. Hemmami, B. Ben Seghir, S. Zeghoud, D. Berra, R. M. Bouchra. Impact of geographic variation on the chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Appl. Biol. Sahar. Areas*. **2021**. 3(4). 27-41.
102. M. L. Belfar, T. Lanez, A. Rebiai, Z. Ghiaba. Evaluation of antioxidant capacity of propolis collected in various areas of Algeria using electrochemical techniques. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2015**. 10. 9641 – 9651.
103. I. D. da Silva, M. L. Tiveron, E. C. Meurer, K. Bonkova, M. C. Marcucci, M. Nogueira Eberlin, A. H. Frankland Sawaya. Effect of maceration time on chemical composition of extracts of Brazilian propolis. *Journal of apicultural research*. **2006**. 45 (3). 137-144.
104. N. Nedji, W. Loucif-Ayad. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and quantitative chemical composition. *Asian Pacific journal of Tropical Disease*. **2014**. 4 (6). 433-437.
105. S. Kumazawa, T. Ohta, K. Kaji, T. Nakayama. Antioxidant and antiangiogenic activities of propolis. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. **2007**. 127. 16-18.
106. R. Béji-Srairi, I. Younes, M. Snoussi, K. Yahyaoui, G. Borchard, R. Ksouri. Ethanolic extract of Tunisian propolis: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative properties. *J Apic Res*. **2020**. 59. 1-11.
107. S. Mohammadzadeh, M. Sharriatpanahi, M. Hamedi, Y. Amanzadeh, S. E. S. Ebrahimi, S. N. Ostad. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem*. **2007**. 103. 729–733.
108. A. Sorucu, H. H. Oruç. Determination of biologically active phenolic compounds in propolis by LC–MS/MS according to seasons and altitudes. *J. Food Meas. Charact.* **2019**. 13. 2461–2469.
109. E. Akyüz. Optimizing pulsed ultrasound-assisted extraction of antioxidants from Linden and quantification by HPLC–PDA. *Food Anal.* **2022**. 15. 3311-3321.
110. C. F. Vecchi, R. S. dos Santos, M. L. Bruschi. Applicability of an HPLC method for analysis of alcoholic and glycolic Brazilian green-propolis extracts. *Braz J Pharm Sci*. **2023**. 59. 1-12.
111. N. Teggat, B. Bakchiche, A. M. Abdel, K. S. Bardaweel, M. A. Ghareeb. Chemical composition and biological evaluation of Algerian propolis from six different regions. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2023**. 16. 184-193.
112. A. N. Piccinelli, T. Mencherini, R. Celano, Z. Mouhoubi, A. Tamendjari, R. Aquino, L. Rastrelli. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**. 61. 5080-5088.
113. F. K. Abdel-Hady, A. M. Souleman, S. ElHawary, N. M. Salah, Z. El-Shahid. Egyptian propolis bioassay guided fractionation and GC/MS, HPLC analysis of highly anti-acetyl cholinesterase sub-fractions. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2015**. 35. 53-62.
114. A. Shashikala, B. P. Harini, M. S. Reddy. HPLC analysis of flavonoids from propolis of different honey bee species in selected locations of Bangalore. *Int. J. Pharm. Sci.* **2019**. 10. 5423-5429.
115. M. Draganova-Filipova, M. Nikolova, A. Mihova, L. Peychev, V. Sarafian. A Pilot study on the immunomodulatory effect of Bulgarian propolis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. **2010**. 24. 119-124.
116. O. Dangles. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry. *Organic Biomolecular Chemistry*. **2005**. 3. 423-430.
117. M. S. Blois. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. **1958**, 181, 1199-1200.
118. M. Zargar, A. H. Azizah, A. M. Roheeyati, A. B. Fatimah, F. Jahanshiri, M. S. Pak-Dek. Bioactive compounds and antioxidant activity of different extracts from *Vitex negundo* leaf. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2011**. 5(12). 2525-2532.
119. A. Bougatef, M. Hajji, R. Balti, I. Lassoued, Y. Triki-Ellouz, M. Nasri. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. **2009**, 114. 198–205.
120. M. N. Boukhatem, M. A. Ferhat, A. Kameli, F. Saidi, H. Taibi, T. Djamel. Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. **2014**. 8(4). 1418-1431.
121. M. S. Bensaad, S. Dassamiour, L. Hambaba, C. Bensouici, H. Haba. In Vitro Assessment of Antioxidant, Anti-Inflammatory, Neuroprotective and Antimicrobial Activities of *Centaurea Tougourensis* Boiss & Reut. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* **2021**. 9(6). 790-802.
122. A. Medjdoub, F. Belhadj, A. Saidi Merzouk, Y. Baba Hamed, Z. Kibou, N. Choukchou-Braham, H. Merzouk. In vitro peripheral blood mononuclear cell proliferation, cytokine secretion and oxidative stress modulation by pyrido[2,3-d]pyrimidines. *Chemical Papers*. **2020**. 74. 903-913.

123. ¹Y.M. Boufadi, J.Soubhye, J.Nève, P. Van Antwerpen, A.Riazi. Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**.51(12).2613–2620.
124. A.Bouaroura, N. Segueni, R. Erenler, A.May, C.Bensouici, S.Akkal. Phytochemical investigation of phenolic constituents and in vitro evaluation of antioxidant activity of five Algerian propolis. *Curr. Bioact. Compd.* **2021**. 17 (8). 79-87
125. Y.M. Boufadi, J.Soubhye, J.Nève, P. Van Antwerpen, A.Riazi. Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**.51(12).2613–2620.
126. A.I. Moren Florez, S. Malagan, S. Ocampo, S. Leal-Marín, J.H. Gil González, A. Diaz-Cano, A. Lopera, C. Paucar, A. Ossa, B. Glasmasher, A. Pelàez-Vargas, C. Garcia. Antibacterial and osteoinducted properties of Wollastonite scaffolds impregnated with propolis produced by additive manufacturing. *Heliyon*. 2024. 10.1-16.
127. N. Segueni, D. Evren, S. Akkal, O. Beraat Özçelik, S. Rhouati. Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2017**.30 (4).1417-1423.
128. M. Abdel-Aziz, K. Shaker, Z. El-Shahid, L. Ibrahim. Antioxydant, acetylcholinesterase and α -glucosidase potentials of metabolites from marine fungus *Aspergillus unguis* RSPG 204 associated with the sponge *Agelas* sp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. **2015**.30(1).272-278
129. M. Draganova-Filipova, M. Nikolova, A. Mihova, L. Peychev, V. Sarafian. A Pilot study on the immunomodulatory effect of Bulgarian propolis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* .**2010**.24. 119-124.
130. B. Halliwell. The antioxidant paradox. *Lancet* .**2000**. 355.1179-1180.
131. N. Kobayashi, S. Unten, H. Kakuta, N. Komatsu, M. Fujimaki, K. Satoh, C. Aratsu, H. Nakashima, H. Kikuchi, K. Ochiai, H. Sakagami. Diverse biological activities of healthy foods. *In Vivo*. **2001**.15. 17-23.
132. A. C. De Groot. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*. **2013**.24.263–282.
133. Y. Irigoiti, A. Navarro, D. Yamal, C. Libonatti, A. Tabera, M. Basualdo. The use of propolis as functional food ingredient: A review. *Trends in Food Science Technology*. **2021**.115.297-306.
134. N. Bhatti, Y. A. Hajam, S. Mushtaq, L. Kaur, R. Kumar, S. Rai. A review on dynamic pharmacological potency and multifaceted biological activities of propolis. *Discov Sustain*. **2024**.185.1-55.
135. S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. **2004**.84.329–339.
136. J. Jodynis-Liebert, M. Kujawska. Biphasic dose-response induced by phytochemicals: Experimental evidence. *J. Clin. Med*. **2020**. 718.
137. Y. S. Song, E. H. Park, G. M. Hur, Y. S. Ryu, Y. M. Kim, C. Jin. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **2002**.80 155-161.
138. G. Coneaca, E. Gafițanub, N. C. Hădărugăc, D. I. Hădărugăd, A. Rivișc, G. Bandurd, I. A. Pînzaru, G. Rusud, L. Urșicaa, V. Păunescue, A. Gruiac, M. Sebeșanf, I. Grozescug, C. Lazăug, P. Sfirloagăg. Propolis extract/ β -cyclodextrin nanoparticles: synthesis, physico-chemical, and multivariate analyses. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. **2008**. 14 .58-70.
139. R. Santos da Silva Moorera, J. S. Novais, R. F. da Silva, R. Pinto Nunes, L. Coli Louvise de Abreu, E. P. Dias, H. C. Castro, F. A. do Carmo, C. R. Rodrigues, V. P. de Sousa, L. M. Cabral. Preparation and evaluation of red propolis and nystatin cyclodextrin inclusion complexes against oral microbiome opportunistic microorganisms. *Food Sci. Technol, Campinas*. **2022**.42.1-12
140. Clinical and Institute, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. **2012**, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
141. I. Sæbø, M. Bjørås, H. Franzyk, E. Helgesen, J. Booth. Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**. 24(3). 1-20.
142. M. N. Navaei, M. Mirza, M. Dini. Chemical composition of the essential oil of *Plumbago europaea* L. roots from Iran. *Flavour. Fragr. J.* **2005**. 20(2).213-214.
143. M. H. Muhammad, K. Y. Saour, A. M. Naqishbandi. Quantitative and Qualitative Analysis of Plumbagin in the Leaf and Root of *Plumbago europaea* Growing Naturally in Kurdistan by HPLC. *Iraqi J. Pharm. Sci.* **2009**.18 .54-59.
144. F. Kaddour, N. Aissaoui, M. A. Dib, O. Bensaid, A. Muselli. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil and Hydrosol Extract From Roots of *Plumbago europaea* and In-vitro Combinatory Antimicrobial Effect of Hydrosol extract with Gentamicin and Amphotericin B. *The Natural Products Journal*. **2021**.11.182-192.
145. M. Hasan, I. Hwija, Y. Mossa. Essential oils from *Plumbago europaea* L. aerial parts (leaves, flowers): GC-MS analyses and literature biological properties. *Nat. Prod. Res.* **2023**. 49(5).1-10.

146. A. Drioiche, S. Amine, S. boutahiri, S. Saidi, A. Ailli, R. Rhafouri, M. Mahjoubi, F. El Hilali, A. Mouradi, B. Eto, T. Zair. Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils and phenolic extracts from the aerial parts of *Ruta montana* L. of the middle atlas-Mountains-Morocco. *J. Essen. Oil Bearing Plants*. **2020**.23(5).902–917.
147. U.V. Mallavadhani, G. Sahu, J. Muralidhar. Screening of plumbago species for the bio-active marker plumbagin. *Pharmaceutical biology*. **2002**. 40(7). 508-511.
148. B. Shukla, S. Saxena, S. Usmani, P. Kushwaha. Phytochemistry and pharmacological studies of *Plumbago zeylanica* L.: a medicinal plant review. *Clin. Phytosci*. **2021**. 7(4) .
149. B. Shan, Y.Z. Cai, M. Sun. Antibacterial and antioxidant effects of *Graptopetalum paraguayense* (Crassulaceae) extracts and their main components. *Food Control*. **2009**.20(1-2). 308-313.
150. R. Checker, R.S. Patwardhan, D. Sharma, J. Menon, M. Thoh, S.K. Sandur, K.B. Sainis, T.B. Poduval. Plumbagin, a vitamin K3 analogue, abrogates lipopolysaccharide-induced oxidative stress, inflammation and endotoxic shock via NF-kappaB suppression. *Inflammation*. **2014**.37.542–554.
151. H. Chu, H. Yu, D. Ren, K. Zhu, H. Huang. Plumbagin exerts protective effects in nucleus pulposus cells by attenuating hydrogen peroxide-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis through NF-KB and Nrf-2. *Int. J. Mol. Med*. **2016**. 37. 1669–1676.
152. P. Luo, Y.F. Wong, L. Ge, Z.F. Zhang, Y. Liu, L. Liu, H. Zhou. Anti-inflammatory and analgesic effect of plumbagin through inhibition of nuclear factor-KB activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **2010**.335.735–742.
153. M. Hotta, R. Nakata, M. Katsukawa, K. Hori, S. Takahashi, H. Inoue. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res*. **2010**. 51(1). 132-139.
154. D. Shen, M.H. Pan, Q. Wu, C.H. Park, C.T. Ho. Thymol and carvacrol suppress inflammatory responses in LPS-induced RAW264.7 macrophages via NF- κ B and MAPK pathways. *Food Funct*. **2015**.5(11). 2573-2581.



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCEM

الخلاصة:

يهدف هذا العمل الى دراسة التركيبية الكيميائية والخصائص البيولوجية للعكبر ونبات *Plumbago.europaea*. تم أولا تحضير مستخلصات من المواد الطبيعية المذكورة ، يلي هذه المرحلة تحديد التركيب الكيميائي للمستخلصات المحضرة باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا، تم تقييم العديد من الأنشطة البيولوجية نذكر منها (مضادات الأكسدة ومضادات البكتيريا و دراسة تأثير المستخلصات في تحفيز المناعة ومضادات الكولرين ستراز ومضادات الالتهاب ومضادات تحلل الدم). كما قمنا ايضا بتحضير مركب من مستخلصات العكبر مع سيكلوديسترين بيتا، ثم قمنا بتقييم نشاطها المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا لدراسة تأثير المركب سيكلوديسترين بيتا على الخصائص البيولوجية للعكبر ،قمنا ايضا بإعداد محلول غسول الفم يعتمد في تركيبته على مستخلص العكبر والزيوت الأساسية لاستخدامها في مجال طب الأسنان

الكلمات المفتاحية: العكبر، *Plumbago.europaea*، التركيب الكيميائي، الأنشطة البيولوجية، سيكلوديسترين بيتا

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation chimique et la valorisation biologique de deux substances naturelles : la propolis et le *Plumbago europaea*. Dans un premier temps nous avons procédé une extraction des échantillons de la propolis et des racines du *Plumbago europaea*, cette étape est suivie par la détermination de la composition chimique des extraits préparés en faisant appel à la technique chromatographique, afin de valoriser les extraits, plusieurs activités biologiques ont été évalué (antioxydante, antibactérienne, immunostimulante, anti cholinestérase, anti inflammatoire et hémolytique). Dans une autre partie nous avons préparé des complexes d'inclusion à partir des extraits de la propolis et β -cyclodextrine pour étudier l'impact de cette dernière sur l'activité biologique de la *propolis*, enfin nous avons préparé une solution buccodentaire à partir de la propolis et des huiles essentielles pour une application en dentisterie.

Mots clés : Propolis, *Plumbago europaea*, Composition chimique, Activité biologique, β -cyclodextrine

Abstrac:

This study aimed to investigate the chemical composition and the biological properties *Plumbago.Europaea* and propolis. Firstly, we extracted samples of *propolis* and *Plumbago europaea* roots, followed by determination of the chemical composition of the extracts prepared using the chromatographic technique. In order to enhance the value of the extracts, several biological activities were evaluated (antioxidant, antibacterial, immunostimulant, and anticholinesterase, anti- inflammatory and hemolytic). In another section, we prepared inclusion complexes from propolis extracts and β - cyclodextrin to study the impact of β -CD on the biological activity of propolis.

Finally, we prepared a natural oral solution from propolis and essential oils for dentistry application.

Keywords : Propolis, *Plumbago europaea*, Chemical composition, Biological activity, β -cyclodextrine

