

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES

Département DesSciences de la matière

## ***Mémoire de MASTER***

**Domaine :** Sciences de la matière  
**Filière :** Chimie  
**Option :** Chimie organique appliquée

**Par :**

**BENDOUMA AMEL**

**THEME**

---

---

***Activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits  
phénoliques de propolis de la région locale de Laghouat***

---

---

*Soutenu publiquement devant le jury composé de:*

<i>Mr. BENALIA MOUKTHAR</i>	<i>Professeur</i>	<i>Président</i>
<i>Mr SAIDAT BOUBAKHER</i>	<i>M.A.C</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr BAKHTI KRAIBAA</i>	<i>M.A.B</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr GHERIB ABDELAZIZE</i>	<i>M..C.A</i>	<i>promtueur</i>
<i>Mr BAKCHICHE BOULANOUAR</i>	<i>M.A.A</i>	<i>Co-promoteur</i>

***Année Universitaire 2012/2013***

## *Dédicace*

*A la mémoire de mon père et mon marie.*

*A ma mère, que Dieu la protège. Qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseil et ses encouragements.*

*A mes deux garçons Amine et Taha. Que ce travail soit pour-ils un exemple à suivre.*

*A ma belle-mère et toute la famille Safi*

*A mes frères et sœur.*

*Mes nièces et neveux.*

*À toute la promotion de Master chimie 2013*

*Et pour toute personne avec qui je partage un beau souvenir ...Mes chers*

## *Remerciements*

Arrivé au terme de la rédaction de ce mémoire, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui, par leurs enseignements, leurs soutiens et leurs conseils, m'ont aidé à sa réalisation.

Mon travail de mémoire s'est déroulé au laboratoire de recherche chimie organique de l'université Amar Telidji – Laghouat - , dont je remercie son directeur pour l'accueil et les conditions matérielles et scientifiques qui m'ont été offertes.

En premier lieu, j'exprime toute ma reconnaissance envers les membres du jury. Qu'il me soit permis de remercier très sincèrement Monsieur le professeur BENALIA MOUKHTAR pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury. Mes remerciements vont également aux examinateurs Monsieur BAKTHI maitre-assistant B Et à Monsieur SAIDAIT BOUBAKER Maître de conférences comme examinateur et pour son aide et ces conseil aux long des années d'étude licence et Master.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur GUERIB ABDELAZIZ pour avoir accepté la direction de ce mémoire, pour avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire. Ses compétences scientifiques et son efficacité ont fortement contribué à la réalisation de ce mémoire.

Je remercie également Monsieur BAKCHICHE BOULANOUAR comme co-promoteur pour avoir consacré une partie de leur temps précieux à l'examen de ce mémoire. Merci pour ses conseils qui ont participé à la clarification du mémoire et les indications qu'il m'a fournies se sont révélées extrêmement fructueuses

Je remercie également toute l'équipe de Laboratoire M<sup>elle</sup> GUNANE HADJIRA, M<sup>elle</sup> ASSMA NOURDINE sans oublier Monsieur AOUISSI pour leurs aides et leurs conseils

Je tiens à remercier Madame BENMAKLOUF chéfe service de laboratoire de microbiologie de l'hopital Ahmed benadjila Laghouat pour m'avoir effectué les tests anti-microbiens.

Je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé ou simplement discuté. Elles ont toutes leur place ici.

## *Liste des figures*

Figure 01	:	les technique de récolte de propolis a/récolte par grattage des cadres b/récolte au moyen des grilles [10].	08
Figure 02	:	La composition chimique de propolis	09
Figure 03	:	Structure de quelques acides phénoliques présents dans la propolis [32]	16
Figure 04	:	Structure de quelques flavonoïdes présents dans la propolis [32]	17
Figure 05	:	Macrodiffusion en milieu liquide [47].	26
Figure 06	:	Microdiffusion en milieu liquide [47].	26
Figure 07	:	Dilution sur milieu solide gélosé.	27
Figure08	:	Cartes géographique montrant les stations de récolte.	29
Figure 09	:	les trois échantillons de propolis.	29
Figure10	:	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).	35
Figure 11	:	Formation et piégeage de radical cation ABTS. + Par de Trolox.	37
Figure 12	:	Comparaison des taux de rendement en extraits secs des trois variétés de propolis.	46
Figure 13	:	Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	47
Figure 14	:	La teneur en phénol totaux des extraits éthanoïques de propolis.	48
Figure 15	:	Courbe d'étalonnage de quercetine.	50
Figure 16	:	La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoïques de propolis	51
Figure 17	:	Comparaison entre Les teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits éthanoïques de propolis.	52
Figure 18	:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction de la concentration des EEP et la concentration en antioxydants vitamine C.	54
Figure 19	:	Corrélation entre les valeurs d'EC50 des teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des EEP et le test DPPH.	55

Figure 20	:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des éthanoïques de propolis et la concentration en antioxydants standards Trolox.	57
Figure 21	:	Corrélation entre les valeurs d'EC50 des teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des Extraits éthanoïques de propolis et le test. ABTS.	58
Figure 22	:	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des extraits éthanoïques de propolis et la concentration en antioxydants standards vitamine C.	60
Figure 23	:	Corrélation entre les valeurs d'EC50 des teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des test phosphomolybdates PPM	61
Figure 24	:	L'effet antibactérien des extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec Escherichia coli	64
Figure 25	:	L'effet antibactérien d'extraits éthanoïque d'Elhouita avec Pseudomonas aeruginosa	66
Figure 26	:	L'effet antibactérien des avec les extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane et Elhouita avec Staphylococcus aureus.	68
Figure 27	:	Test positif Staphylococcus aureus avec les extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane et Elhouita	68
Figure 28:	:	L'effet antibactérien des extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec Candida albicans.	70
Figure 29	:	Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche Escherichia coli.	71
Figure 30	:	Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche Pseudomonas aeruginosa.	72
Figure 31	:	Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche Staphylococcus aureus .	72
Figure 32	:	Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche.	73

## *Liste des Tableaux*

Tableau I	: les principales classes des composés chimiques de la propolis.	10
Tableau II	: Méthodes de détermination de l'activité antioxydante in vitro.	19
Tableau III	: Origine de propolis et les conditions de récolte.	30
Tableau IV	: Quelque exemple des plantes locales de la région de Laghouat (origine botanique de propolis	31
Tableau V	: Références et origines des microorganismes .	41
Tableau VI :	: Les rendements des extraits éthanœiques de propolis	46
Tableau VII:	: Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanœiques de propolis (EEP).	48
Tableau VIII	: Teneurs des polyphénols de quelque région dans le monde.	49
Tableau IX	: Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanœiques de propolis (EEP).	50
Tableau X	: Activité antiradicaliare des extraits éthanœiques de propolis et de Vitamine C.	51
Tableau XI	: Activité antiradicaliare des extraits éthanœiques de propolis et de Trolox	56
Tableau XII	: Les valeurs AEAC et EC50 des extraits éthanœiques de propolis.	59
Tableau XIII	: Une illustration de la capacité antimicrobienne des extraits éthanœiques de propolis vis-à-vis de germes.	62
Tableau XIV	: Activité antibactérienne des extraits éthanœiques de propolis avec le germe d'Escherichia coli	63
Tableau XV	: Activité antibactérienne l'extraits éthanœique de propolis d'Elhouita avec le germe Pseudomonas aeruginosa	65
Tableau XVI	: Activité antibactérienne d'EEP2 avec le germe Pseudomonas aeruginosa	67
Tableau XVII	: Activité antibactérienne des extraits éthanœiques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec le germe Candida albicans	69
Tableau XVIII	: les déférentes corrélations R2 des polyphénols et les flavonoïdes de chaque souche	73

## ***Table de matière***

Liste des figures	i
Liste des Tableaux	iii
Introduction	02

### **I. Etude bibliographique**

<b>I.1. Généralité sur la Propolis</b>	<b>05</b>
I.1.1. Définition	05
I.1.2. Origine de récolte	05
I.1.2.1. Par les abeilles	05
I.1.2.1.a. Facteurs saisonniers	05
I.1.2.1.b. Facteurs géographiques	06
I.1.2.1.c. Facteurs climatiques	06
I.1.2.1.d. Facteurs liés à la race d'abeille	06
I.1.2.2. Par l'homme au niveau de la ruche	07
I.1.2.2.a. Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche	07
I.1.3. Composition	9
I.1.3.1. Glucides	11
I.1.3.2. Matière azotée	11
I.1.3.3. Matière minéral	11
I.1.3.4. Vitamines	11
I.1.3.5. Stérols et les aldéhydes aromatiques	12
I.1.3.6. Substances diverses	12
I.1.4. Propriétés thérapeutiques	12
I.1.5. Conservation	12
<b>I.1.6. Généralités sur l'activité antioxydante de la propolis</b>	<b>15</b>
I.1.6.1. Composés phénoliques	15
I.1.6.2. Modes d'action des polyphénols	18
I.1.6.2.a. Capture directe des radicaux libres	18
I.1.6.2.b. Chélation des cations métalliques	18
I.1.6.2.c. Inhibition de la peroxydation lipidique	18
I.1.7.3. L'évaluation de l'activité antioxydante	19
<b>I.1.8. Généralité sur l'activité antibactérienne de la propolis</b>	<b>21</b>
I.1.8.1. Méthodes pour l'essai de sensibilité aux antimicrobiens	22
I.1.8.1.a. Méthode de la diffusion en disque	22
I.1.8.1.a.a. Intérêts pour l'utilisation de la méthode de diffusion par disque	23
I.1.8.1.2. Méthodes de dilutions en bouillon et gélose	24
I.1.8.1.2.a. Dilution en bouillon	25
I.1.8.1.2.b. Dilution en gélose	26

## **II Matériels et méthodes**

<b>II.1.matériel biologique</b>	29
<b>II.2.méthodes d'analyses</b>	32
<b>II.2.1.Etude physico-chimique</b>	32
II.2.1. 1. extraction des composés phénoliques	32
II.2.1.2. Macération	33
II.2.1.3. Dosage des composés phénoliques	33
II.2.1.4. Dosage des flavonoïdes	34
<b>II.2.2.l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits éthanoïques de Propolis</b>	34
II.2.2.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH•	35
II.2.2.2. Test ABTS ou détermination du TEAC	36
II.2.2.3. Test PhosPhoMolybdate	39
<b>II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne</b>	41
II.2.3.1. Identification et isolement des souches	41
II.2.3.2. Stérilisation du matériel	42
II.2.3.3. Préparation des dilutions des extraits à tester	42
II.2.3.4. Protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne	42
II.2.3.4.a. Milieu	43
II.2.3.4.b. Préparation des inoculums	43
II.2.3.4.c. Ensemencement et dépôt des disques	43
II.2.3.4.d. Lecture des antibiogrammes	44

## **III.1. Résultats et discussions**

<b>III.1.1.Etude physico-chimique</b>	46
III.1.1.1. Rendements des extractions	46
III.1.1.2. La quantification des phénols totaux	47
III.1.1.3. La quantification des flavonoïdes	49
<b>III.1.2.L'évaluation de l'activité antioxydante</b>	53
III.1.2.1. Test DPPH	53
III.1.2.2. Test ABTS ou détermination du TEAC	56
III.1.2.3. Test phosphomolybdates	59
<b>III.1.3. l'évaluation de l'activité antimicrobienne</b>	62
III.1.3.1. Test Escherichia coli.	63
III.1.3.2. Test de Pseudomonas aeruginosa	65

III.1.3.3. Test Staphylococcus aureus	67
III.1.3.4. Test Candida albicans	69
<b>Conclusion</b>	76
<b>Référence bibliographique</b>	79
<b>Annexe</b>	85

# *Introduction*

## Introduction

L'apithérapie est l'une des méthodes de soin naturelle. Elle est basée sur les produits de la ruche tel que : le miel, la gelée royale, la propolis ...etc. Les premières traces de cette science remontent à l'Égypte antique. Cette pratique millénaire est mentionnée dans de nombreux écrits. On retrouve les traces d'utilisation du miel qui fut l'ingrédient le plus utilisé dans les remèdes, tant en usage externe ou interne pour les blessures et les brûlures. Des recherches plus poussées ont permis aux égyptologues de découvrir les traces d'utilisation d'un autre produit apicole : la propolis. Cette substance était utilisée par les grands prêtres de l'ancienne Égypte pour les embaumements des momies ;La propolis était également connue des anciens grecs d'où sa dénomination (d'origine Grecque) qui signifie pro : devant et polis : cite, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche.

La propolis est donc utilisée en médecine populaire depuis les temps les plus reculés. Son utilisation sans avoir été permanente s'est poursuivie au fil des années jusqu'à ce qu'elle soit redécouverte de façon relativement récente. Ces dernières années de nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et aux effets biologiques de cette substance. Ces travaux ont montré que cette substance est composée essentiellement de polyphénols et flavonoïdes. Cette composition varie en fonction de son origine, de l'espèce d'abeille et du temps de la récolte. Son efficacité une fois prouvée lui a valu un intérêt particulier par l'ensemble des chimistes, biochimistes, pharmacologues....qui essaie d'identifier de nouveaux principes actifs susceptibles d'être utilisés en thérapeutique [1].

L'ensemble de ces données nous a encouragés à évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne de propolis locale de Laghouat. De part de la richesse botanique de cette région en plantes médicinales bioactives. Et d'autre part la grande partie des recherches actuelles qui portent sur l'étude des molécules antioxydantes et antimicrobiennes tels que les composés phénoliques. Il nous a semblé donc intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

Notre travail sera reparti en trois parties, initié par :

✚ La première partie une revue bibliographique

- ✓ où nous apportons des données générales sur la propolis.
- ✓ des généralités sur l'activité antioxydante .
- ✓ et en fin des généralités sur l'activité antibactérienne.

✚ La seconde partie rapporte les méthodes analytiques :

- ✓ L'étude physicochimique, nous nous sommes intéressés à l'extraction et le dosage de composés pouvant présenter des activités et intérêts potentiels comme les phénols totaux, les flavonoïdes
- ✓ avons évalué l'activité antioxydante et antiradicalaire de nos extraits phénoliques en adoptant trois tests chimiques, le test du DPPH, le test du de l'ABTS et le test phosphomolybdate PPM.
- ✓ nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits phénoliques de propolis vis-à-vis de souches microbiennes (bactéries et levure).

✚ La troisième partie les résultats obtenus ainsi que leur discussion :

- ✓ De l'étude physicochimique.
- ✓ Des tests des activités antioxydantes
- ✓ De test des activités antibactérienne.

Nous terminons par une conclusion générale et des perspectives de recherche sur la propolis.

***I-étude bibliographique***  
***Généralité sur la propolis***

## **I.1. Généralité sur la Propolis**

### **I.1.1. Définition**

Le terme propolis vient de grec ; pro polis qui signifie «devant la ville» [1].La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles mellifères à partir des bourgeons et des exsudats des arbres et des plantes. Cette substance est ensuite mélangée avec du pollen et des enzymes secrétées par les abeilles [2].

La couleur de la propolis est variable selon la source florale et l'âge de la colonie. La propolis peut être de couleur verte, rouge ou brune sombre [3,4]Les abeilles utilisent la propolis pour colmater les fissures de la ruche et pour embaumer les cadavres des abeilles et d'autres insectes [1].

### **I.1.2. Origine de récolte:**

#### **I.1.2.1.Par les abeilles :**

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie (la récolte du nectar par exemple) et cela même si la demande s'en fait sentir. Leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche.

La récolte qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs :

#### **I.1.2.1.a Facteurs saisonniers**

La récolte a lieu, selon les cas, soit en début de saison (c'est à dire au printemps) soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage). De plus il faut noter, que c'est au moment où la miellée de nectar est la plus abondante, que la récolte de la propolis est la moins importante, les abeilles semblent alors y consacrer moins de temps et moins d'efforts [6].

### **I.1.2.1.b Facteurs géographiques**

Il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propolisent plus que les ruches de plaines [7].

### **I.1.2.1. c.Facteurs climatiques (la température)**

Les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.

### **I.1.2.1.d.Facteurs liés à la race d'abeille**

Il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent, en général, davantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises.

Cette récolte s'effectue schématiquement de la façon suivante :

- ✚ La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source. Ensuite elle l'attaque avec ses mandibules, enfin elle détache la particule saisie.
- ✚ Elle l'entasse dans l'une des corbeilles de ses pattes postérieures (3ème paire) à l'aide de ses autres pattes pour accumuler ainsi progressivement une pelote (qui est en général un peu plus petite qu'une pelote de pollen) qu'elle rapportera à la ruche.
- ✚ Au retour à la ruche, la butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières, le plus souvent à l'endroit même où la substance est utilisée. C'est une opération longue qui peut durer une à plusieurs heures [6].

### **I.1.2.2.Par l'homme au niveau de la ruche**

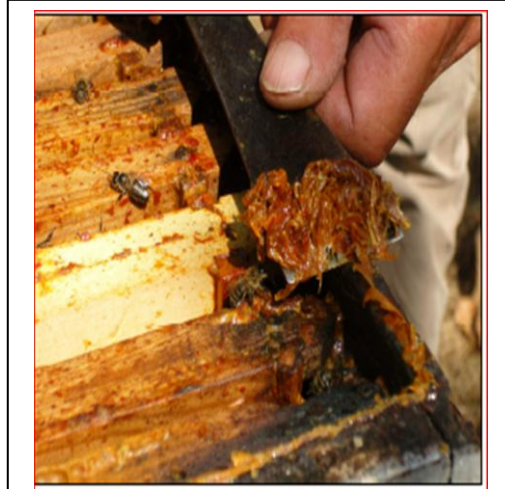
La propolis peut être récoltée selon deux techniques diverses : (figure 01).

#### **I.1.2.2.a.Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche**

de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux [6].

#### **✚ Utilisation de différents dispositifs:**

Grille moulée en matière plastique ou en métal. On pose cette grille comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche [8.9]. Cette dernière technique est meilleure. La quantité récoltée est très variable. Elle est sous la dépendance de facteurs qui conditionnent la propre récolte par les abeilles. Elle se situe en moyenne entre 100 et 300 g par ruche et par an. Cette propolis brute doit être purifiée avant toute utilisation [7].



a/récolte par grattage des cadres



b/récolte au moyen des grilles

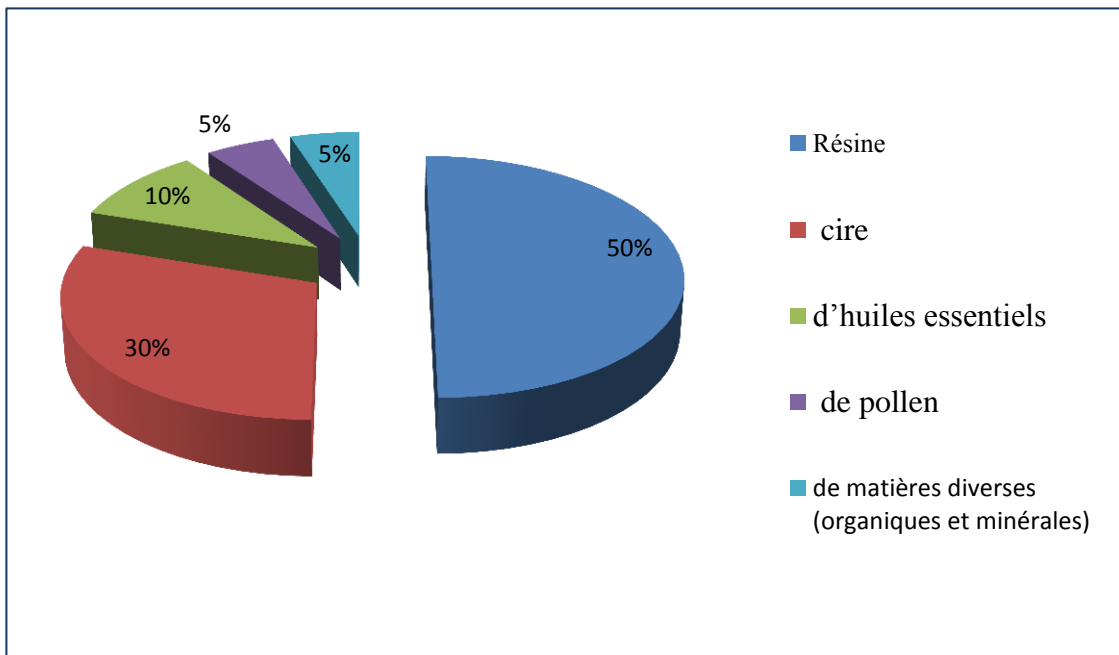
**Figure 01** : Les technique de récolte de propolis a/récolte par grattage des cadres

b/récolte au moyen des grilles [10].

### I.3. Composition

La composition chimique de la propolis est très complexe. Elle est représentée par plus de 150 composés [11]. Elle dépend de la végétation, de la saison et du site de collecte [12 ;13].

Généralement, elle est constituée de 40 à 50 % de résine, de baume composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters, 20 à 30 % de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille), 5 à 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % de matières diverses (organiques et minérales) [14; 15;16]. (Figure 2), (Tableau I).



**Figure 02** : La composition chimique de propolis

**Tableau I** : les principales classes des composés chimiques de la propolis.

<b>Composition en ordre</b>	<b>Composants par groupes</b>	<b>Référence</b>
<b>Résines</b>	45 – 55% - Flavonoïdes - acides phénoliques et leurs esters	[17] [18] [19]
<b>Cire et acides gras</b>	20 -30 % - La cire d'abeille et des plantes	[20]
<b>Huiles essentielles</b>	10 % Produits volatiles	[14]
<b>Pollen</b>	5 % -Protéines (6 acides aminés libres > 1%) -arginine et proline jusqu'à 46% du totale	[22]
<b>Autres composés et minéraux</b>	5 % -14 - traces de minéraux, silice, fer et zinc sont les plus communs.il y a aussi : -Au, Ag, Cs, Hg, La, Sb -Acide Benzoïque et ses esters, -vitamines, - sucres, Lactones, Cétones,.....etc	[17] [23]

### **I.3.1. Glucides**

Contrairement au miel, la propolis n'est pas très riche en glucides. Le glucose, le ribofuranose, le fructose, ainsi que le saccharose sont les glucides les plus retrouvés dans la propolis [23].

### **I.3.2. Matière azotée**

La matière azotée de la propolis est représentée principalement par des acides aminés tels que l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'acide aspartique, la cystéine, l'acide glutamique, la glycine, l'histidine, l'hydroxyproline, l'isoleucine, l'ornithine, la phénylalanine, l'acide pyroglutamique et la sacrosine [3].

### **I.3.3. Matière minéral**

La propolis est constituée de 5 % de matières minérales et organiques. La matière minérale est représentée essentiellement par le baryum, le calcium, le chrome, le cobalt, le cuivre, l'étain, le fer, l'iode, le magnésium, le manganèse, le molybdène, le nickel, le potassium, le sodium, le silicium et le zinc.

D'autres éléments se trouvent sous forme de traces et sont représentés par le bore, le plomb et le silinium [24].

### **I.3.4. Vitamines**

Les vitamines les plus retrouvées dans la propolis sont les vitamines A, C, E et B (particulièrement la B1, la B2 et la B3) [3 ;24].

### **I.3.5 Stérols et les aldéhydes aromatiques**

Le cholinastérol, le stigmastérol, le B-dihydrofucostérol et le cholestérol sont les stérols constatés dans la propolis [23].

Les aldéhydes aromatiques les plus fréquemment retrouvés dans la propolis sont la vanilline, l'isovanilline et le benzaldehyde [24].

### **I.3.6. Substances diverses**

En plus des constituants énumérés, la propolis est constituée de xanthorrhéol, de perostilbène, de lactones, polysaccharides, d'acide coumarique, d'acide gentisique, d'acide hydrocaféique et d'acide salicylique [24].

## **I.4. Propriétés thérapeutiques**

La propolis est largement utilisée dans la prévention des maladies cardiovasculaires et le diabète [13 ;26] Grâce à ses propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes et anesthésiques, la propolis est recommandée pour diminuer la fréquence et l'intensité des crises d'asthme. Elle est également utilisée pour soigner les affections de l'oreille et les inflammations de l'iris.

Par ailleurs, la propolis est efficace pour le traitement des blessures, des brûlures et des ulcères d'estomac [25]. Elle est également recommandée pour diminuer la pression sanguine et le niveau du cholestérol et prévenir les caries dentaires [5].

## **I.5. Conservation**

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions. Mais il paraît néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de

préférence). De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa teneur en composants chimiques, ni ses activités biologiques [9].

*Généralité sur l'activité  
antioxydante*

### **I.1.6. Généralités sur l'activité antioxydante de la propolis**

De nombreuses maladies dégénératives reliées au vieillissement incluant le cancer, les maladies cardiovasculaires, les cataractes et le diabète sont la conséquence des dommages causés par les radicaux libres [27]. En effet, les substances radicalaires sont impliquées dans les réactions d'oxydations qui peuvent compromettre la fonction des acides gras, des protéines et des acides nucléiques [28].

Les radicaux libres peuvent être piégés ou neutralisés par des substances antioxydantes naturellement présentes dans les plantes médicinales, les fruits et les légumes [28].

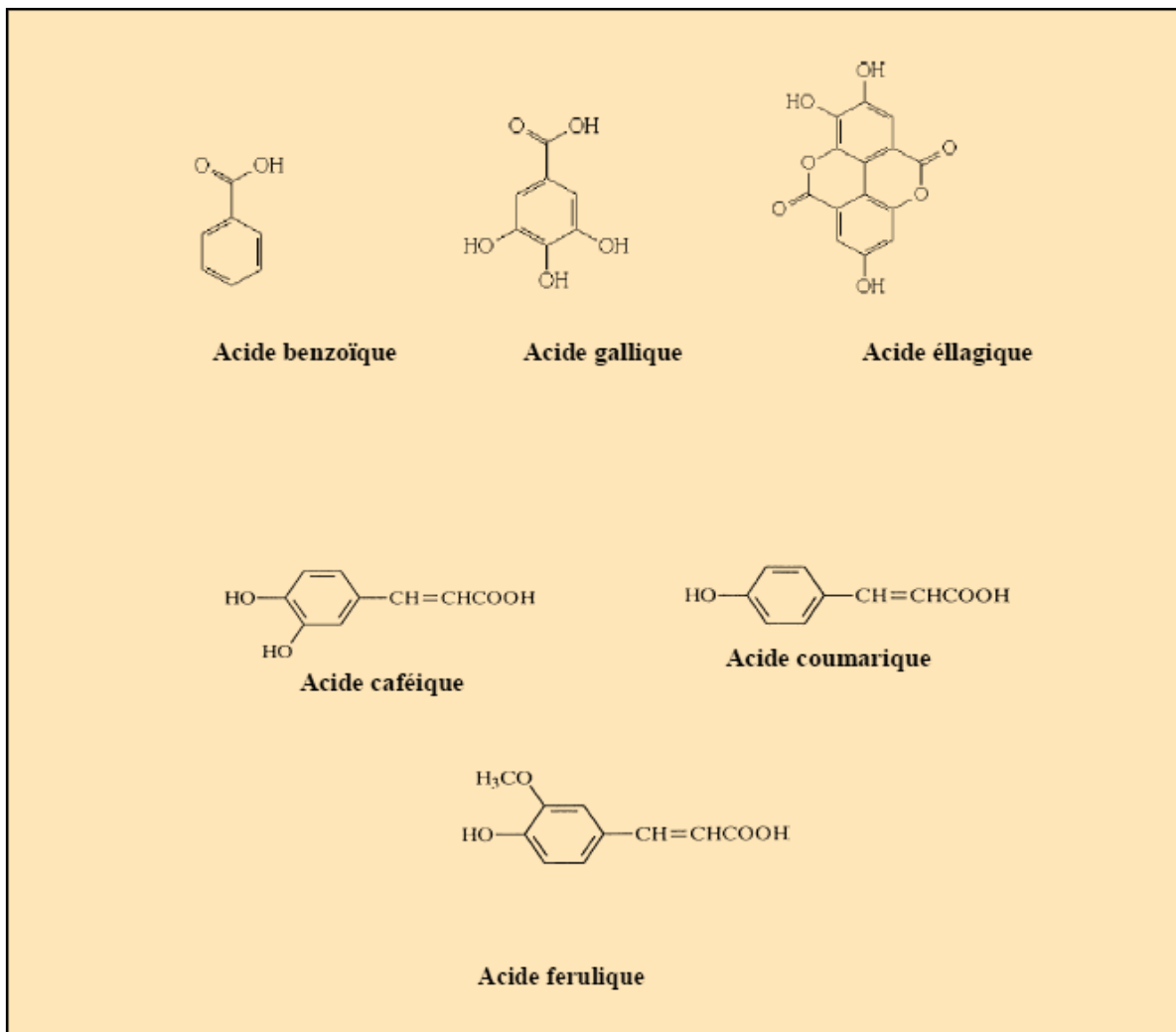
Etant donné que la propolis est élaborée à partir des plantes, il est tout à fait normal qu'ils contiennent ces substances antioxydantes. Les principaux agents antioxydants de la propolis sont les composés phénoliques, les flavonoïdes [29].

#### **I.1.6.1. Composés phénoliques**

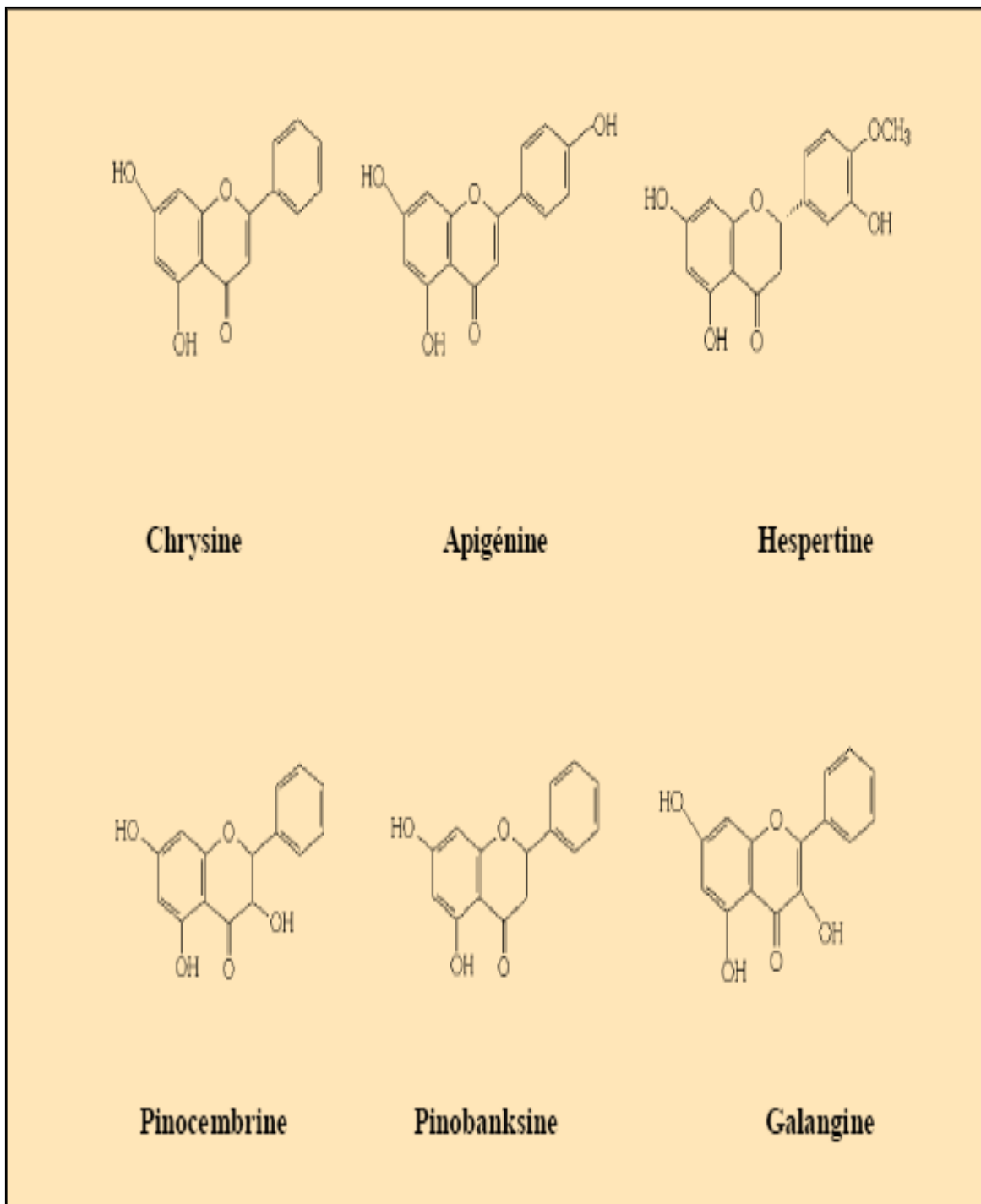
Les composés phénoliques sont des substances qui proviennent des sécrétions de bourgeons et des exsudats de divers organes des plantes. Ils sont représentés essentiellement par les flavonoïdes et les acides phénoliques [30].

Les composés phénoliques possèdent une structure formée d'au moins un noyau aromatique auquel sont greffés un ou plusieurs groupements hydroxyles qui leur permet de piéger et de neutraliser les radicaux libres [29].

Les acides phénoliques retrouvés dans la propolis sont essentiellement les acides galliques, caféique, benzoïque, coumarique, ferulique, et éllagique (figure 3). D'autre part, les flavonoïdes les mieux représentés dans la propolis sont la chrysin, l'apigénine, l'hеспertine, la pinocembrine, la Pinobanksine et la galangine (figure 4) [31 :32].



**Figure 3 :** Structure de quelques acides phénoliques présents dans la propolis [32].



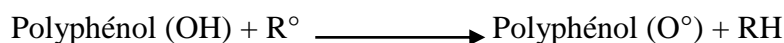
**Figure 4** : Structure de quelques flavonoïdes présents dans la propolis [32].

### I.1.6.2. Modes d'action des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent agir de différente manière sur les radicaux libres.

#### I.1.6.2.a. Capture directe des radicaux libres

La propriété antioxydante des polyphénols la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres (radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ), anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ) et radicaux peroxylipidiques) selon la réaction suivante :



Les polyphénols inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle ( $\text{C}_3\text{-OH}$ ) fortement réactif [33].

#### I.1.6.2.b. Chélation des cations métalliques

Les polyphénols inhibent la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ), le fer ( $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) et l'aluminium ( $\text{Al}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ) qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production des radicaux libres [34].

#### I.1.6.2.c. Inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire ainsi que de l'altération du fonctionnement des protéines membranaires [35 ;36].

Les composés phénoliques peuvent intervenir à différents niveaux de ce processus de peroxydation. Ils sont capables de capturer directement les

composés radicalaires, et ainsi d'interrompre la propagation de la réaction en chaîne radicalaire [37].

### I.1.7.3. L'évaluation de l'activité antioxydante

Jusqu'à maintenant, un grand nombre de méthodes *in vitro* capables de quantifier l'activité antioxydante ont été mises au point. En fonction du mécanisme impliqué, ces méthodes se basent sur le transfert soit d'un atome d'hydrogène soit d'un électron d'un antioxydant vers les radicaux libres [38]. Afin que ceux-ci deviennent stables (Tableau 02).

**Tableau II** : Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro* [39 ;40].

Classe de méthodes	Equation du mécanisme spécifique	Exemples
<b>Transfert d'atome d'hydrogène</b>	$\text{AH} + \text{X}^{\bullet} \longrightarrow \text{XH} + \text{A}^{\bullet}$ <p><b>AH</b> : antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène)  <b>X<sup>•</sup></b> : radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène)  <b>XH</b> : radical libre inhibé  <b>A<sup>•</sup></b> : antioxydant stable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Capacité d'absorption des radicaux libres (test ORAC).</li> <li>-Capacité de piégeage des radicaux libres (test TRAP).</li> <li>-Inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique.</li> <li>- Inhibition de l'oxydation des lipoprotéines basse densité.</li> </ul>
<b>Transfert d'électron</b>	$\text{M(III)} + \text{AH} \longrightarrow \text{AH}^{\bullet} + \text{M(II)}$ <p><b>M(III)</b> : antioxydant (donneur d'un électron).  <b>AH<sup>•</sup></b> : radical libre (accepteur d'un électron)  <b>AH<sup>•</sup></b> : radical libre inhibé.  <b>M (II)</b> : antioxydant stable.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Pouvoir réducteur (test FRAP).</li> <li>- Réduction du radical stable DPPH.</li> <li>- Contenu en phénols totaux (test FC).</li> <li>- Capacité antioxydante en équivalents trolox (TEAC)</li> </ul>

*Généralité sur l'activité  
antimicrobienne*

### I.1.8.Généralité sur l'activité antibactérienne de la propolis

Il y a encore peu de temps, on croyait que la sante de l'Homme ne serait bientôt plus menacée par des maladies infectieuses telles que la tuberculose, la pneumonie ou autres infections bactériennes grâce a l'administration d'un des nombreux antibiotiques d'origine naturelle, de synthèse ou d'hemisynthese disponibles sur le marche. Mais l'apparition de plus en plus fréquente de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ou d'espèces du genre *Enterococcus*, responsables de pneumonie ou d'infections nosocomiales a conduit de nombreux spécialistes a réagir a cette menace en recherchant de nouvelles molécules actives contre les bactéries, ou inhibitrices de leurs mécanismes de résistance afin de restaurer ainsi l'activité des antibiotiques existants [41].

Ces agents antibactériens sont classés selon leurs cibles bactériennes. Ils comprennent six groupes qui se différencient par leur mécanisme d'action :

- ✚ Inhibition de la synthese de la paroi bactérienne
- ✚ Inhibition de la synthese des protéines
- ✚ Inhibition de la membrane cytoplasmique
- ✚ Inhibition de la synthese des acides nucléiques
- ✚ Alternation de la membrane cytoplasmique
- ✚ Activités anti métabolique ou antagoniste compétitif [42].

La propolis est non seulement utilisée par les abeilles comme une matière de construction et de défense mais également pour réduire le développement des bactéries et des champignons dans la ruche [25].L'effet antimicrobien de la propolis est principalement due aux esters, aux acides phénoliques et aux flavonoïdes [2].

La propolis a une action directe sur un large spectre de microorganismes tels que les staphylocoques pathogènes et les levures pathogènes [43] .Elle agit

également indirectement par stimulation du système immunitaire en augmentant l'activité antimicrobienne des macrophages et l'activité lytique des cellules killers [4].

### **I.1.8.1. Méthodes pour l'essai de sensibilité aux antimicrobiens**

Les 3 méthodes suivantes sont les seules qui fournissent des résultats reproductibles et répétables quand elles sont réalisées correctement [44, 45] :

- ✚ diffusion en disque,
- ✚ dilution en bouillon,
- ✚ dilution en gélose.

#### **I.1.8.1.a.Méthode de la diffusion en disque**

La diffusion en disque se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques, tablettes ou bandes, dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. La diffusion en disque est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque.

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de cultureensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque d'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible.

Cependant, cela dépend de la concentration d'antibiotique contenue dans le disque et de sa diffusibilité.

Note : Les essais de diffusion en disque qui sont basés uniquement sur la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition en négligeant la taille de la zone d'inhibition ne sont pas acceptables pour les méthodologies AST [46].

### **I.1.8.1.a.a.Intérêts pour l'utilisation de la méthode de diffusion par disque**

La diffusion en disque est facile à mettre en œuvre, reproductible et ne nécessite pas d'équipement onéreux. Ses principaux avantages sont :

- ✚ un faible coût ;
- ✚ une facilité de modification des disques antimicrobiens si nécessaire ;
- ✚ elle peut être utilisée comme test de tri lorsqu'il y a un grand nombre d'isolats;
- ✚ elle peut identifier un sous-groupe d'isolats destinés à des tests ultérieurs par d'autres méthodes, telle que la détermination de la CMI.

La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données.

Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose [46].

### **I.1.8.1.2. Méthodes de dilutions en bouillon et gélose**

Le but des méthodes de dilution en bouillon et gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/litre). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la plus basse concentration suivante de l'essai. Les déterminations des CMI par la méthode des dilutions en série présentent donc une variation d'une dilution inhérente à la méthode.

Les gammes antimicrobiennes doivent entourer à la fois les critères interprétatifs (sensible, intermédiaire et résistant) pour une combinaison bactérie/antimicrobien spécifique, et les témoins qualité de référence des organismes appropriés.

Les méthodes de sensibilité antimicrobienne en dilution semblent être plus reproductibles et quantitatives que la diffusion en disque en gélose. Cependant, des antibiotiques sont habituellement testés en dilutions douilantes, qui peuvent donner des résultats inexacts de CMI.

Tout laboratoire qui prévoit d'employer une méthode de dilution et de préparer ses propres réactifs et dilutions d'antibiotiques doit avoir la capacité d'obtenir, préparer et maintenir les solutions stocks appropriées de catégories de réactifs antimicrobiens et de produire des dilutions de travail de façon régulière.

Il est alors essentiel que de tels laboratoires fassent appel à des organismes de contrôle-qualité afin d'assurer l'exactitude et l'étalonnage de leurs procédures [46].

### **I.8.1.2.a.Dilution en bouillon**

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien (habituellement dilutions en série de 2 en 2) dans un milieu liquide de composition prédéterminée et documentée. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) (figure 05) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution)

(Figure 06).

De nombreuses plaques de microtitration contenant des antibiotiques pré dilués dans les puits sont disponibles dans le commerce. L'utilisation de lots identiques de plaques de microdilution peut permettre de réduire au minimum la variation qui peut apparaître en raison de la préparation et de la dilution des antimicrobiens provenant de différents laboratoires.

L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre laboratoires. Étant donné que la plupart des essais antimicrobiens de microdilution en bouillon sont préparés commercialement, cette méthode est moins flexible que la dilution en gélose ou que la diffusion en disque concernant l'ajustement aux besoins de changements du programme de surveillance/contrôle. Puisque l'achat de l'équipement et des gammes d'antimicrobiens peut être coûteux, cette méthodologie peut ne pas être réalisable dans certains laboratoires [46].

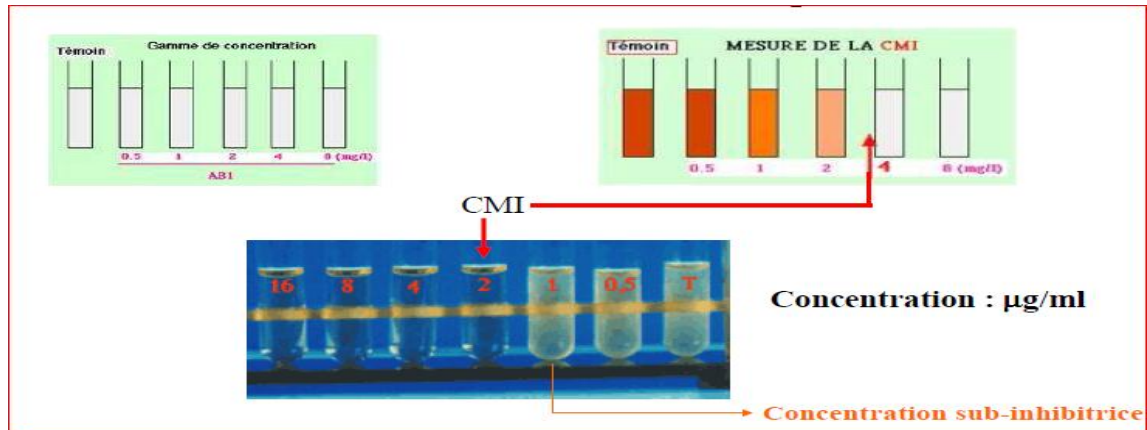


Figure 05 :Macrodilution en milieu liquide [47].

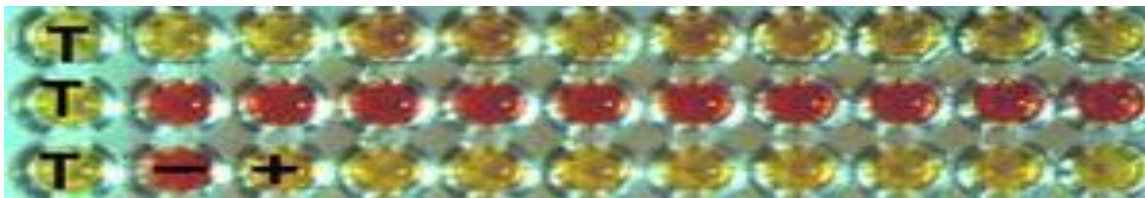


Figure 06 :Microdilution en milieu liquide [47].

### I.8.1.2.b.Dilution en gélose

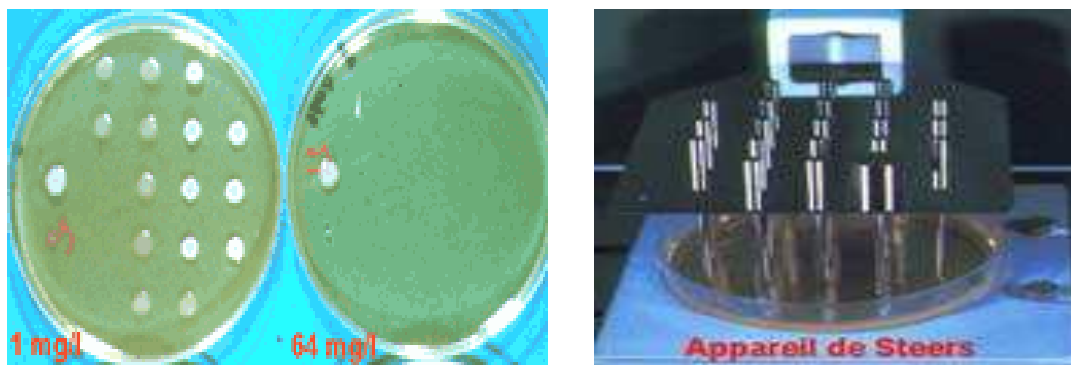
La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. Ces résultats sont souvent considérés comme les plus fiables pour la détermination d'une CMI pour la combinaison de l'essai bactérie/antimicrobien (figure 07).

Les avantages de la dilution en gélose comprennent :

- ✚ la capacité de tester plusieurs bactéries sur le même ensemble de boîtes de gélose en même temps (à l'exception des bactéries envahissantes) ;
- ✚ le potentiel d'améliorer l'identification des points finaux de la CMI et de développer la gamme de concentration antibiotique ;
- ✚ la possibilité de semi-automatiser la méthode en utilisant un appareil de réplique des inoculum. Des appareils de réplique des inoculum sont

disponibles commercialement et ils peuvent transférer entre 32 et 36 inoculums bactériens différents sur chaque boîte de gélose.

- ✚ La méthode de dilution en gélose présente aussi certains désavantages, par exemple :
- ✚ quand ils ne sont pas automatisés, ces tests sont très laborieux et exigent des ressources.
- ✚ une fois les boîtes préparées, elles doivent être utilisées dans la semaine ;
- ✚ il n'est pas toujours facile de lire les points finaux et la pureté de l'inoculum n'est pas facile à évaluer [46].

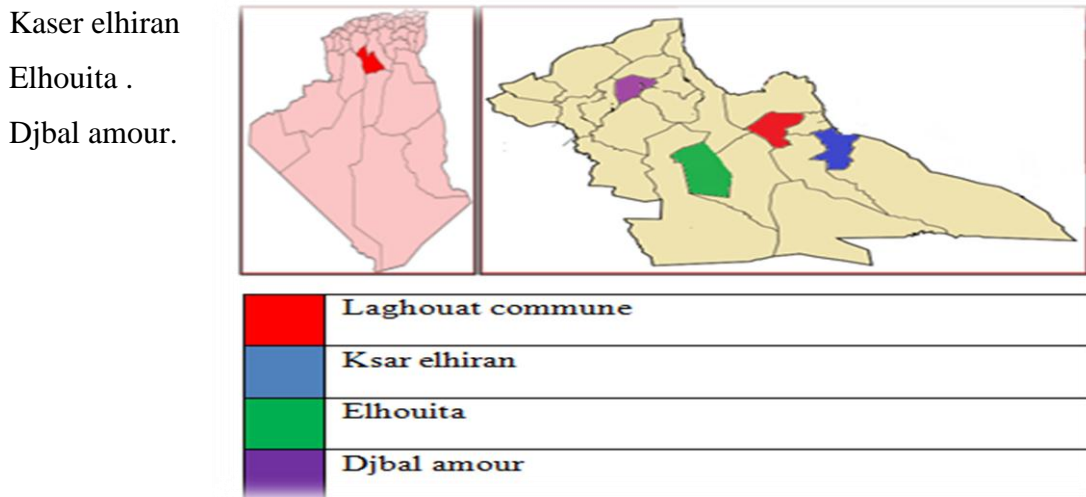


**Figure 07 :** Dilution sur milieu solide gélosé.

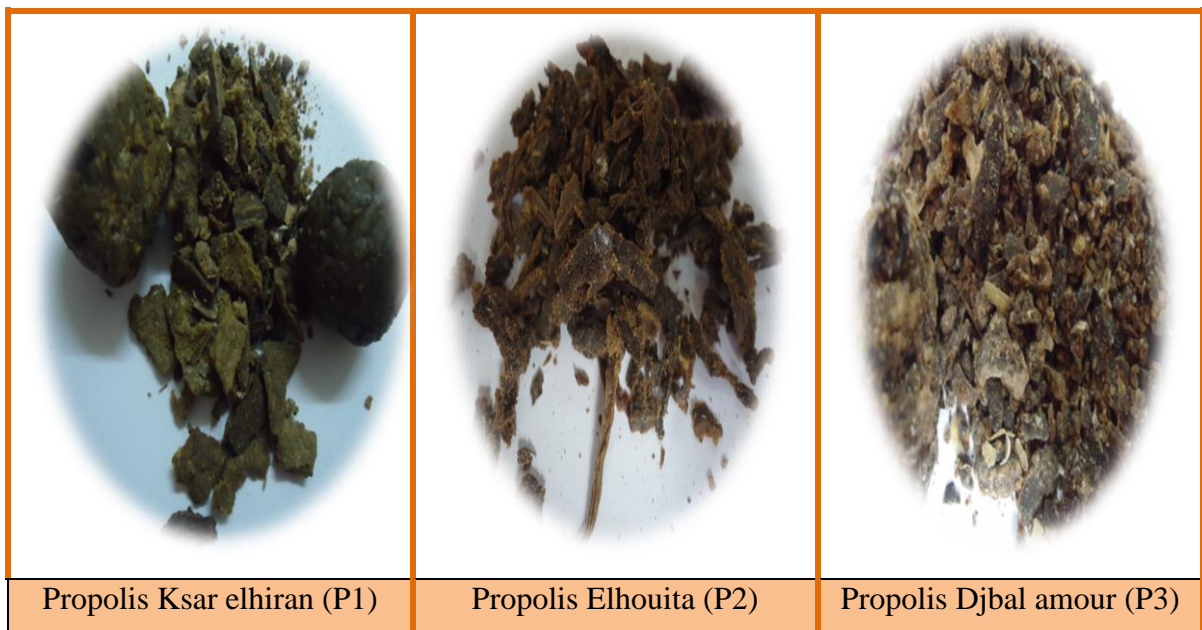
## ***II-Matériels et Méthodes***

**II.1.matériel biologique**

Les échantillons de propolis récoltés par deux races d’abeilles (*Apis mellifica intermissa* (telliene) et *Apis mellifica sahariensis* (saharienne) à la fin de février et au début de moins de Mars 2013 auprès des apiculteurs de trois stations de la wilaya de Laghouat (figure 08) ;(Tableau III).



**Figure 08 :** Cartes géographique montrant les stations de récolte.



**Figure 09 :** les trois échantillons de propolis

La récolte a été effectuée par le raclage des cadres .et les échantillons ont été conservées à froid a 4 C° et à l’abri de la lumière.

L’Origine de nos échantillons de propolis dépend de la flore botanique locale qui caractérise la région (Tableau III).

**Tableau III** : Origine de propolis et les conditions de récolte.

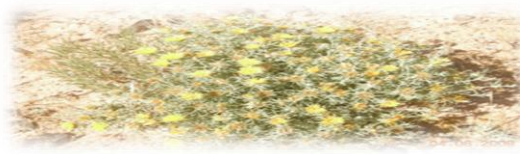
<b>Propolis</b>	<b>Localisation de station de récolte</b>	<b>Climat</b>	<b>Origine botanique (La plante majoritaire)</b>	<b>La race d’abeille</b>	<b>Couleur</b>	<b>Date</b>
<b>P1</b>	Est de Laghouat	Saharien aride	<i>Zizyphus lotus</i> <b>Sedra</b>	Apis mellifica sahariensis	Marron	Mars 2013
<b>P2</b>	Ouest de Laghouat	Saharien aride	Les plantes locales	Apis mellifica sahariensis	Marron	Mars 2013
<b>P3</b>	Nord de Laghouat	Tellien Semi aride	Peuplier loubaina	Apis mellifica intermissa	Marron	Février 2013

**Tableau IV:** Quelques exemples des plantes locales de la région de Laghouat (origine botanique de propolis [48]).



*Teucrium polium*, *Polium*

Appellations locales : Djaïda, Khayata



*Anvillea radiata*,

Appellations locales : Nougd,



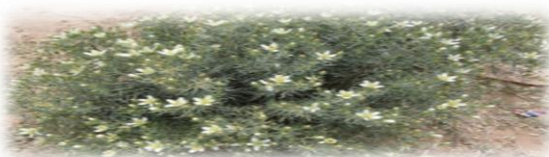
*Artemisia campestris*

Appellations locales : Alala, Dgoufet



*LasERPitium gummiferum* (*margotia gummifera*), *Thapsia gummifère*.

Appellations locales: Haltit,



*Peganum harmale*

Appellations locales : Le Harmel,



*Thapsia garganica*, *Thapsia*

Appellations locales : Bounnafaa, Dérias,



*Zizyphus lotus*, *jujubier sauvage*

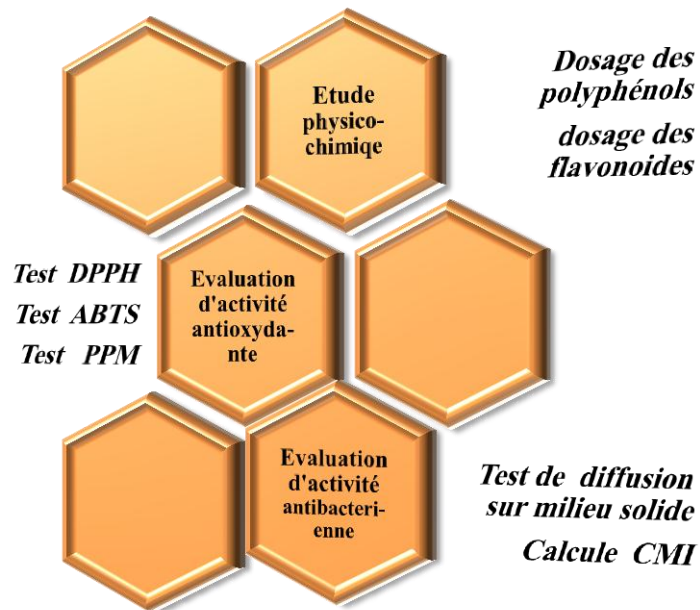
Appellations locales : Sedra, .



*Pistacia atlantica*, *Pistachier de l'atlas*

Appellations locales : Betoum,

### II.2.méthodes d'analyses



#### II.2.1.Etude physico-chimique

##### II.2.1. 1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction solide-liquide est la méthode utilisée pour extraire les composés phénoliques du matériel végétal. Cette méthode est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire ou de séparer par dissolution dans un liquide un ou plusieurs composants (solide ou liquide) mélangé à un solide [49].

La solubilité des composés phénoliques est régie par le type de solvants utilisés (polarité), par le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que par leur interaction avec les autres constituants alimentaires et par la formation de complexes insolubles. Par conséquent, il n'y a pas de procédure uniforme ou complètement satisfaisante et adaptée pour l'extraction de tous les composés phénoliques ou une classe spécifique des substances phénoliques dans les substances végétales [50].

Le Méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'eau, l'acétate d'éthyle et, dans une moindre mesure, le propanol, le diméthylformamide, et leurs combinaisons sont fréquemment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques [50].

### II.2.1.2. Macération

a été effectué par une méthode adaptée selon [51]. Une quantité de 5 g de propolis coupé en petits morceaux (3 à 5 mm) le découpage de la propolis a été réalisé de façon à pouvoir récupérer des morceaux très fins dans le but d'optimiser l'extraction [52]. Et les macérer dans le solvant d'extraction dans 100 ml d'éthanol (absolu), à une température ambiante, sous agitation douce pendant 6 jours.

L'extrait éthanolé est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur verre fritté (entonnoir N°03), L'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur à 45 °C ; après la pesé du résidu sec, il est repris dans 100 ml d'éthanol absolu et conservé à basse température (4°C) jusqu'à la date des tests biochimique.

### II.2.1.3. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits éthanolé de Propolis (EEP) a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon [53] qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ ) phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [54]. Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le éthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 mg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ g d'extrait).

### II.2.1.4. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium [55] est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits éthanoïque de Propolis (EEP), 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans l'éthanol) est ajouté 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2% dans l'éthanol) ; après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

### II.2.2. l'évaluation de l'activité antioxydantes des extraits éthanoïques de Propolis

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques (EEP), a été réalisée par un test chimique in vitro. Dans ce test chimique, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les antioxydantes de nos extraits phénoliques en employant trois types de radicaux sont: le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , le radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  et le radical PPM.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et/ ou l'équivalence en Vitamine C ou de Trolox obtenu par spectroscopie UV-Visible.

Le pourcentage d'inhibition qui permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon est calculé selon la formule suivante:

$$\text{IP (\%)} = [(a-b) / (a)] \times 100$$

Avec :

a : absorbance de la solution oxydée en absence d'agents antioxydant,

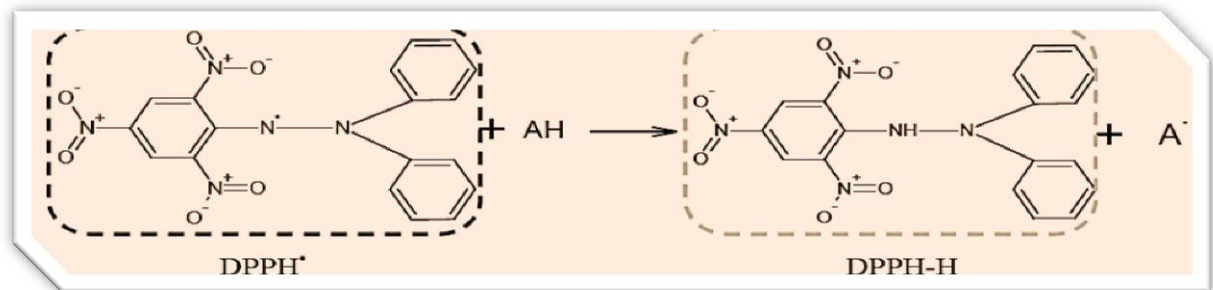
b : absorbance de la solution oxydée en présence d'agents antioxydant.

La méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration de standard.

### II.2.2.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH• (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)

#### ✚ Principe

La méthode du DPPH• introduite par le Blois [56] est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH• en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPHH, (figure 10) .La réduction du DPPH• en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette



**Figure10:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce Radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits éthanoïques de propolis via le test DPPH, effectuée par la méthode décrite dans la littérature [51].

#### ✚ Protocole

2 ml d'une solution éthanoïque de DPPH (60 µM) a été mélangé 50 µl d'extrait éthanoïques de Propolis, Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 20 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 2 ml de la solution de DPPH et de 50 µl d'éthanol.

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires.

La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IP (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ IP} = [ (a - b) / a \times 100 ]$$

Avec

a: absorbance du témoin DPPH<sup>•</sup> En absence d'EEP après 20 minutes.

b: absorbance des EEP en présence DPPH<sup>•</sup> après 20 minutes.

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % IP correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les % IP.

A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'EC50. Notons que le pourcentage d'inhibition (IP%) est inversement proportionnel à EC50. (Concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH<sup>•</sup>) [57].

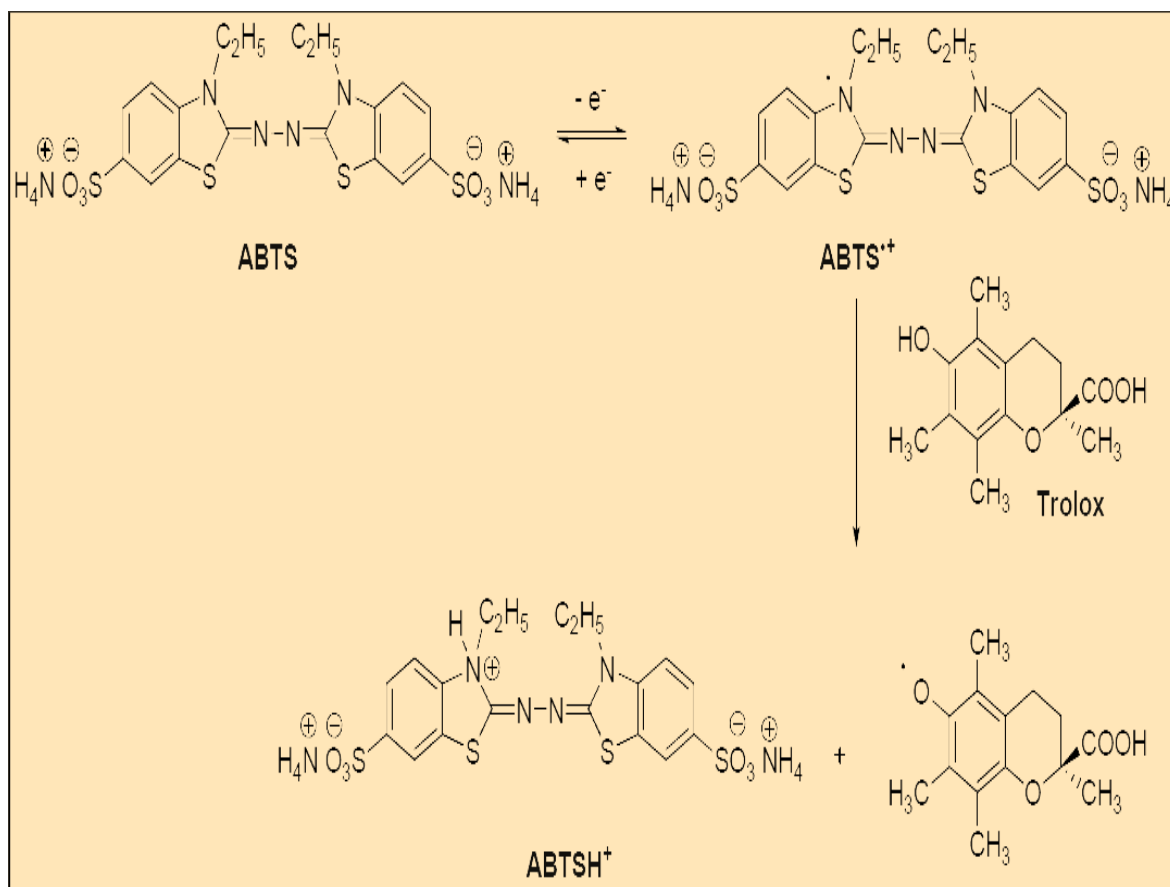
Une courbe d'étalonnage a été réalisée suivant la même procédure citée précédemment avec des solutions de vitamine C préparées à des concentrations différentes à titre comparatif du pouvoir antiradicalaire de standard vitamine C et nos EEP.

### II.2.2.2. Test ABTS ou détermination du TEAC

#### Principe

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) (figure 11 ). Au cours de ce test le sel d'ABTS perd un électron pour former un radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner le cation ABTS<sup>+</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

Du fait de sa simple mise en œuvre, l'analyse ABTS a trouvé de nombreuses applications en recherche et en industrie. De plus, l'ABTS est soluble en milieux aqueux et organique et peut être utilisé dans différents milieux pour évaluer la capacité antioxydante d'extraits.



**Figure 11** : Formation et piégeage de radicale cation ABTS<sup>•+</sup> Par de Trolox.

### Protocole

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits éthanoïques de propolis via le test ABTS, effectuée par la méthode décrite dans la littérature [51].

7 mmol d'ammonium ABTS sont dissoutes dans l'eau et traitées avec 2.45 mmol de persulfate de potassium, que l'on laisse à température ambiante pendant 12 à 16h pour donner une solution bleue-noire. La solution est ensuite diluée dans l'éthanol ou une solution tampon (pH 7,4) jusqu'à obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm.

Pour déterminer l'activité de balayage, 3 ml de solution diluée d'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 50 µl l'extrait éthanoïques de Propolis, Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 5 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 734 nm contre un témoin composé de 3 ml la solution d'ABTS<sup>•+</sup> et de 50 µl de éthanol.

La préparation des échantillons et du témoin est réalisée dans les mêmes conditions opératoires.

La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % IP (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ IP} = \left[ \frac{(A_0 - A_{t_5})}{A_0} \times 100 \right]$$

Avec

$A_0$ : absorbance du témoin (ne contenant aucun antioxydant) après 5 minutes

$A_{t_5}$ : absorbance des EEP mesurés après 5 minutes

En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le % IP correspondant, nous avons établi une régression linéaire entre les différentes concentrations et les % IP. A partir de cette régression, nous avons déduit la valeur correspondante d'EC50. (Concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en ABTS<sup>•+</sup>).

L'activité des composés est alors exprimée aussi par la Capacité Antioxydante Equivalente Trolox (TEAC) qui correspond à la capacité antioxydante d'une solution de Trolox (1 mM) (analogue hydrophile de la vitamine E). Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace [58].

La droite  $\% \text{ Inh} = f(C)$  est tracée afin de déterminer le TEAC. La pente de cette droite est extraite et rapportée à la pente de la droite de référence du Trolox. Cette droite est établie pour chaque nouvelle solution d'ABTS<sup>•+</sup>.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée suivant la même procédure citée précédemment, avec des solutions de trolox préparées à des concentrations différentes à titre comparatif du pouvoir antiradicalaire de standard trolox et nos EEP.

### II.2.2.3. Test PhosPhoMolybdate

#### Principe

Le test du PPM (PhosPhoMolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'étage d'oxydation (VI) à l'étage d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) [59].

#### Protocole

La méthode consiste à introduire dans un tube Eppendorff 300 µl chaque concentration d'extraits éthanoïques de Propolis (une série de dilution décroissante) mélangée à 3 ml d'un réactif composé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 300 µl d'éthanol mélangé avec 3 ml du réactif mentionné ci-dessus.

Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. La vitamine C choisie comme standard qui a été traitée dans les mêmes conditions.

L'activité antioxydant est mesurée aussi avec un terme appelé **AEAC** : qui présente l'activité antioxydante en équivalant de l'acide ascorbique des produits étudiés (**Ascorbic Acide Equivalent Cabacity**). Plus la valeur de AEAC est importante, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important [60].

La droite l'absorbance en fonction de la concentration ( $A = f(C)$ ) est tracée afin de déterminer l'AEAC. La pente de cette droite est extraite et rapportée à la pente de la droite de référence du Vitamine C .et de déterminé déduire aussi EC50.(concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale ).

**II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne**

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Bactériologie de l'hôpital de Laghouat Ahmed Benadjila dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne ; antifongique des extraits éthanoïques de propolis. Par la technique de diffusion en milieu gélosés solide. Par la détermination de la sensibilité des souches microbiennes et la concentration minimale inhibitrice (CMI) (s).

**II.2.3.1. Identification et isolement des souches**

Les tests antimicrobiens ont été opérés sur des souches bactériennes, ( Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* ;( Gram positif *Staphylococcus aureus*) et levure *Candida albicans*.(Tableau ).

**Tableau V** : Références et origines des microorganismes .

	<b>Souche bactérienne</b>	<b>Code référence</b>	<b>source</b>
<b>Gram négatif (-)</b>	<i>Escherichia coli</i>	25922	Institut Pasteur d'Alger
	<i>Proteus mirabilis</i>	isolat	Au laboratoire (urine d'une malade)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Institut Pasteur d'Alger
<b>Gram positif (+)</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Institut Pasteur d'Alger
<b>levure</b>	<i>Candida albicans</i>	isolat	Au laboratoire (urine d'une malade)

Les souches ont été déjà identifiées et isolées par les cliniciens microbiologiste de laboratoire .Par des tests microscopique coloration de Gram pour identifier les caractères morphologiques : Forme de la cellule (sphérique, bâtonnet), aspect de la cellule (unicellulaire, en double, en amas), mobilité, et par d'autre test mini-galeries biochimiques Pour identifier leurs caractères biochimiques.

Elles ont été conservées par la suite au réfrigérateur dans des tubes à essai contenant de la gélose inclinée ou sur milieu de conservation.

Toutes les souches utilisées pour la préparation d'inoculum ont été auparavant repiquées et isolet (obtention de cultures ne contenant qu'un seul type de germe) sur gélose nutritive dans des boites de pétri et incubées à 37° C pendant 18 à 24 heures.et sur milieu Sabouraud pour les Candida à 30-25°C pendant 24-48 heures.

### **II.2.3.2. Stérilisation du matériel**

On stérilise à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes .

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes (inoculums) ainsi que dans la préparation des dilutions de nos échantillons.

On stérilise à l'étuve à 121° C pendant 15 minutes :

Les disques en papier Whatman (6 mm de diamètres) après enrobage dans du papier aluminium.

### **II.2.3.3.Préparation des dilutions des extraits à tester**

Les extraits éthanoïques de propolis ont été dessous dans diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Le test a été effectué à différentes concentrations des extraits : 5g/ml (100%), 2.5 g/ml (50%), 1.25 g/ml (25%);0.625 g/ml (12.5%) ; 3.15g/ml (6.25%) ;1.56g/ml (3.15%) ; 0.78g/ml (1.56%) ; 0.39g/ml (0.78%),0.19g/ml (0.39%), 0.009g/ml(0.19%).

### **II.2.3.4. Protocole d'évaluation de l'activité antibactérienne**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion de disques.

### II.2.3.4.a.Milieu

Gélose bouillon nutritif, Gélose Mueller Hinton, pour les bactéries et Sabouraud pour Candida sont coulées en boîtes de Pétri et séchées avant l'emploi.

#### Composition du Bouillon Nutritif

- Extrait de viande : 5g/l ;
- Peptone pancréatique : 10g/l ;
- Chlorure de Sodium : 5g/l ;
- Eau distillée : 1l

#### Composition du Milieu Mueller Hinton

- Peptone de viande : 20 g/l ;
- Peptone de caséine : 175 g/l ;
- Amidon : 15 g/l ;
- Agar-agar: 130 g/l ;
- Eau distillée : 1 l ;
- pH= 7,4 ± 02.

#### Composition du Sabouraud gélose (les levures)

- Neopeptone: 30g;
- Agar-agar: 20g;
- Eau distillée : 1l

### II.2.3.4.b.Préparation des inoculums

- Dans la zone septique du bec bunsen et à partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches à tester.

- Décharger l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 MC Farland.

- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

### **II.2.3.4.c. Ensemencement et dépôt des disques**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne.
- L'essorer en le pressant fermement(en le tournant) sur la paroi interne du tube.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.
- Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés ensuite d'une petite quantité des extraits (plus de 10 µl par disque) et déposés sur la surface de la gélose inoculée.
- Des disques de papier Whatman imprégnés de DMSO servant de témoin négatif, sont aussi déposés sur la surface de la gélose inoculée. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries 25-35 C° pour les candidas.

### **II.2.3.4.d. Lecture des antibiogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite à l'aide d'un pied à coulisse, elle a été réalisée à l'extérieur de la boîte. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée. Et en déduit la sensibilité des souches et la CMI qui correspond à la concentration pour laquelle il n'y a pas de culture visible (une à deux colonies résiduelles sont acceptées)

### ***III-Résultats et discussions***

### III.1.1.Etude physico-chimique

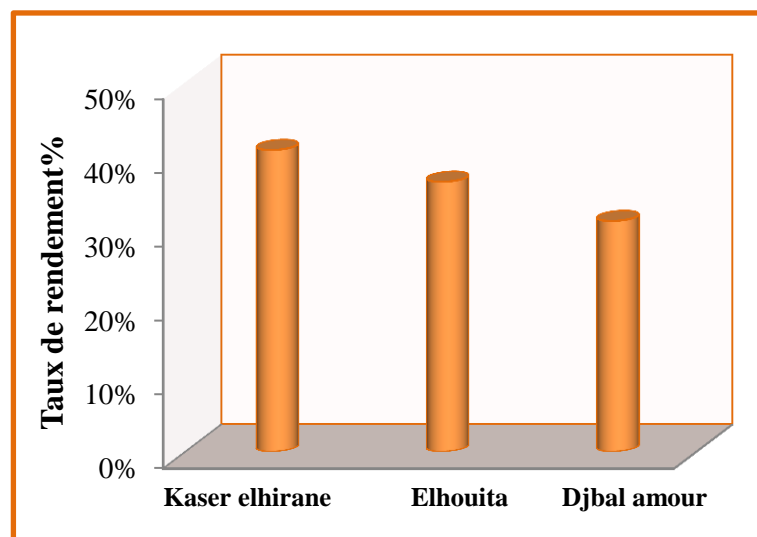
#### III.1.1.1.Rendements des extractions

La détermination des rendements d'extractions effectuées nous a permis de rapporter nos résultats de dosage au poids initial de propolis. Ces rendements sont exprimés en pourcentage. (Tableau VI) (Figure 12).

**Tableau VI** : Les rendements des extraits éthanoïques de propolis

Extrait	Aspect et couleur	Teneur %
EEP1	Jaune marron visqueux	40.8
EEP2	Jaune marron visqueux	36.5
EEP3	Jaune marron visqueux	31.2

Les rendements des extraits éthanoïque de propolis (EEP) ont donnés des valeurs varient de 40.8 % à 31.2% ces résultats sont en accord avec les résultats d'une étude faite sur l'extraction des propolis algériennes avec des solvants polaires purs de taux d'extraction allant de 32,42 à 39,36 % .pour l'éthanol. Tous ces résultats abondent dans le même sens que ceux trouvés par notre étude.



**Figure 12** : Comparaison entre des taux de rendement en extraits secs des trois variétés de propolis

On constate une augmentation de 31.2% , 36,5 à 40,8 à % ; à respectivement pour Djbal amour ELhouita et Kaser elhirane

On peut dire que le taux d'extraction varie d'un échantillon à un autre selon la région de provenance, qui peut être liée au différent facteur : climat, la race d'abeille, et l'origine botanique de chaque échantillon. [52].

En plus de ces aspects quantitatifs, quel que soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

### III.1.1.2.La quantification des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait de propolis a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 13) et exprimée en milligrammes par un gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau VII).

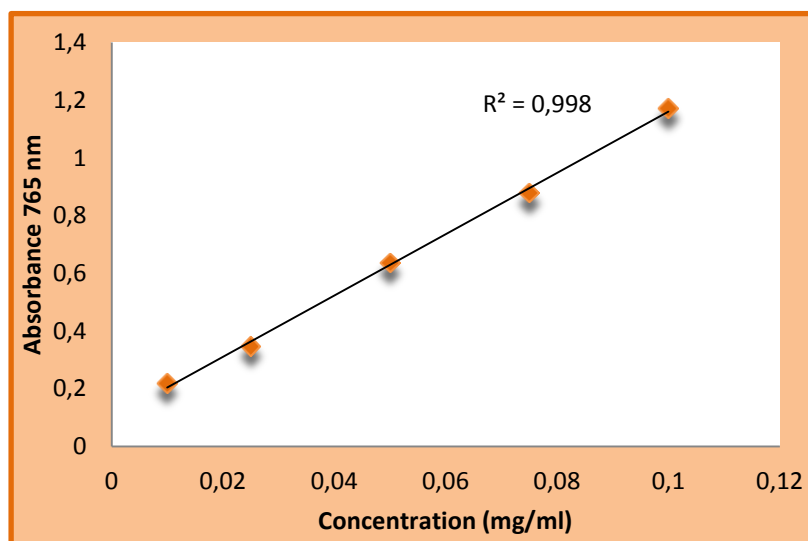
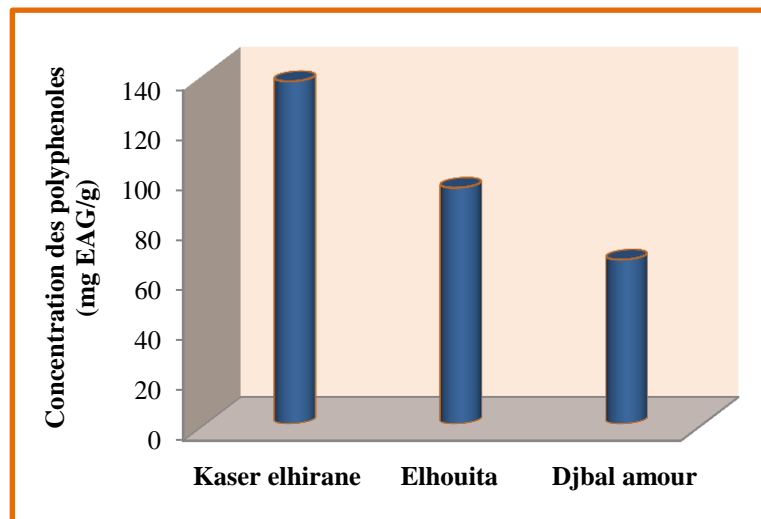


Figure 13 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

**Tableau VII:** Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoïques de propolis (EEP).

Extrait	Teneur des polyphénols (mg EAG/g)
EEP1	136.86
EEP2	94.34
EEP3	65.63

les valeurs des teneurs en phénols totaux pour les différents échantillons de propolis ont montrés des valeurs variant de 136.86 à 65.63 mg/g , la valeur la plus élevée en phénols totaux avec une concentration moyenne de 136.86, mg/g est observé pour l'EEP de Kaser elhirane suivie par extrait d' Elhouita en moyenne de 94.34 mg/g, et de moyenne de 65.63 mg/g d'EEP de Djbal amour (figure 14).

**Figure 14 :** La teneur en polyphénols des extraits éthanoïques de propolis.

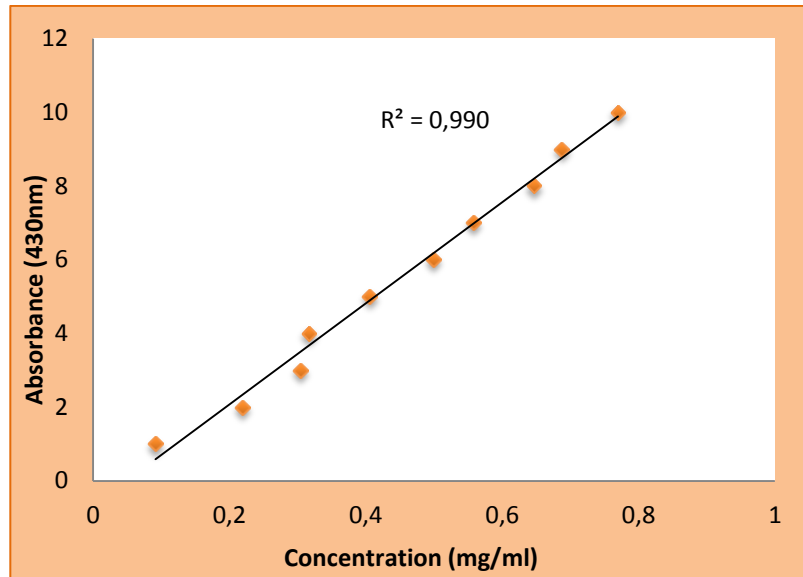
Nous remarquons que la quantité en phénols totaux varie d'un extrait à une autre ; et les trois EEP sont riche en composé phénolique. En comparaison avec des teneurs obtenus dans d'autres travaux (Tableau VIII). Nous remarquons que nos résultats s'accordent avec les résultats de ces travaux.

**Tableau VIII** : Teneurs des polyphénols de quelque région dans le monde.

Provenance	Polyphénols (mg équivalent de l'acide gallique /g de propolis)	Références
<b>Santiago :</b>		
- San martin	80 – 131	
- Banda	115 -253	
- Capital	86 – 209	[61]
- Figurau	71 - 130	
<b>Chine : - Yuman</b>	64,7 ± 1,5	[62]
- Brésil	120 ± 2,5	
- Sud Afrique	99,5 ± 4,4	[63]
- Uzbekistan	147 ± 6,7	

### III.1.1.3.La quantification des flavonoïdes

La teneur en flavonoïde de chaque extrait de propolis a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 15) et exprimée en milligrammes par un gramme de la matière sèche équivalent en quercétine. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IX.

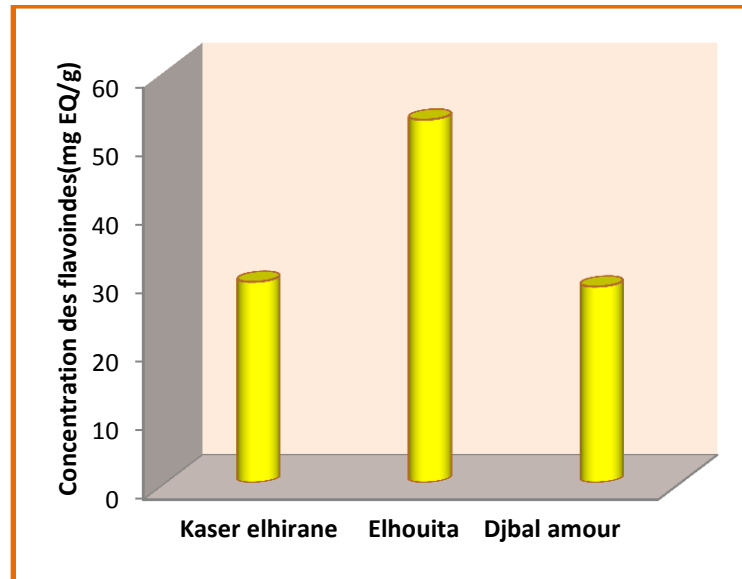


**Figure 15** : Courbe d'étalonnage de quercetine.

**Tableau IX** : Les teneurs en flavonoïdes des extraits éthanoïques de propolis (EEP).

Extrait	Teneurs des flavonoïdes (mg EQ /g)
EEP1	29.20
EEP2	52.81
EEP3	28.51

les valeurs des teneurs en flavonoïdes pour les différents échantillons de propolis ont montrés des valeurs varient de 28.51 à 52.81 mg/g ,la valeur la plus élevé a été observé pour l'EEP d'Elhouita de concentration moyenne de 52.81 mg/g suivie par Kaser elhirane en moyenne de 29.20 mg/g, et de 28.51 mg/g pour Djbal amour (figure 16).



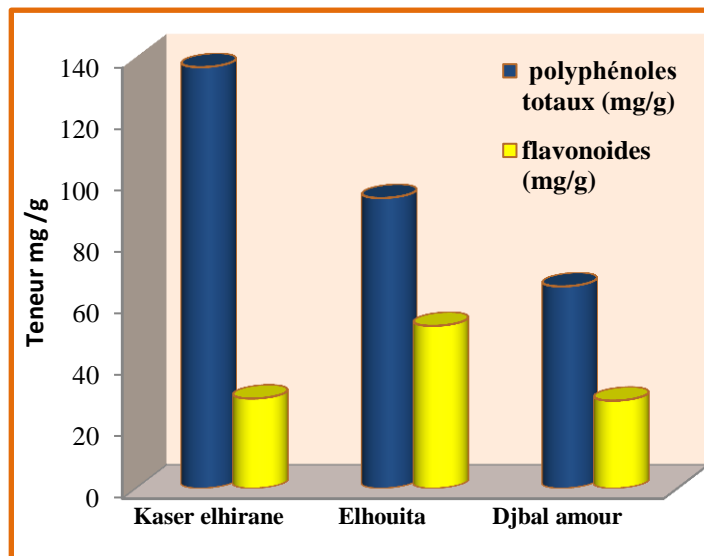
**Figure 16** : La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoïques de propolis

Nous remarquons que la teneur en flavonoïdes varie d'un extrait à une autre, et les trois extraits éthanoïques de propolis sont moyennement riche en flavonoïdes, En comparaison aux résultats approuvé lors d'une étude réalisée sur la propolis de la Kerrie, qui montre une teneur en flavonoïdes totale allant de 16 – 136 mg EQ / g de propolis [64]. Ces résultats sont proches des résultats obtenus dans notre étude.

Ainsi les teneurs des flavonoïdes de Kaser elhirane et Djbal amour ont des teneurs presque égaux malgré la différence en origine botanique, en race d'abeille et même en origine climatique. Cela peut être explique par : soit la structure chimique des flavonoïdes des deux EEP est la mémé, puisque les deux ont subi même type d'extraction, soit par les conditions de récoltes ; plus précisément le moment de récolte par l'abeille, puisque les flavonoïdes sont des métabolites secondaires dont le facteur de temps est important dans son métabolisme et son teneur .cela va être interpréter par les suites des activités.

Si nous comparons la teneur en phénols totaux avec ceux de flavonoïdes (figure16) nous observons qu'il est clair, que les teneurs en flavonoïdes dans nos extraits, sont inférieures aux teneurs en phénols totaux, et que les flavonoïdes des extraits d'Elhouita et de Djbal amour constituent fraction d'  $\frac{1}{2}$  de teneur en polyphénols. A l'exception d'extrait de Kaser elhirane où les flavonoïdes ont constitués fraction d'  $\frac{1}{5}$  des polyphénols dont son origine botanique majoritaire est *Zizyphus lotus*.

les résultat d'extrait de kaser elhirane ont comparé avec une étude faite [48] sur cette plante locale (Laghouat) *Zizyphus lotus* a montré que la teneur en polyphénols de 6.09 mg/g et de 0.83 mg/g en flavonoïdes qui présente 1/7 en polyphénols est presque proche de la fraction de celle d'extrait Kaser elhirane , ce qui prouve que la propolis dépend principalement de son origine botanique.



**Figure 17:** Comparaison entre Les teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits éthanoïques de propolis.

Et nous remarquons aussi d'après la figure 17 que ces résultats indique la richesse de nos extraits par d'autres composés non flavonoïdiques.(Acide phénoliques, tanins, stilbènes... ) .a éliminé l'EEP Elhouita.

### III.1.2.L'évaluation de l'activité antioxydante

#### III.1.2.1.Test DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits éthanolé de propolis vis-à-vis le radical DPPH<sup>•</sup> a été évalué spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction de DPPH<sup>•</sup> (I%), pour une concentration en antioxydant d'EEP. Le paramètre « EC50 » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH<sup>•</sup>) a été calculé pour chaque extrait. De même, nous avons calculé les EC50 de la vitamine C choisis comme antioxydants standard dans ce test .Plus la valeur d'EC50 est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante [65.66]. Les résultats sont groupés dans le Tableau X et présentés dans figure 18.

**Tableau X :** Activité antiradicalaire des extraits éthanolé de propolis et de Vitamine C.

Extrait	EC50 (mg/ml)
EEP1	0.058
EEP2	0.112
EEP3	0.484
Vitamine C	0.006

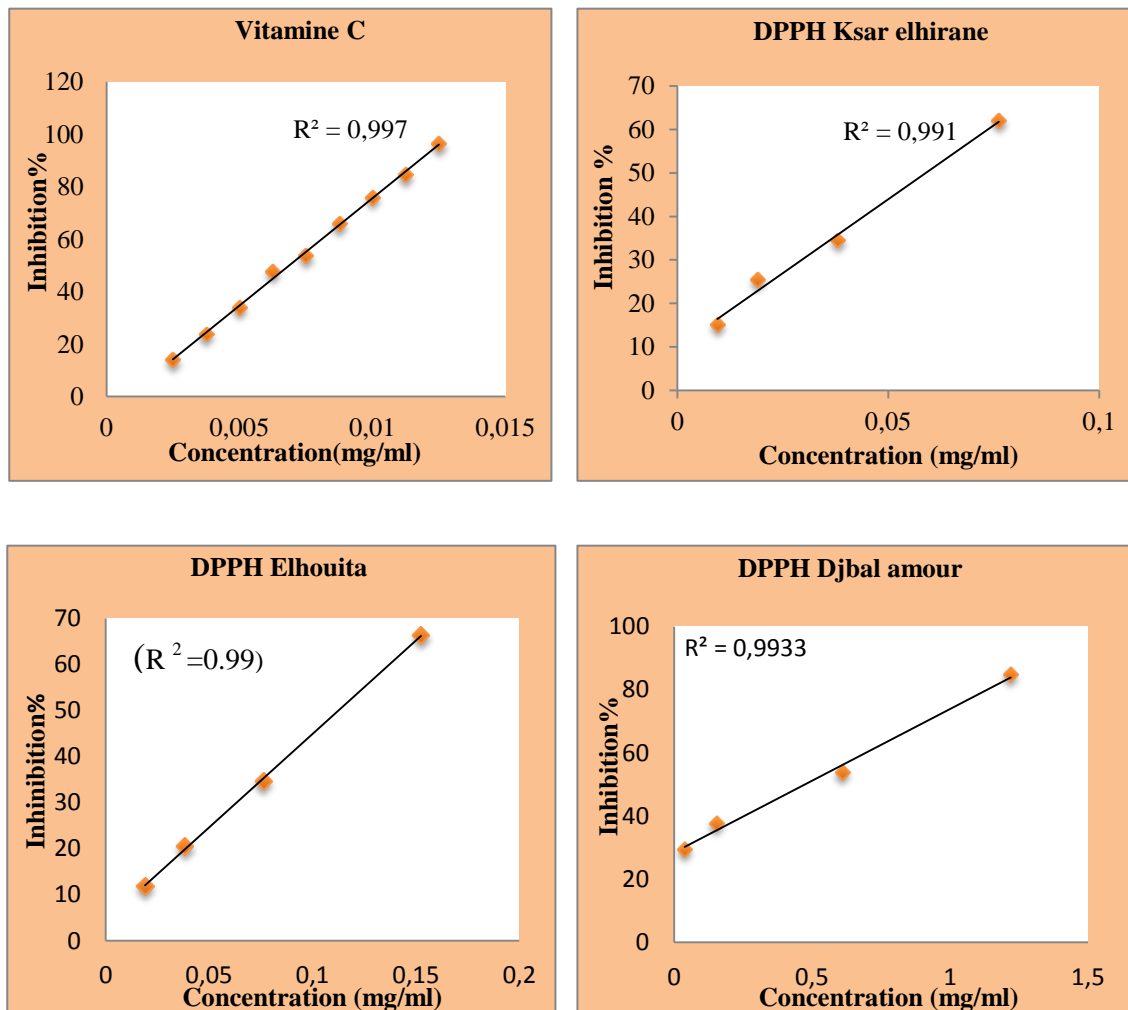
De ce tableau, nous remarquons que les valeurs des EC50 d'EEP sont de 0.058 ,0.112 et de 0.484 mg/ ml pour Kaser elhirane ,ELhouita et Djbal amour respectivement.

Si on analysant ces résultats nous observons que L'ensemble des EEP étudiées révèlent des propriétés antioxydantes ce qui se manifeste par de faibles valeurs de EC50.

Comparable avec celui d'antioxydants standard vitamine C utilisés dans ce test nous remarquons que la variation des valeurs d'EC50 de ces trois échantillons est moyennement supérieures de 0.058 mg/ml pour l'EEP de Kaser elhirane , supérieure de 0.112 mg/ml d'extrait d'ELhouita et très élevés 0.484 mg/ml de l'EEP de Djbal amour par rapport à 0.006 mg/ml celle de standard.

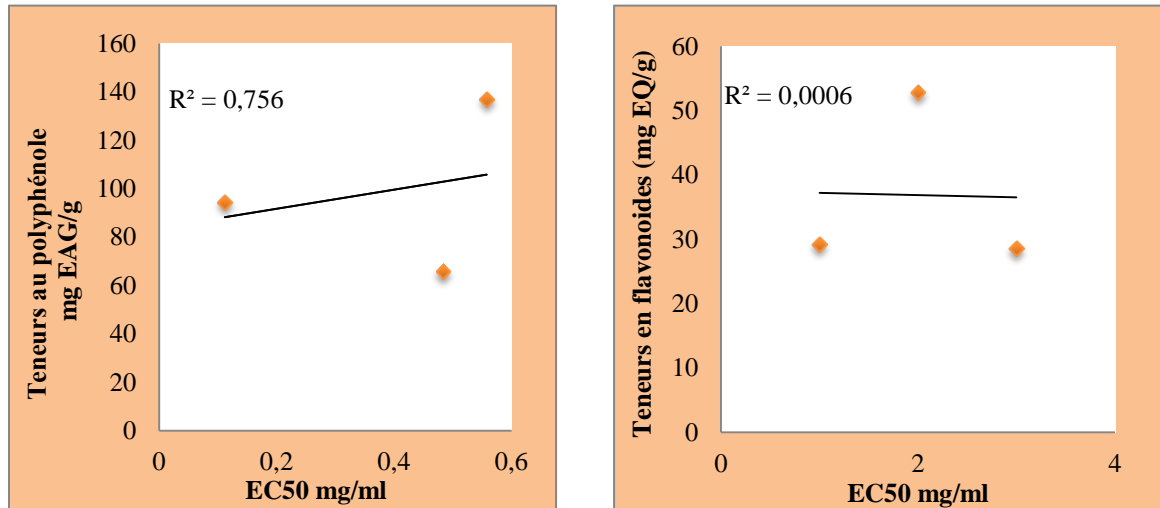
Et en comparaison aux résultats approuvés lors d'une étude réalisée sur la propolis de Portugal a montré que les valeurs obtenus d'EC50 sont de l'ordre de 0,006 mg/ml et 0,025 mg/ml respectivement pour la propolis de Bornes et Funddao [67]. Résultats, supérieures à ceux trouvés dans notre étude.

Donc d'après cette comparaison on peut conclure que nos EEP possèdent un pouvoir antiradicalaire mais moins important, qui peuvent être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement moins actives de flavonoïdes et / ou phénoliques



**Figure 18:** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I % en fonction de la concentration des EEP et la concentration en antioxydants vitamine C.

Dans le but de relier les activités antioxydantes qui ont été mises en évidence par le test du DPPH à la présence des composés phénoliques, flavonoïdes de nos EEP nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles des EEP avec les différentes valeurs d'EC50 obtenues (Figures 19).



**Figure 19:** Corrélation entre les valeurs d'EC50 du test DPPH et les teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des EEP.

D'après les figures qui montrent clairement une bonne corrélation ( $R^2=0.75$ ) entre les EC50 du test DPPH et polyphénols contrairement à la faible corrélation ( $R^2 =0.0006$ ) entre les flavonoïdes et le test EC50 de DPPH. Ce qui suggère que l'activité antioxydante est due aux polyphénols d'autre famille que les flavonoïdes.

**III.1.2.2. Test ABTS ou détermination du TEAC**

L'activité antiradicalaire des extraits éthanoïque de propolis vis-à-vis le radical ABTS<sup>•+</sup> a été évalué spectrophotométriquement à 734 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur bleu-noir à la couleur jaune. Les résultats ont été exprimés Par détermination de TEAC plus TEAC est grand plus l'activité antioxydantes est importante. Et par le pourcentage de réduction d'ABTS<sup>•+</sup> (I%), pour une concentration en antioxydant EEP. Le paramètre « EC50 » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en ABTS.+) Plus la valeur d'EC50 est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante, le TEAC et EC50 ont été calculé pour chaque extrait et pour antioxydants standard. Les résultats sont groupés dans le Tableau XI et dans figure 20.

**Tableau XI :** Activité antiradicaliare des extraits éthanoïques de propolis et de Trolox.

Extrait	EC50 (mg/ml)	TEAC
<b>EEP1</b>	0.225	0.0101
<b>EEP2</b>	0.270	0.0097
<b>EEP3</b>	8.410	0.0002
<b>Trolox</b>	0.003	1

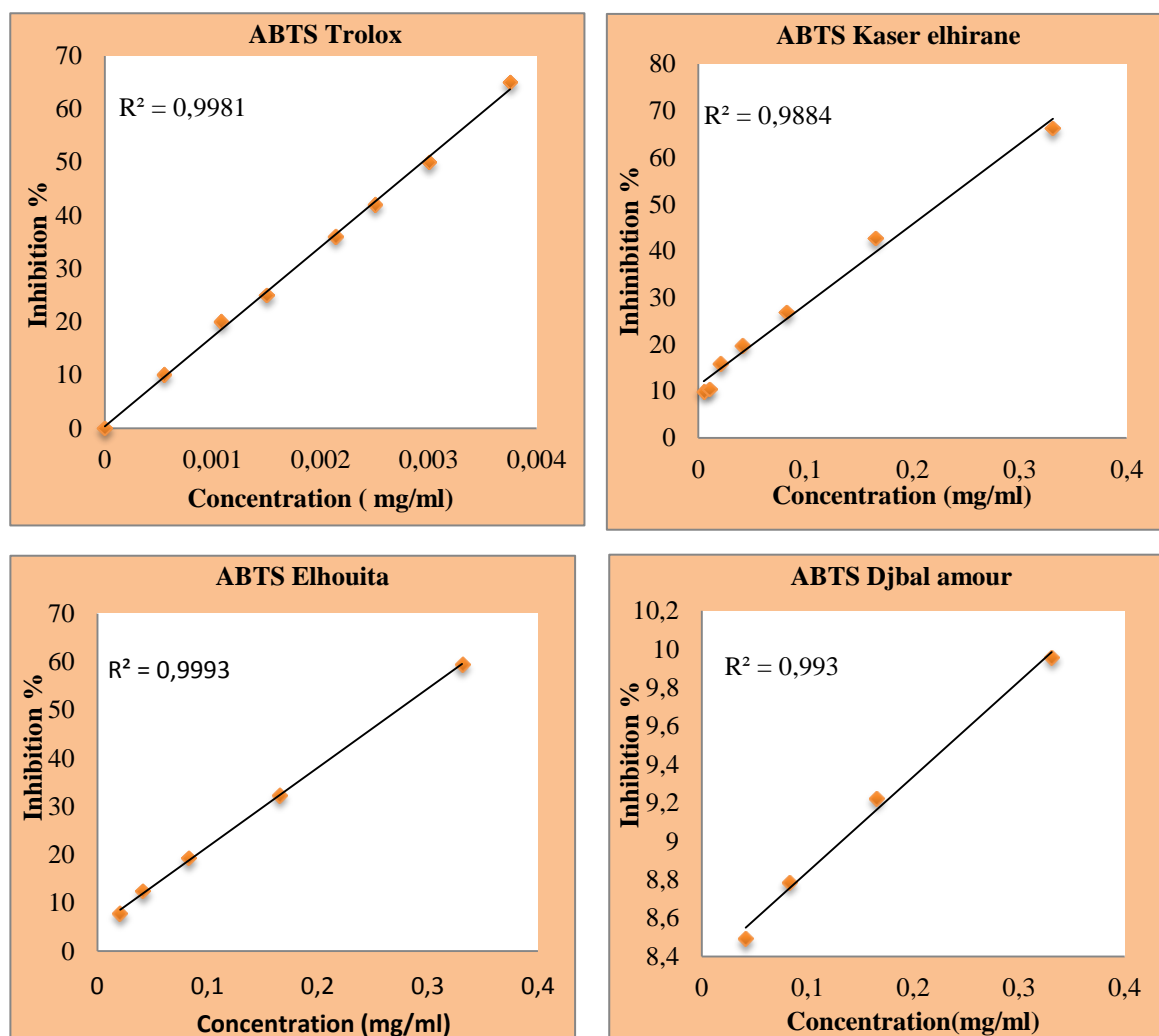
De ce tableau les valeurs de TEAC varient de 0.0101 à 0.0002 sont des valeurs très faible et inferieure a 1 celle de Trolox.

Nous remarquons aussi, que les valeurs des EC50 d'EEP varient de 0.225 à 8.41 mg/ ml Comparable avec celui d'antioxydants standard Trolox utilisés dans ce test, il est claire que la variation de ces trois échantillons est de valeurs moyennement supérieures de 0.225 mg/ml pour l'extraits de Kaser elhirane , supérieure de 0.270 mg/ml pour l'extrait d'ELhouita et très élevés de 8.41 mg/ml de Djbal amour par rapport à 0.003 mg/ml celle de standard.

Et avec comparaison aux résultats approuvés lors d'une étude réalisée sur la propolis de Portugal a montré que les valeurs obtenus d'EC50 sont de l'ordre de 0,026 mg/ml

Et 0,002 mg /ml respectivement pour la propolis de Transição et Barroca [51] résultats, supérieure à ceux trouvés dans notre étude.

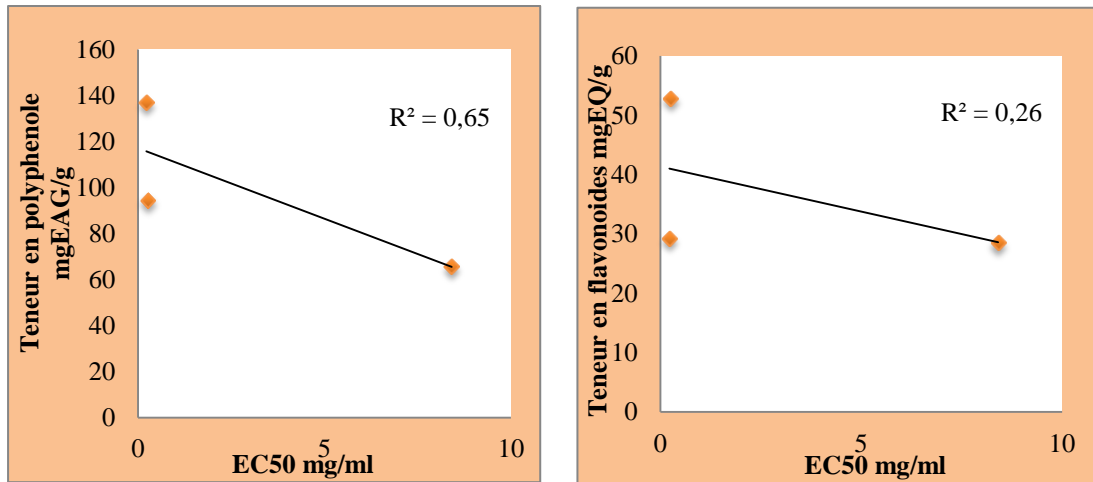
Donc d'après cette comparaison et les valeurs de TEAC on peut conclure que l'extrait de Djbal amour n'a aucune activité antiradicalaire cela peut être dû à l'absence des agents antioxydants, par contre les extraits de Kaser elhirane et Elhouita amour qui possèdent un pouvoir antiradicalaire mais moins important, qui peut être dû à la teneur et/ou la présence de certaines molécules de flavonoïdes et / ou phénoliques potentiellement moins actives.



**Figure 20 :** Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration des éthanoïques de propolis et la concentration en antioxydants standards Trolox.

Dans le but de relier les activités antioxydantes qui ont été mises en évidence par le test de l'ABTS à la présence des composés phénoliques, flavonoïdes de nos EEP.

Nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles des EEP avec les différentes valeurs d'EC50 obtenues (Figures 21).



**Figure 21 :** Corrélation entre les valeurs d'EC50 du test ABTS et les teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des EEP.

D'après les figures qui montrent clairement une bonne corrélation ( $R^2=0.65$ ) entre les EC50 du test ABTS et polyphénols contrairement à la faible corrélation ( $R^2=0.26$ ) entre les flavonoïdes et les EC50 du test ABTS ce qui suggère que l'activité antioxydante est due aux polyphénols d'autre famille que les flavonoïdes.

**III.1.2.3. Test phosphomolybdates**

L'activité antioxydante des extraits éthanolé de propolis vis-à-vis complexe PPM a été évalué spectrophotométriquement à 695 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur bleu-vert à la couleur jaune.

Les résultats ont été exprimés par la détermination de ACEAC, plus ACEAC est grand plus l'activité antioxydantes est importante .Et par le paramètre « EC50 » (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % de concentration initiale en PPM Plus la valeur d'EC50 est petite plus la capacité antioxydante de nos extraits est importante, le ACEAC et EC50 ont été calculé pour chaque extrait et pour antioxydants standard. Les résultats sont groupés dans le Tableau XII dans figure 22.

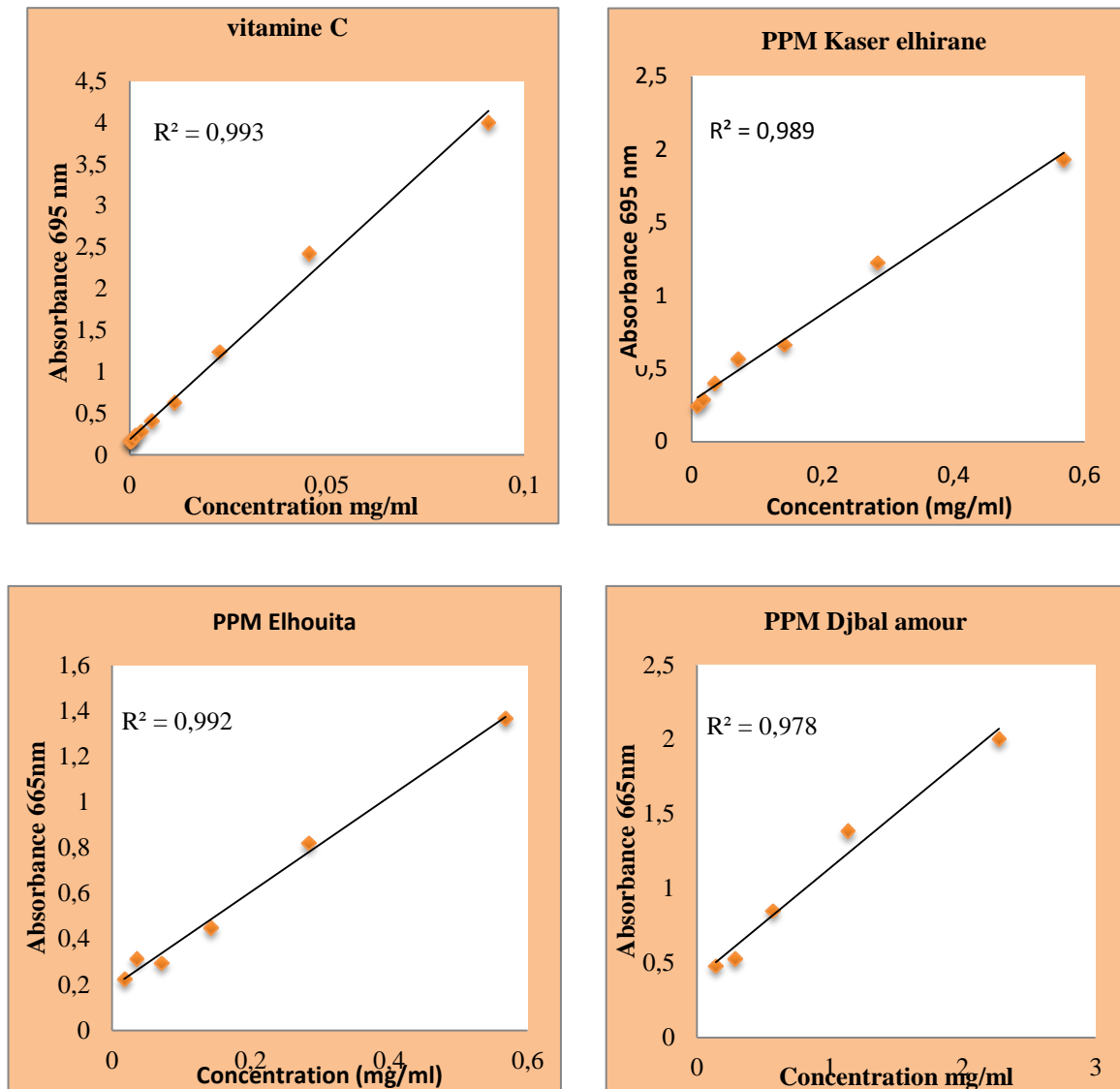
**Tableau XII** : Les valeurs AEAC et EC50 des extraits éthanolé de propolis.

EXTRAIT	AEAC	EC50 mg/ml
EEP1	0.0687	0.3
EEP2	0.0479	0.48
EEP3	0.0168	1.1
Vitamine C	1	0.022

De ce tableau les valeurs de AEAC varient de 0.0687 à 0.0168 sont des valeurs très faible et inférieure de 1 celle de Trolox.

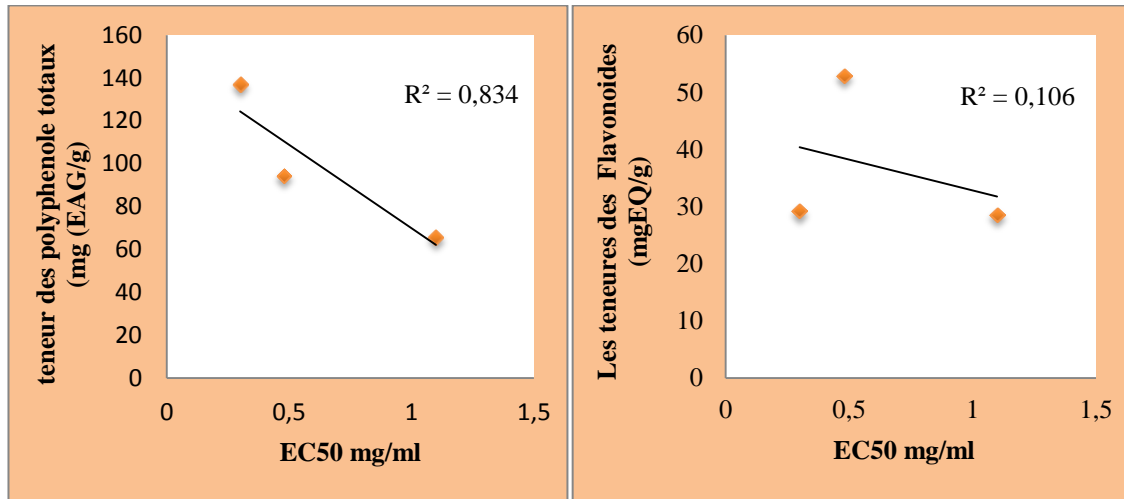
Nous remarquons aussi, que les valeurs de EC50 d'EEP varient de 0.3 à 1.1 mg/ ml Comparable avec celui d'antioxydants standard Trolox utilisés dans ce test il est claire que la variation des EC50 de ces trois échantillons est moyennement supérieures de 0.3 mg/ml pour l'extrait de Kaser elhirane, supérieure 0.48 mg/ml d'ELhouita et très élevés de 1.1 mg/ml de Djbal amour par rapport à 0.022 mg/ml celle de standard.

Donc d'après cette comparaison et les valeurs de AEAC on peut conclure que l'extrait de Djbal amour n'a aucune activité antiradicalaire cela peuvent être du a l'absence des agent antioxydant par contre les extraits Kaser elhirane ,ELhouita possèdent un pouvoir antiradicalaire mais moins important, qui peuvent être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement moins actives de flavonoïdes et / ou phénoliques.



**Figure 22 :** Courbes représentant la variation du pourcentage d’inhibition I% en fonction de la concentration des extraits éthanoïques de propolis et la concentration en antioxydants standards vitamine C.

Dans le but de relier les activités antioxydantes qui ont été mises en évidence par le test du Phosphomolybdate (PPM) à la présence des composés phénoliques, flavonoïdes des EEP. Nous avons essayé d'étudier les différentes corrélations possibles de nos EEP avec les différentes valeurs d'AEAC obtenues (Figures 23).



**Figure 23** : Corrélation entre les valeurs d'EC50 du test PPM et les teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des EEP.

D'après les figures qui montrent clairement une bonne corrélation ( $R^2=0.83$ ) entre les EC50 du test PPM et polyphénols contrairement a la faible corrélation ( $R^2=0.10$ ) entre les flavonoïdes et les EC50 du test phosphomolybdate. Ce qui suggère que l'activité antioxydante est due aux polyphénols d'autre famille que les flavonoïdes.

**III.1.3. l'évaluation de l'activité antimicrobienne**

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits sont repris ci-dessous Dans ces tableaux sont inclus d'une part les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes détruites par l'activité antimicrobienne et d'autre part les valeurs de différentes concentrations minimales inhibitrices (CMI).

**Tableau XIII** : Une illustration de la capacité antimicrobienne des extraits éthanoïques de propolis vis-à-vis de germes.

Extraits	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>EEP1</b>	-	+	-	+	+
<b>EEP2</b>	-	+	+	+	+
<b>EEP3</b>	-	+	-	-	+

+ : sensible, - : résistant.

A la lumière de ces résultats on peut dire que nos trois EEP ont une activité antibactérienne et on peut constater ce qui suit :

- ✚ Les souche *Escherichia coli* ,*Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* sont sensible à l'extrait de Kaser elhirane
- ✚ Les souche *Escherichia coli* ,*Pseudomonas aeruginosa* ,*Staphylococcus aureus*,et *Candida albicans* sont sensible à l'extraitd' ELhouita
- ✚ Les souches *Escherichia coli* et *Candida albicans* sont sensible à l'extrait de Djbal amour.
- ✚ La souche *Proteus mirabilis* est resistente aux trois EEP.
- ✚ La souche *Pseudomonas aeruginosa* resistente aux extraits Kaser elhirane et Djbal amour.
- ✚ La souche *Staphylococcus aureus* est résistante à l'extrait de Djbal amour.

Vu l'absence d'une référence de lecture qui détermine le seuil de sensibilité nous avons Considéré une souche sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10 mm

Résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm. La sensibilité est intermédiaires le diamètre est égal à 10 mm.

**III.1.3.1. Test Escherichia coli**

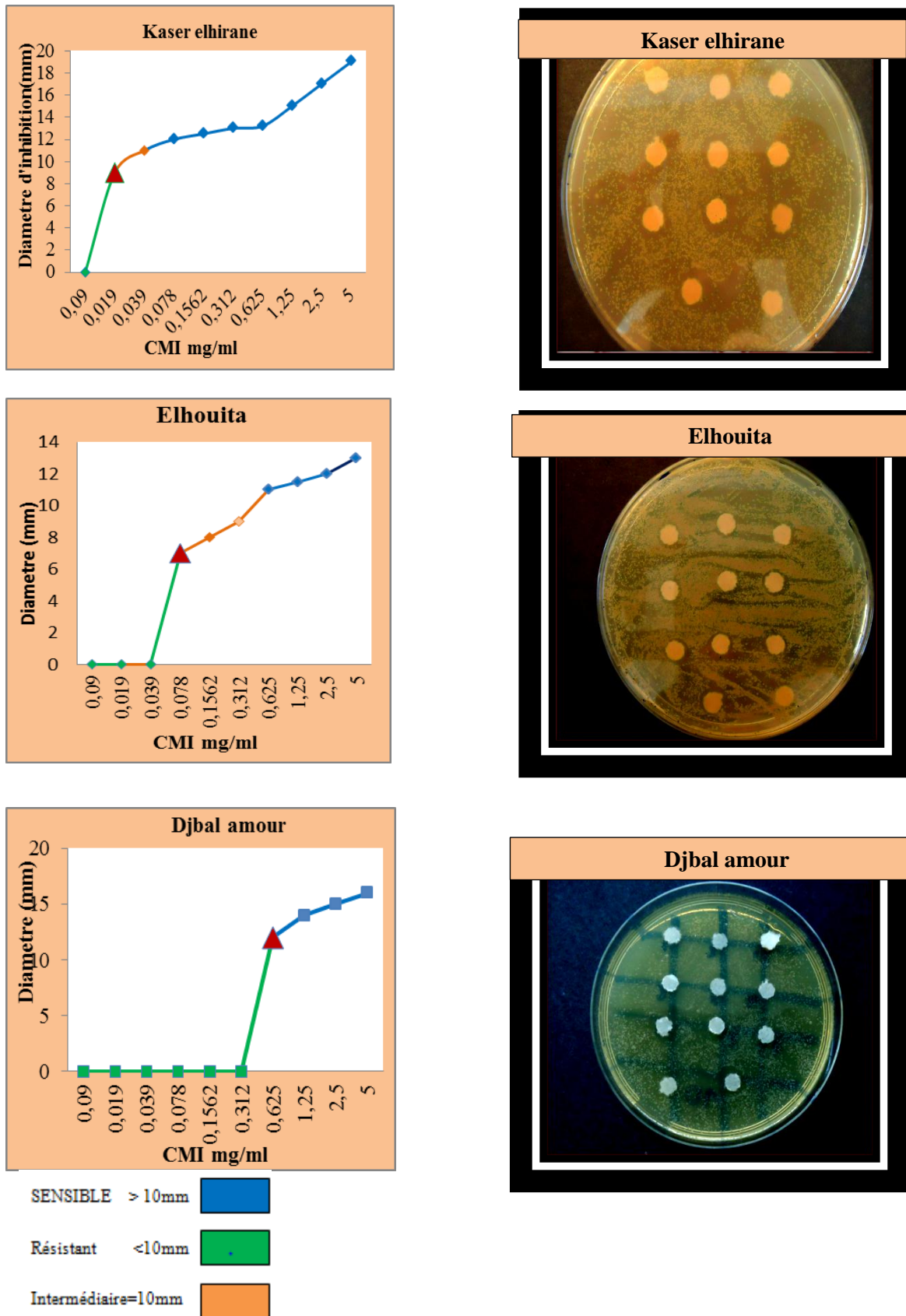
**Tableau XIV :** Activité antibactérienne des extraits éthanoïques de propolis avec le germe d'*Escherichia coli*.

Concentration mg/ml	Diamètres d'inhibitions (mm)					
	EEP1	Sensibilité	EEP2	Sensibilité	EEP3	Sensibilité
0.09	0	R	0	R	0	R
0.019	9 CMI	R	0	R	0	R
0.039	11	S	0	R	0	R
0.078	12	S	8 CMI	R	0	R
0.156	12.5	S	8.5	R	0	R
0.312	13	S	10	intermédiaire	0	R
0.625	13.2	S	11	S	12 CMI	S
1.25	15	S	11.5	S	14	S
2.5	17	S	12	S	14.5	S
5	19	S	14	S	15	S

S : Sensible, R : Résistant.

Suivant le Tableau XIV et la figure 24 nous remarquons que le test sur *E. coli* a permis d'obtenir un effet inhibiteur par les trois EEP avec des zones d'inhibitions maximale de 19, 14 et 15 mm pour l'extrait de Kaser elhirane, ELhouita et Djbal amour respectivement dont les valeurs de CMI de 0.019, 0.078 et 0.665 mg/ml pour l'extrait de Kaser elhirane, ELhouita et Djbal amour respectivement.

On outre si on compare nos résultats aux autres études par exemple la propolis de la région de la Grèce [68] a montré un effet positif sur germes *E. coli* avec des valeurs de CMI de 4,90, 3,80 et 3,90 mg/ml pour les régions Nord East Centre West et Nord West respectivement. Qui sont des résultats inférieure a ceux trouvé dans notre étude Nous pouvons conclure que nos EEP possèdent un effet inhibiteur positif contre la souche *E. coli*.



**Figure 24 :** L'effet antibactérien des extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec *Escherichia coli*

### III.1.3.2. Test de *Pseudomonas aeruginosa*

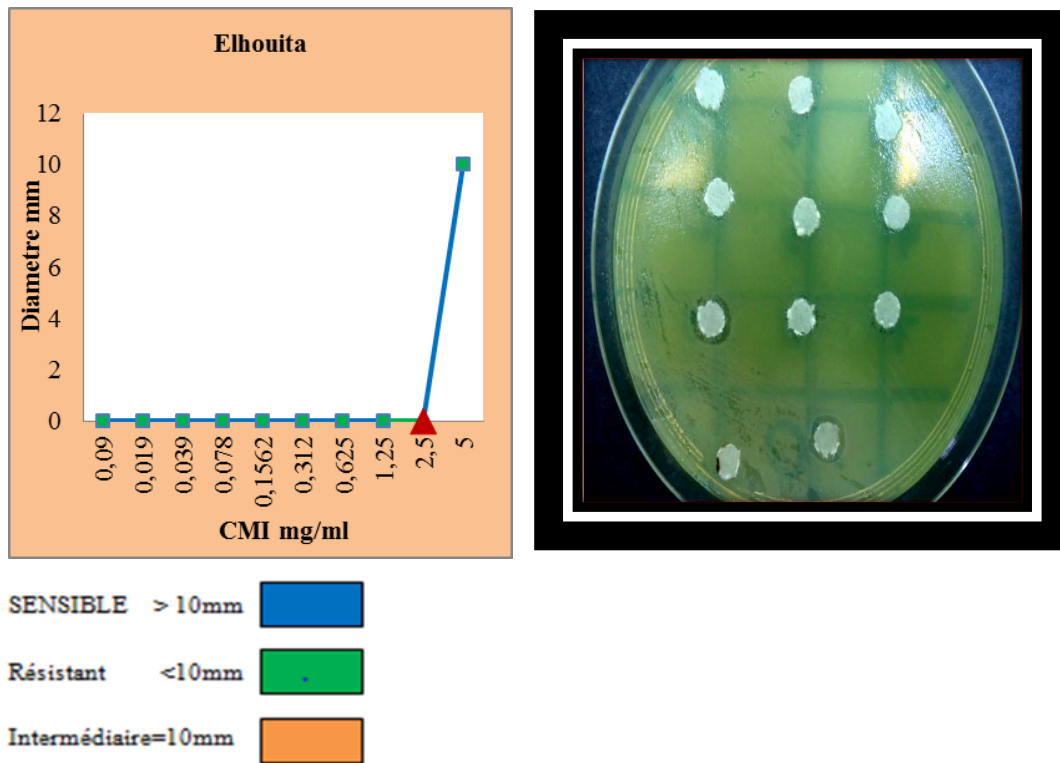
**Tableau XV :** Activité antibactérienne l'extraits éthanoïque de propolis d'Elhouita avec le germe *Pseudomonas aeruginosa*

Concentration mg/ml	Diamètre d'inhibition (mm)	
	EEP2	Sensibilité
0.09	0	R
0.019	0	R
0.039	0	R
0.078	0	R
0.156	0	R
0.312	0	R
0.625	0	R
1.25	0	R
2.5	10 CMI	intermédiaire
5	12	S

S : Sensible, R : Résistant.

Suivant le Tableau XV et la figure 25 nous remarquons que le test sur *Pseudomonas aeruginosa* a permis d'obtenir un effet inhibiteur que par l'extrait d'Elhouita avec de zone d'inhibitions maximale de 12 mm dont la valeur de CMI est de 2.5 mg/ml .On outre si on compare nos résultats aux autres études par exemple la propolis de la région de la Grèce [68] a montré un effet positif sur germes *Pseudomonas aeruginosa* avec des valeurs de CMI de 5.70, 6.90 et 7.10 mg/ml pour les régions Nord East Centre West et Nord West respectivement. Qui sont des résultats inférieure a ceux trouvé dans notre étude.

Nous pouvons conclure que l'extrait d'Elhouita possède un effet inhibiteur positif contre la souche *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 25 :** L'effet antibactérien d'extraits éthanoïque d'Elhouita avec *Pseudomonas aeruginosa*.

### III.1.3.3. Test *Staphylococcus aureus*

**Tableau XVI :** Activité antibactérienne d'EEP 1,EEP 2 avec le Test *Staphylococcus aureus*

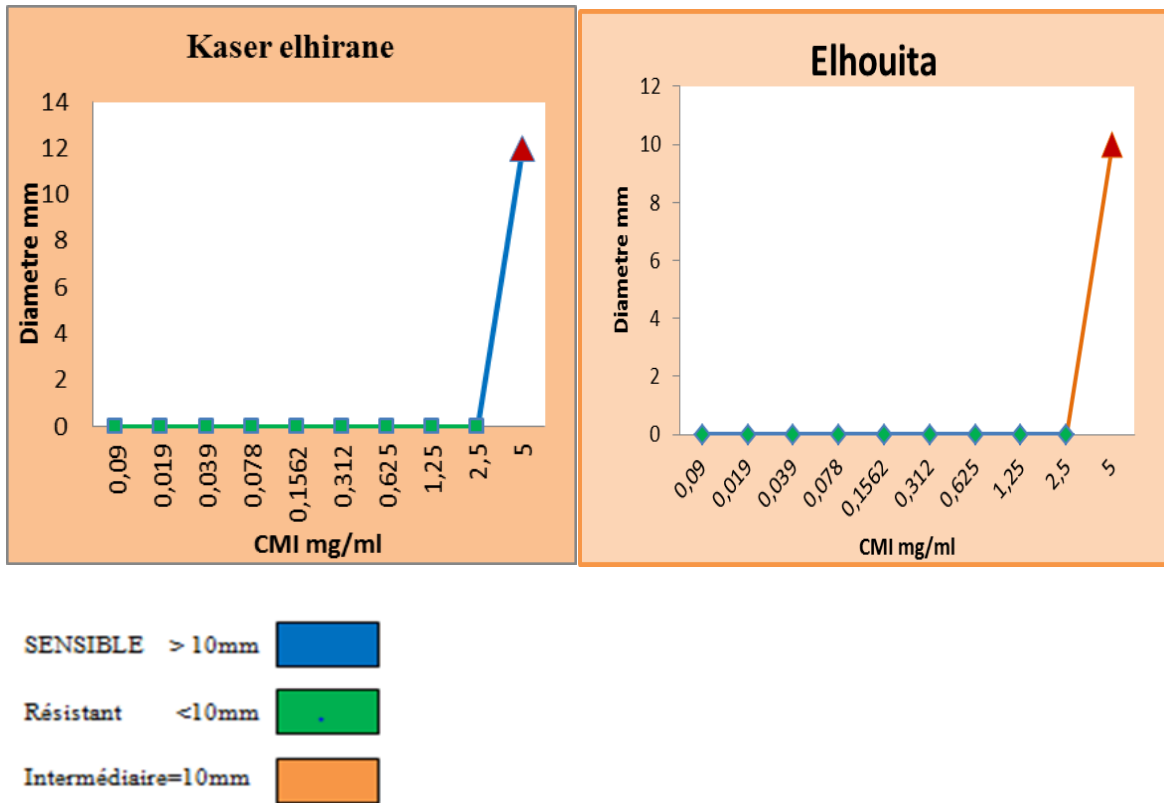
Concentration mg/ml	Diamètres d'inhibitions (mm)			
	EEP1	sensibilité	EEP2	sensibilité
0.09	0	R	0	R
0.019	0	R	0	R
0.039	0	R	0	R
0.078	0	R	0	R
0.156	0	R	0	R
0.312	0	R	0	R
0.625	0	R	0	R
1.25	0	R	0	R
2.5	0	R	0	R
5	12 CMI	S	10 CMI	intermédiaire

S : Sensible, R : Résistant.

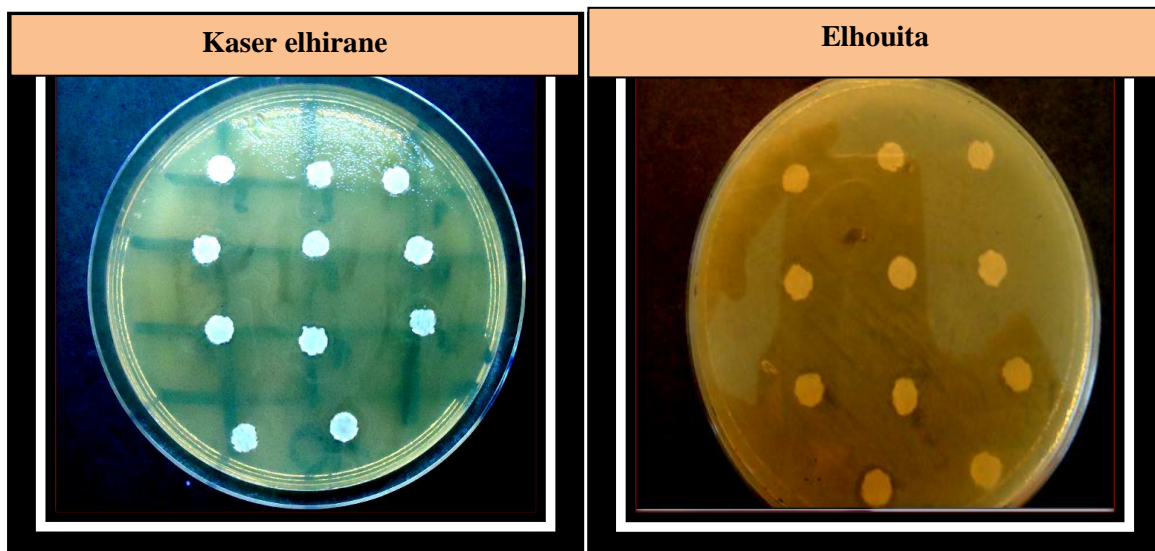
Suivant le Tableau XVI les figure 26,27 nous remarquons que le test sur *Staphylococcus aureus* a permis d'obtenir un effet inhibiteur par l'extrait de Kaser elhirane ,ELhouita avec des zones d'inhibitions maximale de 12 et 10 mm pour l'extrait de Kaser elhirane et ,Elhouita dont les valeurs de CMI sont les meme de 5 mg/ml

On outre si on compare nos résultats aux autres études par exemple la propolis de la région de la Grèce [68] a montré un effet positif sur germes *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de 6.80. 5.30 et 6.50 mg/ml pour les région Nord East Centre West et Nord West respectivement. Qui sont des résultats inferieure a ceux trouvé dans notre étude

Nous pouvons conclure que les EEP de Kaser elhirane ,ELhouita possèdent un effet inhibiteur positif contre la souche *Staphylococcus aureus*.



**Figure 26 :** L'effet antibactérien des avec les extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane et Elhouita avec *Staphylococcus aureus*.



**Figure 27 :** Test positif *Staphylococcus aureus* avec les extraits éthanoïques de propolis de kaser elhirane et Elhouita.

III.1.3.4. Test *Candida albicans*

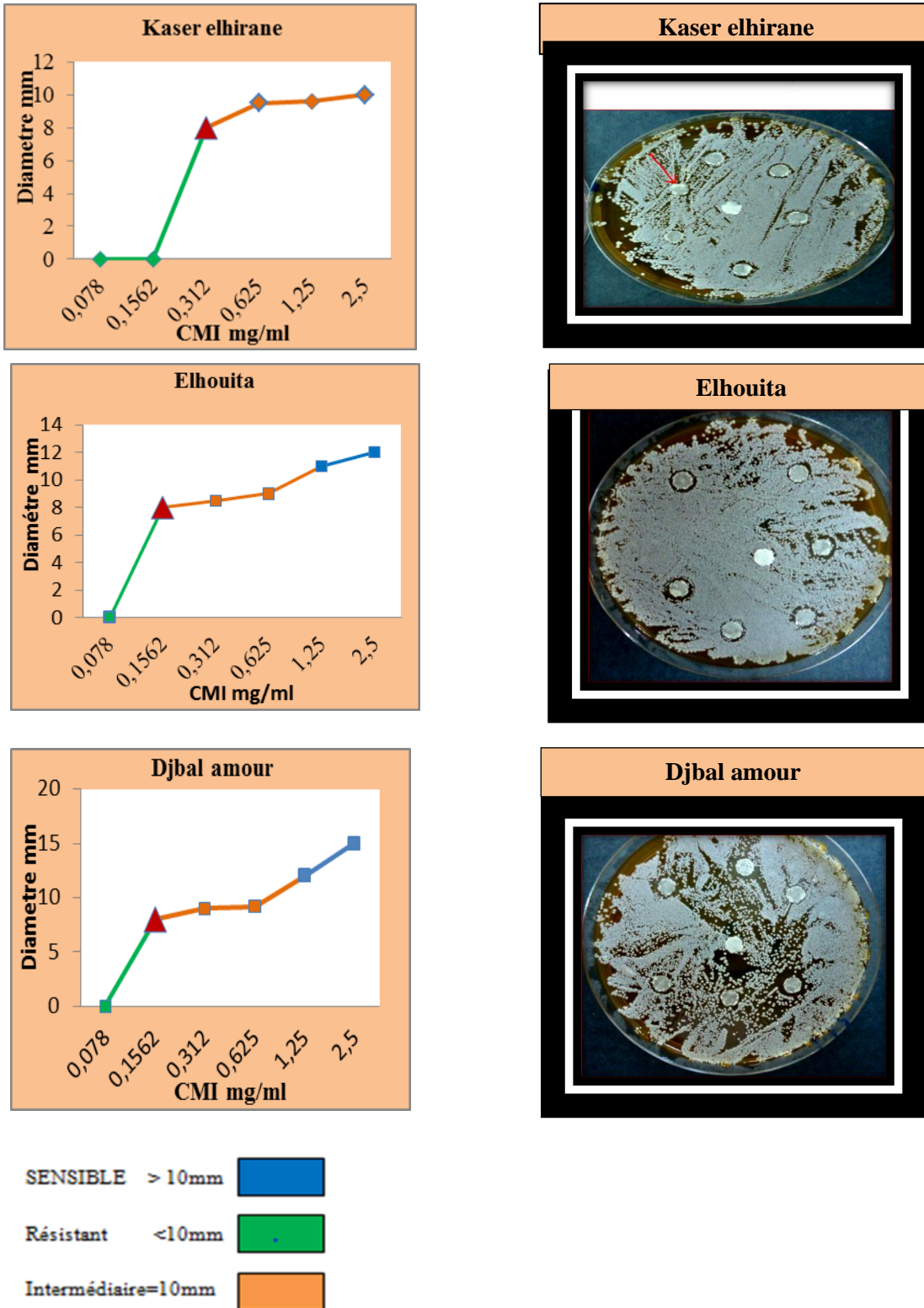
**Tableau XVII :** Activité antibactérienne des extraits éthanœiques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec le germe *Candida albicans*

Concentration mg/ml	Diamètres d'inhibitions (mm)					
	EEP1	sensibilité	EEP2	sensibilité	EEP3	sensibilité
0.078	0	R	0	R	0	R
0.1562	0	R	8 CMI	R	8 CMI	R
0.312	8 CIM	R	8.5	R	9	R
0.625	9.5	R	9	R	9.2	R
1.25	9.6	R	11	S	12	S
2.5	10	intermédiaire	12	S	15	S

+ : Sensible, - : Résistant.

Suivant le Tableau XVII la figure 28 nous remarquons que le test sur *Candida albicans* a permis d'obtenir un effet inhibiteur par les trois EEP avec des zones d'inhibitions maximale de 10 ,12 .et 15 mm pour les EEP de Kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour respectivement dont les valeurs de CMI de 0.312 mg/ml Pour les EEP de Kaser elhirane et 0.156 mg/ml pour les deux autres ELhouita et Djbal amour respectivement.

On outre si on compare nos résultats aux autre études par exemple la propolis de la région de la Grèce a montré un effet positif sur germes *Candida albicans* avec des valeurs de CMI de 5.70. 5.40 et 5.90 mg/ml pour les région Nord East Centre West et Nord West respectivement. Qui sont des résultats inferieure a ceux trouvé dans notre étude Nous pouvons conclure que nos EEP possèdent un effet inhibiteur positif contre la souche *Candida albicans*.

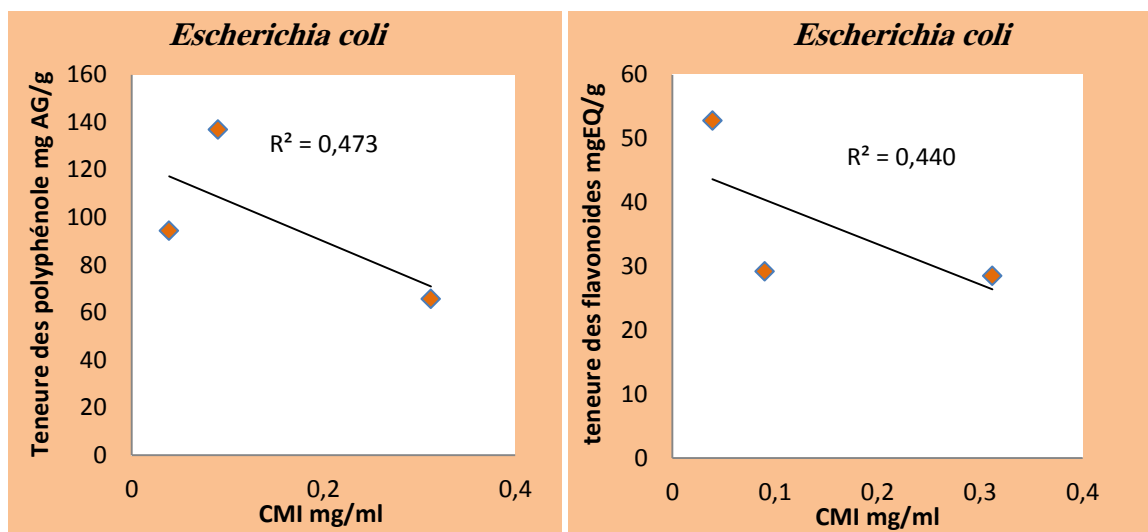


**Figure 28:** L'effet antibactérien des extraits éthanoliques de propolis de kaser elhirane ,Elhouita et Djbal amour avec *Candida albicans*.

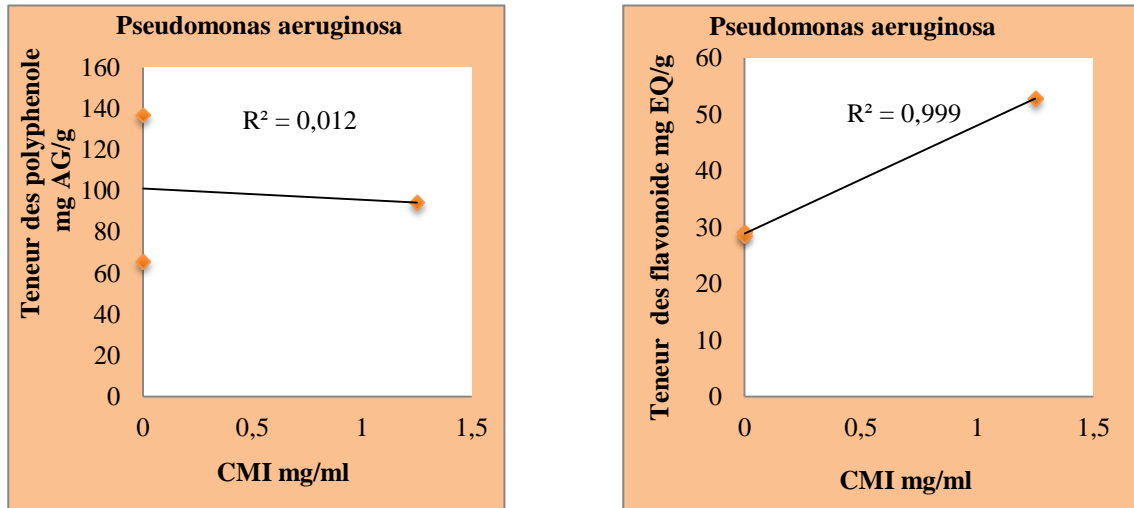
Si on compare les EEP de chaque souche par leurs valeurs de CMI, car celui qui possède la plus faible concentration de CMI considéré comme un agent antibactérien puissant.

- ✓ kaser elhirane à un effet inhibiteur à CMI = 0.019 mg/ml avec la souche *Escherichia coli*
- ✓ Elhouita à un effet inhibiteur à CMI = 2.5 mg/ml avec la souche *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ kaser elhirane et Elhouita à un effet inhibiteur à CMI = 5 mg/ml avec la souche *Staphylococcus aureus*,
- ✓ Elhouita et djbal amour à un effet inhibiteur à CMI =0.156 mg/ml avec la souche *Candida albicans*.

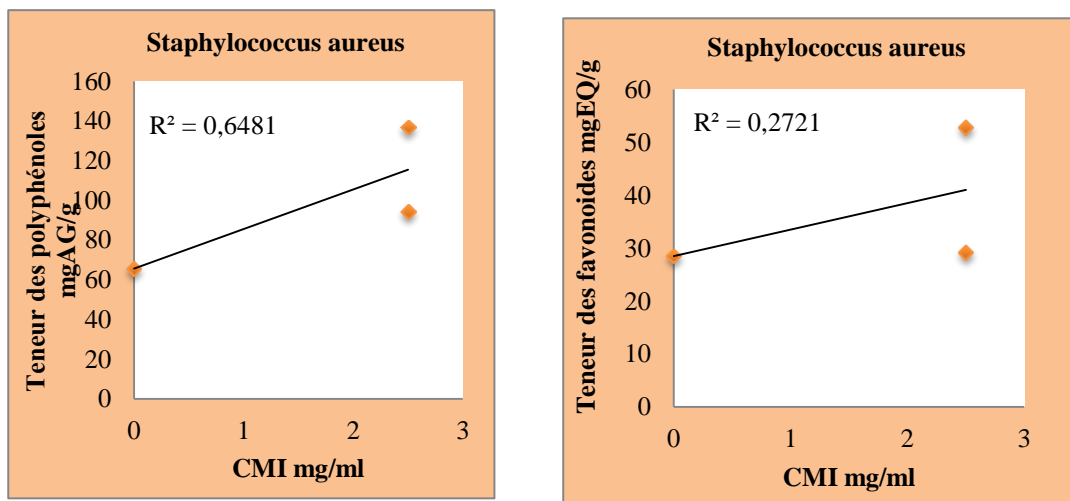
afin de contribue cette activité antibactérienne à son agent causale bioactif telle que les polyphénols et/ou flavonoïdes essayé d'étudier les différentes corrélations possibles de nos EEP avec les différentes valeurs de CMI obtenues. Figure 29.30.31 et 32.



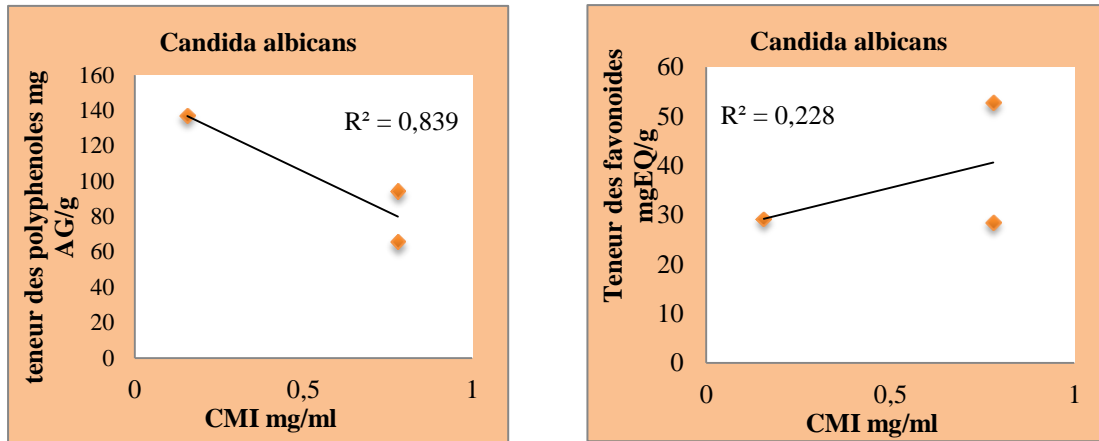
**Figure 29** : Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche *Escherichia coli*.



**Figure 30** : Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 31** : Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche *Staphylococcus aureus*.



**Figure 32** : Corrélations des extraits éthanoïques de propolis et les valeurs de CMI pour la souche.

**Tableau XVIII** : les différentes corrélations  $R^2$  des polyphénols et les flavonoïdes de chaque souche.

La souche	Corrélacion des polyphénol $R^2$	Corrélacion des flavonoïdes $R^2$
<i>Escherichia coli</i>	0.47	0.44
<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	0.012	0.99
<i>Staphylococcus aureus,</i>	0.64	0.27
<i>Candida albicans..</i>	0.83	0.22

D'après ce Tableau XVIII nous remarquons que les valeurs des  $R^2$  des polyphénols sont supérieures à  $R^2$  de flavonoïde ce qui contribue aux polyphénols ou aux d'autre molécule bioactive et pas aux flavonoïdes l'activité antibactériennes inhibitrice des souche d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Candida albicans* .Seulement dans le cas de la souche *Pseudomonas aeruginosa* avec  $R^2 = 0.99$  de flavonoïdes comparable a  $R^2 = 0.01$  de polyphénol ce qui confirme l'effet inhibiteur antibactérien des flavonoïdes contre cette souche.

# *Conclusion*

## Conclusion

Dans ce présent travail, on s'est intéressé aux effets anti-oxydants et antibactériens des extraits éthanoliques de propolis de la région locale Laghouat. En premier lieu, étapes d'extraction réalisées. Après l'extraction, nous avons essayé de calculer le rendement et de quantifier la matière en phénols totaux et en flavonoïdes. Les résultats montrent la richesse de nos extraits en polyphénole et en flavonoïdes. En ce qui concerne l'activité antioxydante, trois techniques ont été examinées; test du DPPH, ABTS et PPM qui ont révélé que tous nos extraits phénoliques de propolis possèdent une activité antioxydantes qui varie d'un extrait à autre et d'un test à un autre qui se manifestent par une activité moyennement importante de piégeage de radicale DPPH<sup>•</sup>, et par une activité faible pour piégeage le radicale cation ABTS<sup>•+</sup> ainsi de réduire le phosphomolybdate (PPM) . Dont Il nous a parus clairement, qu'une seule méthode ne peut pas suffire pour caractériser les propensions antioxydantes, et même ne peut pas donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante de ces extraits donc, l'utilisation de plus d'une méthode a été nécessaire pour permettre de mieux généraliser nos résultats.

Et en fin on a fini notre étude par l'évaluation de l'effet antimicrobien d'extraits phénoliques de propolis qui a été mis en évidence *in vitro* en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé et par le calcul de CMI de chaque extrait vis-à-vis des souches étudiées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* , *Staphylococcus aureus*, et *Candida albicans*), a révélé une action inhibitrice contre la plupart des germes. En comparaison avec la bibliographie, il paraît que nos extraits phénoliques présentent une activité antimicrobienne modérée

En outre on a constaté aussi l'existence d'une corrélation significative entre chaque activité et les composés phénoliques contrairement au composé flavonoïdique. Ce qui suggèrent que l'activité antioxydante et antibactérienne est dû aux polyphénols ou aux d'autres composés non flavonoïdiques. (Acide phénoliques, tanins, stilbènes.....)

En perspective de ce travail, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des extraits de propolis en appliquant des techniques chromatographiques, spectroscopiques et électrochimiques lourdes. Aussi, il serait souhaitable, pour une meilleure compréhension du mode d'action des molécules phénoliques isolées, d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante et même

antimicrobienne de chacun de ces composés pris séparément. Ce qui permettrait alors de mettre en évidence le principe actif des extraits de propolis. D'autres études plus approfondies sont nécessaires elles permettront une meilleure connaissance de ces principes actifs de propolis, de leur structure. et elles permettront aussi de connaître leur pharmacocinétique et leur pharmacodynamie.

# *Référence bibliographiques*

- [1] :Ravazzi, G. Les autres produits de la ruche In « Abeilles et apiculture ». (2003). Ed:VECCHI, 118-121.
- [2] :Lu, L.C., Chen, Y.W. & Chou, C.C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. (2005). *International Journal of Food Microbiology*, 102: 213-220.
- [3] :Marcucci, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. (1999). *Apidologie*, 26:83-99.
- [4] :Sforcin, J.M. Propolis and the immune system: (2007). a review. *Journal Ethnopharmacology*, 113: 1-14.
- [5] :Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. . (2006). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234.
- [6] :Lavie, P La propolis. (1975). Edition: Apimondia. Bucharest.
- [7] :Hegazi, A. G. Propolis an overview. International Symposium on Apitherapy 1997 Cairo 8-9th Egypt.
- [8] :Evangelist-Rodrigues, A., Carneiro of Cunha. M Analise comparative da qualidade da propolis colectado atraves de calços de madeira etela plastica na regiaô do byo paraeibano. (2001). Mensagem Doce 63 (bis).
- [9] :Krell, R Value-Added products from beekeeping. FAO Agricultural services. Bulletin, (1996). N° : 124.
- [10] :Anne k'neur-didier ADAM info ( La lettre du Développement Apicole en Midi-Pyrénées) 25juillet 2011.
- [11] :Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. . (2002). *Journal of Food and Drug Analysis*, 3: 178-182.
- [12] :Kumazawa, S., Hamazaka, T. & Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. (2004). *Food chemistry*, 84: 329-339.
- [13] :Ahn, M.R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. & Nakayama, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. (2007). *Food Chemistry*, 101: 1383-1392.
- [14] :Tosi, Enzo A.; Ciappini, Maria C., Cazzolli, Amelio F., Tapiz, Luis M. Physicochemical characteristics of propolis. 2006.
- [15] :R. KRELL., Value - added products from beekeeping. Food and agriculture organization of the United Nations Rome 1996. Chapitre 5.

- [16]:Bankova V., de Castro SL., Marcucci MC..Propolis: récent advances in chemistry and plant origin.*Apidologie* 2000 31: 3 – 15.
- [17]:Bankova, V. Dyalgerov, A., Popov, S. and Marekov, N.L.. A GC/MS study of the propolis phenolic constituents1987. *Z. f. Naturforschung*, 42:147-151.
- [18]:Nagy, M. Constituents of propolis of Czechoslovak origin.V. 1989.*Chemical Papers*, 42 (5):691-696
- [19]:Omar, M.O.M. Some characteristics of propolis from Upper Egypt. Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture Tropical Climates, 1989.Cairo, Egypt, 6-10 November 1988, 88-92.
- [20]:Papay, V. Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta Pharm.* 1987.Hung., 57:143-151.
- [21]:Gabrys, J..Free amino acids in bee hive products (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. 1986 *Pharmac. Research Communications* 18 (6):513-518.
- [22]:Cuellar Cuellar, A.and Rojas Hernandez,N.M. Chemical components of Cuban propolis. *Revista Cubana de Farmacologia*1987., 21(3): 365-372.
- [23] :Walker, P. & Crane, E. Constituents of propolis(1987).. *Apidologie*, 18(4): 327-334
- [24] :Donadieu. & Raynal. Composition moyenne de la propolis. [http://www.google.com/search?hl=fr&q=la+composition+de+la+propolis+&btnG=Rechercher&lr=\(2006\)](http://www.google.com/search?hl=fr&q=la+composition+de+la+propolis+&btnG=Rechercher&lr=(2006)).
- [25] : -Popova, M., Bonkova, V., Chimov, A., Sileva, M A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from Myroxylan balsamum trees. *Apidologie* 33, 87-88. (2002).
- [26] :Mohammadzadeh , S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S. &Ostad, S.N. Antioxydant power of Iranian propolis(2007). extract.*Food chemistry*, 103: 729-733.
- [27] :Aljadi, A.M. & Kamaruddin, M.YEvaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. . (2004). *Food Chemistry*, 85: 513-518.
- [28] :Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M. & Keen, C.L. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. (2003). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1732-1735.
- [29] :Al-Mamary, M., Al-Meer, A. & Al-Habori, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honeys. (2002). *Nutrition Research*, 22 : 1041-1047.

- [30] :Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., & Tacchini, M.(1989). Les composés phénoliques des miels : étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. 20(2) : 115-125.
- [31] :Marquele, F.D., Di Mambro, V.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R., Valim, Y.M.L. & Fonseca, M.J.V. (2005). Assesment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 39: 455-462.
- [32] :Meda A. (2005). Utilisation thérapeutique des produits de la ruche. Etude phytochimique et activité biologique des miels de BURKINA FASO. Thèse de doctorat en science biologique appliquée : 1-139.
- [33] :Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- [34] :Puppo, A. (1992). Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; Influence of the iron chelator. *Phytochemistry*, 31(1): 85-88.
- [35] :Durand, G., Polidori, A. & Pucci, B. La vectorisation des pièges à radicaux libres. . (2003) *Actualité Chimique*, 26-29.
- [36] :Hennebelle, T., Sahpaz, S. & Bailleul, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. . (2004). *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- [37] :Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. (2002). *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67-202.
- [38] :Ndhlala, A., Moyo, M., Van Staden, J. *Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?* *Molecules*. 2010, 15, (10), 6905-6930.
- [39] :Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities*. *Food Analytical Methods*. 2009, 2, (1), 41-60.
- [40] :Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, (6), 1841-1856.
- [41] :Karchmer A. Nosocomial bloodstream infections: Organisms, risk factors, and implications. .2000. *Clinical Infectious Diseases*, 31(suppl 4), S139-S143.
- [42] : Euzeby J., O, Abege de bacteriologie general et medicale 2005, 104, 7859.
- [43] :Domergo, R.. Santé, bien être et apithérapie. (2004) Ed : RUSTICA. 390 416.
- [44] :THRELFALL E.J., FISHER I.S.T., WARD L., TSCHAPE H. & GERNER-SMIDT P. Harmonization of antibiotic susceptibility testing for *Salmonella*: (1999). Results of a study by 18 national reference laboratories within the European Union-funded Enter-Net group. *Microb. Drug Resist.*, 5, 195-199.

- [45] :WALKER R.D. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. (2000). *In: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., eds. Ames, IA, Iowa State University Press, 12.26.
- [46] :Manuel terrestre de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) 2008, chapitre 116 méthodes de laboratoire utilisées pour les essais d'antibiorésistance, 61,71.
- [47] : A. Philippon -Cours de Bactériologie Générale (Faculté de Médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Université PARIS V). <http://www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html>.
- [48] :K. BENAROUS. Evaluation de l'activité antioxydante et étude des effets inhibiteurs des extraits phénoliques, saponines et alcaloïdes sur la lipase de *Candida rugosa*. 2010 Thèse de magister
- [49] : Velickovic D.T., Milenovic D. M., Ristic M. S. et Veljkovic V. B. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. (2006). *Journal of ultrasonic Sonochemistry*, 13, 150 – 156.
- [50] : Naczka, M., et Shahidi, F.,. Extraction and analysis of phenolics in food.2004. *Journal of Chromatography A*, volume 1054, p 95–111
- [51] :Graça, M. et al.,. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve , South of Portugal. 2010, 48, pp.3418–3423.
- [52] : F. FARHOUNE .: Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d ' abeille locales ( *Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis* ). 2010 Thèse magister
- [54] : Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, J.M. Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1370-1373.
- [55] :Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, MOxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. . (1996) *Arzneimittel-Forschung*. **46**: 1086-1089.
- [56] Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, (1958) 181, 1199-1200.
- [57] : Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., *Food. Sci. Technol.*, 1995, 28, 25-30. Molyneux, P., *J. Sci. Technol.*, 2003, 26, 211-219.
- [58] ;Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., Bitsch, R., *Free Rad. Res.*, 2002, 36, 177-187.

- [59] : Prieto P., Pineda M., Aguillar M., Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. 1999*Analytical Biochemistry*; 269: 337-341.
- [60] : M. R. Saha., Md. A. Alam., R. Akter and Rumana Jahangir. In-vitro free radical scavenging activity of *Ixora coccinea* L., 2008, *Bangladesh J Pharmacol*; 9
- [61]: Lucrecia L. Chaillou.; Monica A. Nazareno. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* 42 (2009) 1422–1427.
- [62]: Ahn. M.; Kumazawa. S.; Usui Y.; Nkamura. J.; Matsuka M.; Zhu. F.; Nakayama. T. Antioxydant activity and constituent of propolis collected in varaus areas of china. *Food chemistry* (2007). 101. 1383 – 1392.
- [63]: Kamazawa. S, Hamaska. T, Nakayama. T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. (2004). *Food chemistry* 84. 329 – 339.
- [64]: Schimmerling P.; Sisson J. C.; et Zaidi A.. Pratique des plans d'expériences, Technique et documentation. 1998Lavoisier 61 – 438.
- [65]: D. Kone., Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennes- extraction, identification d'alcaloïdes- caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante, 2009.Thèse ; *Univ de Bamako* ; 188 pp.
- [66]: C.S. Moreno, J. A. Larrauri and F. Saura-Calix.,. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *J Sci Food Agric*1998; 270- 276 pp.
- [67] :Moreira, L. et al., Antioxidant properties , total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. 2008. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), pp.3482–3485. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>
- [68]: Eleni Melliou.; Eleftherios Stratis.; Ioanna Chinou.. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity 2007. *Food Chemistry* 103: 375 – 380.

## Résumé

Ce travail a pour objectif d'évaluation l'activités antioxydante et antimicrobienne des extraits éthanoïque de propolis de la région locale de Laghouat : Kaserelhirane, Elhouita et Djbal amour ces extraits ont obtenue par macération solide-liquide dans l'éthanol pur. Les valeurs de rendement se situent entre 40.8 à 31.2%. Le dosage des polyphénole et les flavonoïdes a montré la richesse de ces trois extraits en polyphénols et flavonoïdes. Les activités antioxydantes ont été réalisées en utilisant trois tests chimiques (DPPH, ABTS et Molybdate-Phosphate). Les résultats obtenus ont montré que les extraits éthanoïques de propolis possèdent un pouvoir réducteur et anti-radicalaire faible ou parfois négligeable, et ceci en comparant avec les antioxydants de références utilisées. Par contre ces extraits ont révélées des activités antimicrobiennes intéressantes. La plus forte activité antibactérienne a été observée par l'extrait de Kaserelhirane.

## Mots clés

les extraits éthanoïques de propolis, activité antioxydante, test DPPH, test ABTS, test Molybdate-Phosphate, activité antibactérienne.

## ملخص:

تعتبر دراسة المركبات الفينولية للبروبوليس موضوع ذو أهمية علمية لما يحتويه من مركبات فعالة ذات نشاط بيولوجي نهتم في هذا العمل بدراسة المستخلصات الفينولية للبروبوليس لمنطقة الأغواط : قصر الحيران ، الحويطة ، جبل العمور. كما ندرس أيضا خصائصها المضادة للأكسدة ومضادة للمكروبات. خصصت المرحلة الأولى بهذه الدراسة من أجل إستخلاص وتقدير المركبات الفينولية والفلفونويدات والنتائج المحصل عليها تبين أن جميع العينات الثلاث غنية بمركبات الفينولية والفلفونويدات وقمنا في المرحلة الثانية بدراسة النشاط المضاد للأكسدة لهذه المستخلصات بإستعمال إختبار DPPH ، ABTS وإختبار الموليدات وأثبتت النتائج أن كل المستخلصات تملك فعالية مضادة للأكسدة ضعيفة وأحيانا معدومة مقارنة بمضادات الأكسدة المرجعية. وفي المرحلة الأخيرة تمت دراسة النشاط المضاد للجراثيم لهذه المستخلصات بإستخدام خمسة أنواع من المكروبات (بكتيريا وفطر) أظهرت النتائج أن العينات ذات نشاط فعال مضاد للمكروبات.

## الكلمات المفتاحية:

المركبات الفينولية المضادة للأكسدة ، النشاط المضاد للجراثيم.