

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université A. MIRA – BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de master

En Génie des procédés

Option : Génie Pharmaceutique

Thème :

*Caractérisation et Evaluation des activités biologiques
de la propolis de différentes régions de Bejaïa*

Réalisées par :

ATTIA Karima
ATILOUS Meriem

Encadreur

Mr FATMI Sofiane

CO -encadreur

M^{lle} TOUTOU Zahra

Soutenus devant le jury :

Présidente : M^{me} N. CHIBANI

Examineur : Mr M. AZZOUG

Promotion 2020/2021

Remerciement

Avant tout, nous remercions dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*De prierie abord nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadreur **Dr Sofiane FATMI** qui nous a fait confiance en s'engageant à nos côtés dans ce travail.*

*Nos vifs remerciements vont également à mademoiselle **Zahra TOUTOU** qui nous a orientés, nous faisant profiter de son savoir, et nous offrant sa présence tout au long de ces longs mois d'efforts.*

*Nous remercions également les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche, au professeur monsieur **AZZOUG** qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions, à madame **CHIBANI** qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

Je tiens enfin à remercier nos familles pour leur soutien, ainsi que nos amis(e) qui étaient là pour nous tout au long de notre travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*A mon cher père **Djamel**, source d'amour, d'affection, de générosité et de sacrifice. Tu étais toujours là près de moi pour me soutenir, m'encourager et me guider avec tes précieux conseils. Que ce travail soit le témoignage des sacrifices que tu n'as jamais cessé de déployer pour mon éducation et mon instruction. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'admiration que je porte au grand homme que tu es. Puisse Dieu le tout puissant, te préserver et t'accorder santé longue vie et bonheur.*

*A ma très chère mère **Daouia**, source de ma vie, d'amour, de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Puisse Dieu le tout puissant t'accorder meilleur santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très chère frère **Tayeb** et sa femme **Lyly**.*

*A très ma chère sœur **Katia** et son mari **Madjid**.*

Pour leurs patience, soutien et leurs sentiments d'amour. Que Dieu vous garde et illumine vos chemins.

A la petite Sarah Ranime source de bonheur de la famille. Que Dieu te protège.

*A toute la famille **ATILOUS** et **ADDA**.*

*A mon encadreur **Dr FATMI Sofiane** qui m'as dirigé au long de mon travail.*

*A ma co-promotrice **M^{lle} TOUTOU Zahra** qui m'as trop aidé durant tout ce travail.*

A tous mes professeurs que je leurs affecte mon profond respect.

*A mes meilleurs amis : **Kamilia, Kahina** avec qui j'ai partagé tous les moments de bonheur.*

A tous mes amis et mes collègues.

ATILOUS Meriem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents qui m'ont toujours beaucoup aidé et soutenue au long de ma vie.

A mes très chers frères : Hamid et Amer.

A mes sœurs : Fariza, Nadia, Naima, Chafia, Ghania et Zahia.

A toute la famille Attia et Aberboure.

A mon encadreur Dr Sofiane Fatmi qui ma dirigé au long de mon travail.

A mes professeurs : leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.

A mes amis et mes collègues : ils vont trouver ici le témoignage d'une amitié infinie.

***ATTIA** Karima*

Sommaire

Liste des figures et tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I : la propolis

I.1. Introduction	2
I.2. Historique.....	2
I.3. Etymologie du mot propolis	2
I.4. Définition.....	2
I.5. Origine de la propolis	3
I.6. Récolte de la propolis	4
I.6.1. récolte de la propolis par les abeilles	4
I.6.2. Récolte de la propolis par l’homme	4
I.7. Les propriétés de la propolis	5
I.7.1. Propriétés physiques	5
I.7.2. Propriétés chimiques	5
I.8. La composition de la propolis	6
I.9. Effets thérapeutique de la propolis	8
I.9.1. propriétés antioxydantes.....	8
I.9.2. Propriétés anti-inflammatoire	8
I.9.3. Propriétés antivirales.....	8
I.9.4. les effets de la propolis sur le corona virus	9
I.9.5. Autres propriétés.....	9
I.10. Extraction	9
I.11. La toxicité	11
I.12. La conservation	11
Conclusion	12

Chapitre II: Activité antibactérienne de la propolis

I. Introduction	13
II. Activité antibactérienne de la propolis	13
II.1. Définition	13
II.2. Historique.....	13

II.3. Mécanisme d'action.....	13
II.4. Description des bactéries	14
II.4.1. Les staphylococcus aureus	15
II.4.1.1. Morphologies.....	15
II.4.2. Candidas albicans	15
II.4.2.1. Morphologie	16
II.4.3. Bacillus cereus.....	16
II.4.3.1 morphologie	16
II.4.4. Escherichia coli	17
II.4.4.1. Morphologies.....	17
II.5. Le pouvoir pathogène de chaque bactérie	17
II.6. Comment la propolis réagit-elle sur chacune des bactéries ?	19
II.6.1. Staphylococcus aureus	19
II.6.2. Bacillus cereus.....	19
II.6.3. Candidas albicans	19
II.6.4. Escherichia coli	20
Conclusion	20

Chapitre III : les techniques d'analyses

Introduction.....	21
I. La chromatographie.....	21
I.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	21
I.2. La chromatographie en couche mince (CCM).....	23
I.3. La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	24
I.3.1. Appareillage	24
I.3.1.a. Réservoir de la phase mobile (éluant).....	24
I.3.1.b. la pompe.....	24
I.3.1.c. L'injecteur.....	25
I.3.1.d. La colonne.....	25
I.3.1.e. Le détecteur.....	25
I.3.1.f. L'enregistreur.....	25
I.3.2. Principe	26
II. La spectroscopie	27
II.1. La spectroscopie infrarouge.....	27

II.2. La spectroscopie UV-Visible.....	28
II.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	29
II.4. La spectroscopie d'absorption atomique (SAA).....	31
Conclusion	33

Chapitre IV: Matériels et méthodes

IV.1. Introduction	34
IV.2. Identification et quantification des extraits éthanoliques de la propolis des différentes régions de Bejaia par HPLC	34
IV.2.1. Matériels utilisés.....	34
IV.2.2. Appareillage	35
IV.2.3. Produits utilisés	35
IV.2.4. Méthode	35
IV.3. L'étude des activités biologiques des extraits éthanoliques de propolis des différentes régions.....	35
IV.3.1. L'activité antibactérienne.....	35
IV.3.1.1. Matériels utilisés	35
IV.3.1.2. Appareillages	36
IV.3.1.3. Produits utilisés.....	36
IV.3.1.4. Méthode.....	36
IV.3.2. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)	37
IV.3.2.1. Protocole	37
IV.3.3. Détermination de l'effet bactéricide et bactériostatique de la propolis en utilisant le test de la CMI	38
IV.3.2. L'activité anti-inflammatoire in vitro	39
IV.3.2.1. Matériel utilisé.....	39
IV.3.2.2. Produits chimiques.....	39
IV.3.2.3. Appareillages	39
IV.3.2.4. Méthode.....	40

Chapitre V: Discussion des résultats

V.I. Identification et quantification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de la propolis des différentes régions de Bejaia par HPLC	42
V.I.1. Résultats.....	42
V.I.2. Observation	45

V.I.3. Interprétation	52
V.II. Les activités biologiques des extraits éthanoliques de propolis de différentes régions de Bejaia	53
V.II.1. l'activité antibactérienne.....	53
V.II.1.1. Résultats.....	53
V.II.1.2. Observation	56
V.II.1.3. Interprétation	57
V.II.2. Concentration minimale inhibitrice CMI	57
V.II.2.1. Résultats.....	57
V.II.2.2. Observation	58
V.II.2.3. Interprétation	58
V.II.3. L'activité anti-inflammatoire in vitro.....	59
V.II.3.1. Résultats.....	59
V.II.3.3. Interprétation	61
conclusion générale.....	63

Référence bibliographique

Annexes

Liste des figures

Chapitre I

- ✓ Figures I.1 : l'aspect de la propolis.....[1]
- ✓ Figures I.2 : propolis brute.....[3]
- ✓ Figure I.3 : abeille porteuse de propolis dans la colonie.....[3]
- ✓ Figure I.4 : peuplier.....[3]
- ✓ Figure I.5 : pin.....[3]
- ✓ Figure I.6 : récolte de la propolis par l'abeille dans la ruche.....[4]
- ✓ Figure I.7 : butineuses de la propolis.....[4]
- ✓ Figure I.8 : récolte par grille.....[5]
- ✓ Figure I.9 : récolte par grattage.[5]
- ✓ Figure I.10 : les différentes couleurs de la propolis.....[6]
- ✓ Figure I.11 : composition de la propolis.....[7]
- ✓ Figure I.12 : ultrasons.....[10]
- ✓ Figure I.13 : Four à micro-ondes avec ses principaux composants.....[11]

Chapitre II

- ✓ Figure II.1 : Mécanisme d'action de la propolis comme un agent antibactérien.....[13]
- ✓ Figure II.2 : staphylococcus aureus.....[14]
- ✓ Figure II.3 : Candida albicans.....[15]
- ✓ Figure II.4 : Bacillus cereus.....[15]
- ✓ Figure II.5 : Escherichia coli.....[16]

Chapitre III

- ✓ Figure III.1 : Chromatographie en phase gazeuse.....[21]
- ✓ Figure III.2 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.....[21]
- ✓ Figure III.3 : Schéma d'une chromatographie sur couche mince (CCM).....[23]
- ✓ Figure III.4 : Chromatographie en phase liquide à haute performance.....[25]
- ✓ Figure III.5 : Schéma représentant le fonctionnement de l'HPLC.....[25]
- ✓ Figure III.6 : Spectroscopie infrarouge.....[27]

Liste des figures et tableaux

- ✓ Figure III.7 : Représentation d'un spectrophotomètre UV-visible.....[28]
- ✓ Figure III.8 : Schéma représentatif de principe d'un spectromètre RMN.....[29]
- ✓ Figure III.9 : Photo d'un spectromètre RMN.....[30]
- ✓ Figure III.10 : Présentation d'une spectroscopie d'absorption atomique.....[31]

Chapitre IV

- ✓ Figure IV.1 : Technique d'ensemencement.....[34]
- ✓ Figure IV.2 : Remplissage des boites avec la gélose.....[35]
- ✓ Figure IV.3 : Dépôt des disques.....[35]
- ✓ Figure IV.4 : Les microplaques utilisées pour la détermination de la CMI.....[36]
- ✓ Figure IV.5 : L'activité bactéricide et bactériostatique réalisé à partir de la CMI....[36]
- ✓ Figure IV.6 : Les échantillons dans l'étuve à 37 C°.....[39]
- ✓ Figure IV.7 : Les échantillons dans un bain mari.....[39].

Chapitre V

- ✓ Figure V.1 : Chromatogramme de l'acide p-coumarique.....[40]
- ✓ Figure V.2 : Chromatogramme de l'acide caféique.....[40]
- ✓ Figure V.3 : Chromatogramme de la vanilline.....[41]
- ✓ Figure V.4 : Chromatogramme de l'acide cinnamique.....[41]
- ✓ Figure V.5 : La Coubre d'étalonnage de l'acide p-coumarique.....[42]
- ✓ Figure V.6 : La courbe d'étalonnage de l'acide caféique.....[42]
- ✓ Figure V.7 : La courbe d'étalonnage de la vanilline.....[43]
- ✓ Figure V.8 : La courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique.....[43]
- ✓ Figure V.9 : Chromatogramme de la région d'Elkseur par ultrason.....[44]
- ✓ Figure V.10 : Chromatogramme de la région de Kherrata par ultrason.....[44]
- ✓ Figure V.11 : Chromatogramme de la région de Kendira par ultrason.....[45]
- ✓ Figure V.12 : Chromatogramme de la région de Melbou par ultrason.....[45]
- ✓ Figure V.13 : Chromatogramme de la région d'Akfadou par ultrason.....[46]
- ✓ Figure V.14 : Chromatogramme de la région de Baccaro par ultrason.....[46]
- ✓ Figure V.15 : Chromatogramme de la région d'Adekar par ultrason.....[47]
- ✓ Figure V.16 : Chromatogramme de la région d'El kseur par agitation.....[47]
- ✓ Figure V.17 : Chromatogramme de la région d'Akfadou par agitation.....[48]
- ✓ Figure V.18 : Chromatogramme de la région de Melbou par agitation.....[48]
- ✓ Figure V.19 : Chromatogramme de la région de Kendira par agitation.....[49]

Liste des figures et tableaux

- ✓ Figure V.20 : Chromatogramme de la région de Kherrata par agitation.....[49]
- ✓ Figure V.21 : Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes[52]
- ✓ Figure V.22 : Les diamètres des zones d'inhibition de Bacillus cereus.....[52]
- ✓ Figure V.23 : Les diamètres des zones d'inhibition de Staphylococcus aureus.....[53]
- ✓ Figure V.24 : Les diamètres d'inhibitions de Candida albicans.....[53]
- ✓ Figure V.25 : Les diamètres d'inhibitions d'Escherichia Coli.[54]
- ✓ Figure V.26 : Image qui représente le test de la CMI.....[56]
- ✓ Figure V.27 : Le résultat de l'effet bactéricide et bactériostatique.....[57]
- ✓ Figure V.28 : L'histogramme des différentes régions en fonction du pourcentage d'inhibition....[58]

Liste des tableaux

Chapitre I

- ✓ Tableau I.1 : les différentes classes des polyphénols.....[7]

Chapitre II

- ✓ Tableau II.1 : Les effets pathogènes de chaque bactérie.....[17]

Chapitre V

- ✓ Tableau V.1 : La quantité des composés phénoliques de la propolis de différentes régions.....[50]
- ✓ Tableau V.2 : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions selon les différentes régions de Bejaia.....[51]
- ✓ Tableau V.3 : Résultats de la CMI.....[55]
- ✓ Tableau V.4 : Tableau qui représente les résultats du test anti-inflammatoire... [58]

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ATP : adénosine triphosphate.

E. Coli : Escherichia coli.

SA : staphylococcus aureus.

CA : candida albican.

BC : bacillus cereus.

CPG : la chromatographie en phase gazeuse.

CCM : la chromatographie en couche mince.

UV : ultra violet.

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance.

IR : infrarouge.

RMN : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

RF : radiofréquence.

SAA : spectroscopie d'absorbance atomique.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

DMSO : diméthylsulfoxyde C₂H₆OS.

BSA : albumine de sérum bovin.

NaCl : chlorure de sodium.

NAOH : hydroxyde de sodium.

HCL : chlorure d'hydrogène.

H₂O : l'eau.

TRIS : trisaminométhane.

Introduction générale

Introduction

La nature est connue par la diversité des plantes, cette diversité permet de les utiliser dans plusieurs domaines y compris la médecine, comme traitement curatif et/ou préventif contre des maladies humaines et animales (tels que les abeilles) [1].

La ruche d'abeille est une société organisée, qui fabrique ses produits à base de plantes. Les butineuses récoltent de la résine sur les bourgeons des arbres et des arbustes qu'elles transforment avec leurs enzymes secrétées par le système glandulaire en produisant la **propolis** [2].

D'après l'histoire, la propolis a été utilisée dans la médecine populaire depuis l'ancien temps et son utilisation a été poursuivie jusqu'à ce qu'elle soit découverte de façon corrélativement récente. En effet, la propolis est une matière première naturelle très utilisée et très étudiée de nos jours dans les secteurs : alimentaires, pharmaceutiques, et cosmétiques [1].

Selon la littérature, plusieurs maladies dangereuses sont provoquées par les inflammations et par plusieurs bactéries, pour palier à ce problème il est recommandé d'utiliser les produits d'abeille tels que la propolis.

De nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et même aux effets biologiques de cette substance, en lui accordant de nombreuses propriétés thérapeutiques modernes telles que : l'activité antibactérienne, anti-inflammatoire, antivirale, antioxydante, anticancéreuse, immunomodulatrice ...etc [2].

Le but principal de ce travail est d'évaluer les propriétés biologiques de la propolis algérienne, donc nous sommes intéressés à plusieurs propolis de différentes régions de Béjaïa (Adekar, Akfadou, Baccaro, El kseur, Kendira, Kherrata, et Melbou).

Ce manuscrit est composé de deux parties. La première partie est répartie en trois chapitres, le premier chapitre est consacré sur la présentation de la propolis, de ses propriétés physico-chimiques, sa composition chimique, et de ses diverses activités biologiques, Le second chapitre traite l'étude de l'activité antibactérienne de la propolis, et le dernier chapitre comporte les différentes méthodes et les techniques d'analyses.

Dans la seconde partie, nous avons caractérisé et identifié les composés chimiques de la propolis de différentes régions de Béjaïa, et enfin nous avons déterminé leurs activités antibactérienne et anti-inflammatoire.

Chapitre I : La propolis

I.1. Introduction

La propolis est l'un des précieux produits de la ruche, c'est une matière végétale produite par les abeilles qui est considéré comme une source de thérapie. Cette résine est utilisée par les abeilles comme anti-infectieux pour protéger les entrées de la colonie contre les corps étrangers et pour garantir l'asepsie de leur ruche [1].

I.2. Historique

Les premières traces de la propolis remontent à l'Égypte antique, qui est utilisée par les grands prêtres de l'époque pour les embaumants des momies

A Rome, chaque soldat romain en avait une petite quantité sur lui au moment des campagnes militaires pour guérir les plaies, et elle se vendait plus cher que le miel [3].

Au XI^e siècle, la propolis était conseillée pour désinfecter et cicatriser les blessures des flèches. Les ouvrages du moyen-âge européen décrivaient même les préparations médicales à base de propolis pour les traitements des maladies de la bouche et de respiration [1].

A la fin de XXI^e siècle, un important marché de la propolis existe en Russie et en Allemagne, c'était un remède populaire qui est exploité pour soigner tous les maux [4].

I.3. Étymologie du mot propolis

Le mot propolis est d'origine grecque, il signifie 'pro' devant, et 'polis' cité, elle est observé par les apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche "devant cité". son étymologie dérive aussi du verbe propolire qui signifie « enduire ». En effet l'abeille couvrait l'intérieur de son abri de cette résine pour se protéger des agressions microbiennes [5,6].



Figure I.1. L'aspect de la propolis

I.4. Définition

La propolis ou colle d'abeille désigne une série de substances résineuses, gommeuses et balsamique, de consistance visqueuse, récoltées par les abeilles sur les bourgeons de certains arbres [7]. A l'intérieur de la ruche les abeilles modifient laborieusement ces résines avec leurs propres sécrétions afin d'obtenir la propolis, sa biodiversité la rend difficile à

Chapitre I : La propolis

standardiser [8], son utilisation par les abeilles est comme un moyen de défense contre les micro-organismes pathogènes, et pour embaumer les intrus qui peuvent entrer dans la ruche en empêchant leur décompositions [9].



Figure I.2. Propolis brute



Figure I.3. Abeilles porteuses de propolis

Dans la colonie

I.5. Origine de la propolis

La composition de la propolis est issue de trois sources :

- a. **Origine botanique** : il existe plusieurs types de propolis qui sont produits en fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone, de leur disponibilité pendant la saison et de l'espèce de l'abeille.

Les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont représentés par différents confères (pin, sapin, épicéa), et plusieurs espèces de peupliers (qui semblent la source la plus riche) [8].

- b. **Animal** : substances fabriquées par les abeilles (la cire, la salive) [10].
- c. **Matières secondaires** : ajoutées pendant la production de la propolis (le pollen, le nectar ou le miel), selon l'origine de la plante récoltée par les abeilles [10].



Figure I.4. Peuplier



Figure I.5. Pin

I.6. Récolte de la propolis

I.6.1. récolte de la propolis par les abeilles

La récolte des résines et la fabrication de la propolis est une spécialité d'un certain nombre de butineuses, au sein d'une colonie d'abeilles (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). Elles localisent la source de résines et triturent celle-ci avec leurs mandibules, et les mélangent à d'autres substances de leurs propres sécrétions afin de fabriquer de la propolis [11].



Figure I.6. Récolte de propolis par l'abeille dans la ruche



Figure I.7. Butineuses de propolis

I.6.2. Récolte de la propolis par l'homme

Plusieurs techniques de récolte existent. On peut différencier la quantité de la propolis en fonction des techniques utilisées [12].

- Les techniques classiques les plus utilisées sont par raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis est alors dure et friable, après la récolte elle doit être nettoyée avant son utilisation (enlever les morceaux de bois, les pattes ou ailes d'abeilles, de la cire etc.)
- La technique des grilles qui est spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis d'une meilleure qualité qui contient moins d'impureté [13].



Figure I.8. Récolte par grille



Figure I.9. Récolte par grattage

I.7. Les propriétés de la propolis

I.7.1. Propriétés physiques

➤ Consistance

La propolis est une substance de consistance variable dépend de la température :

- 15°C, elle est dure et friable.
- 30°C, elle est molle et malléable.
- Entre 30°C et 60°C, elle est coulante et gluante.

Le point de fusion est variable, il se situe vers 60 à 70°C en moyenne, mais il peut atteindre 100°C et plus [3].

➤ Caractéristiques organoleptiques

La propolis est une substance résineuse d'aspect hétérogène qui présente les particularités suivantes :

- **Odeur** : elle a une odeur variable suivant son origine, en général, arôme agréable douceâtre, mélangé à celui de miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc...).
- **Saveur** : elle est acre, piquante, parfois amère, qui donne une insensibilisation de la muqueuse buccale.
- **Couleur** : elle varie selon sa provenance, allant de jaune claire au brun très foncé, presque noire en passant par toutes les gammes des bruns (brun jaune, brun vert et brun rouge) [14].



Figure I.10. Différentes couleurs de propolis

I.7.2. Propriétés chimiques

- **Solubilité :** elle est très peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'alcool, acétone, benzène, éther...
- **Point de fusion :** son point de fusion se situe autour de 70°C. chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties :
 - L'une visqueuse qui tombe au fond.
 - L'autre liquide (cire de propolis) qui surnage à la surface et trouve de nombreux usages dans le domaine apicole.
- **La densité :** la densité de la propolis est de 1,2 (soit supérieure à celle de l'eau) [8].

I.8. La composition de la propolis

La composition chimique de la propolis est très complexe avec presque 150 constituants différents. Toutefois, elle peut être fortement variée d'une espèce à une autre. Elle varie selon l'origine botanique et géographique des plantes visitées par les abeilles [2].

La propolis contient les composants suivants :

- Résines et baumes 55%
- Cire et acide gras 30%
- Huiles volatiles ou essentielles 5 %
- Pollen 5%
- Matières diverses 5%

Chapitre I : La propolis

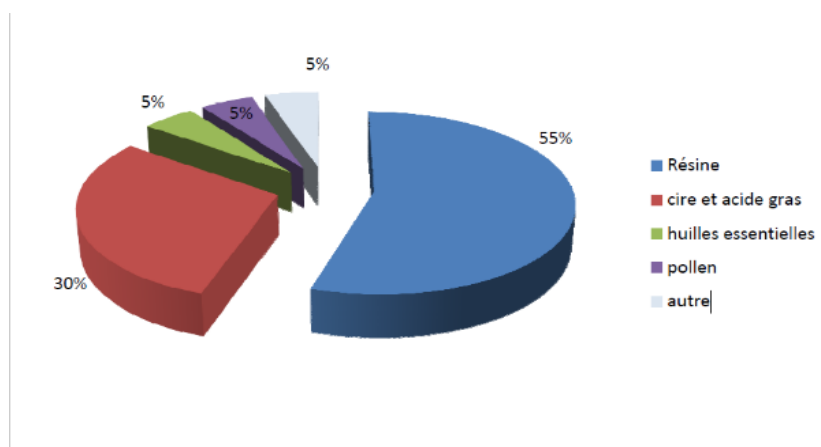
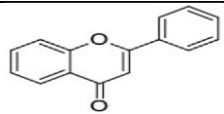
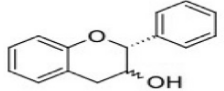
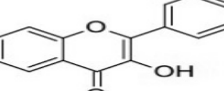
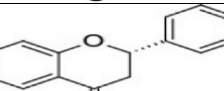
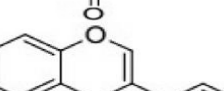
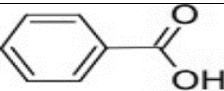



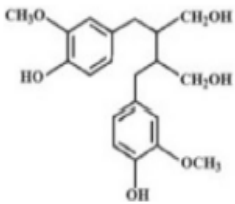
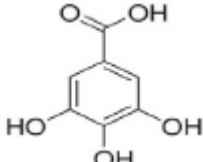
Figure I.11. Composition de la propolis [2].

Quelques principales classes des polyphénols sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau I.1. Différentes classes de polyphénol

Classe	Sous-classe		Exemple	Structure basique
Flavonoïdes	Flavones		Chrysine, acacétine	
	Flavanols		Catéchine, épicatechine	
	Flavonols		Myricétine, quercétine	
	Flavanones		Naringénine, naringine	
	Isoflavones		Génistéine, glycitén	
Non-flavonoïdes	Les phénols simples et les acides phénoliques	Acides hydroxy-benzoïques	Acide gallique, acide vanillique, Acide salicylique	
		Acides hydroxy-cinnamiques	Acide cinnamique, Acide p-coumarique, Acide caféique	

Chapitre I : La propolis

	Lignanes et lignines	Pinorésinol, podophyllotoxine, steganacin	
	Tannins	Castalin, glucose, Procyanidine	

I.9. Effets thérapeutique de la propolis

La propolis possède de nombreuses activités biologiques grâce à sa composition chimique qui est complexe, elle est influencée par plusieurs facteurs tel que : l'origine phytogéographique, la période de récolte (saison), et le type d'abeilles (espèces) qui fourragent [15].

I.9.1. propriétés antioxydantes

Comme tout produit contenant des phénols et des flavonoïdes, la propolis a une activité antioxydante remarquable qui est due à sa capacité de diminuer, d'empêcher les réactions d'oxydation, et de prévenir de nombreuses maladies.

Les antioxydants naturels les plus connus sont le β - carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés polyphénoliques en général [16].

I.9.2. Propriétés anti-inflammatoire

L'effet anti inflammatoire de la propolis est proche à celle de l'Aspirine. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les flavonoïdes lui confère cette action qui est utile dans les inflammations de la cornée, de la trachée, du pharynx (lors d'intubation prolongée par exemple) ou dans l'arthrite rhumatismale [17, 16].

I.9.3. Propriétés antivirales

Après de nombreuses recherches la propolis a prouvé son activité antivirale sur certain mammifères notamment vis- à- vis des virus d'herpes vertébrés, aussi contre la grippe, l'hépatite B, et le zona.

Chapitre I : La propolis

I.9.4. les effets de la propolis sur le corona virus

D'après les études actuelles, les composés phénoliques présents dans la propolis (dont l'ester phényléthyque de l'acide caféique, le kaempférol, la quercétine...) ont montré in vitro et in vivo une activité inhibitrice sur les facteurs physiologiques responsables de la pénétration du virus à l'intérieur des cellules.

D'autre part, des essais précliniques ont révélé que la propolis inhibe l'inflammation (en régulant les cytokines pro-inflammatoires) qui est habituellement observée dans les formes les plus virulentes de Covid-19. Aussi, selon des modélisations informatiques, elle pourrait avoir un effet bloqueur sur une enzyme essentielle qui contribue dans la réplication de SARS-Cov-2 [18].

I.9.5. Autres propriétés

Voici quelque autres propriétés biologiques de la propolis [19] :

- Effet antiparasitaire
- Effets analgésique
- Effet anesthésique
- Effet immun-modulateur
- Effet cicatrisant
- Effet anti-oncotique
- Effet protecteur de muqueuse gastrique
- Effet anti-UV
- Effet laxatif
- Effet hépato-protecteur

I.10. Extraction

La propolis peut être utilisée pure, mais pour une utilisation médicale à plus grande échelle elle nécessite des méthodes d'extraction, pour obtenir des solutions dans lesquelles les constituants de la propolis seront identifiables et quantifiables.

Chapitre I : La propolis

❖ Méthode d'extraction

➤ Extraction conventionnelle par solvant

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques, elle consiste à mettre en contact la matière première avec un solvant dans lequel la substance à extraire est soluble. Les paramètres les plus importants qui doivent être pris en compte :

- Le type et la concentration du solvant organique
- La température
- Le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction

➤ Extraction assistée par ultrasons

L'extraction par ultrasons est une méthode simple et rapide qui est utilisée pour l'extraction des composés naturels vers une phase liquide appropriée, assistée par des ondes mécanique et ultrasonores qui se propagent à travers les milieux liquides. L'utilisation des ultrasons permet d'effectuer des extractions dans des courtes durées de 30 à 60 min, a une basse température de 30 à 40°C, en utilisant soit le méthanol ou l'éthanol en tant que solvant et en appliquant des puissances variante de 30 W à 150 W [5].



Figure I.12. Bain ultrason

Chapitre I : La propolis

➤ Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est un procédé par lequel l'énergie micro-onde accélère l'extraction. Ce traitement stimule la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales. L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée en utilisant du méthanol ou de l'éthanol, à température élevée, pendant une courte durée.

Une puissance micro-ondes inférieure à 400W permet d'éviter la dégradation des composés phénoliques. Les principaux paramètres de l'extraction assistée par micro-ondes sont : le type de solvant, la puissance micro-ondes et le temps d'extraction [20].

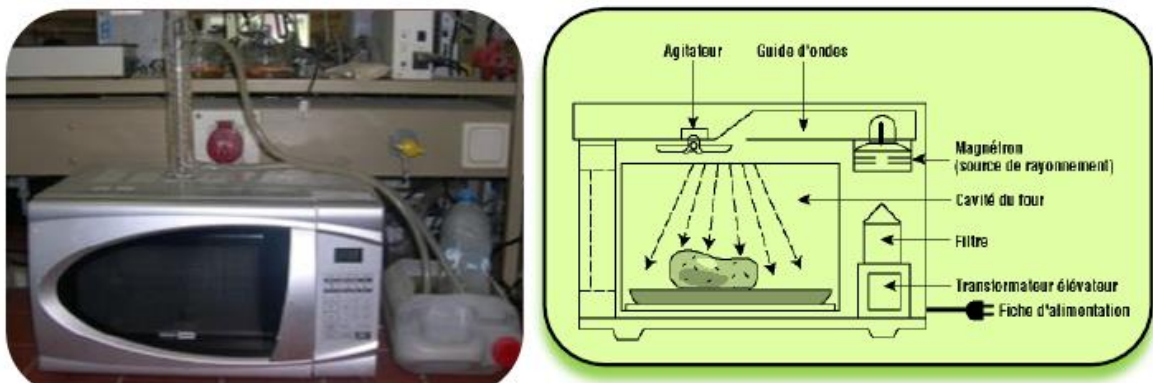


Figure I.13. Four à micro-ondes avec ses principaux composants.

I.11. La toxicité

Des nombreuses expériences sont effectuées pour étudier la toxicité de la propolis sur l'organisme humain et animal, les résultats obtenus ont montré que la propolis n'est nullement toxique, elle est sans effet néfaste sur la structure cellulaire des organes et procure aucune transformation plasmatique. Mais il est souhaitable de faire un test d'allergie pour le produit à consommer ou à appliquer [21].

I.12. La conservation

La propolis est un produit facile à conserver. La conservation se fait à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur (à -18°C ou à 4°C pour l'extrait) dans des récipients opaque, bien fermer. De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa teneur en composants chimiques, ni de ses activités biologiques. Pour obtenir des meilleurs effets et résultats, il est préférable toujours de l'utiliser bien fraîche que possible [3, 13].

Chapitre I : La propolis

Conclusion

Pour conclure la propolis est l'une des substances naturelles les plus utilisées en médecine pour sa richesse en composition chimique, et qui est connue par ses diverses activités biologiques.

Chapitre II :
Activité antibactérienne de la
propolis

I. Introduction

La composition complexe de la propolis fait l'objet de nombreuses études sur différentes activités biologiques, attribuées à ce produit. Les composés phénoliques représentent les composants les plus importants de la propolis, car ils sont considérés comme responsables de la plupart de ses propriétés pharmacologiques [22].

II. Activité antibactérienne de la propolis

II.1. Définition

L'effet antibactérien de la propolis et de ses constituants reste le plus largement documenté [23]. Les études portent sur les différents germes, aérobies et anaérobies, sur les types Gram positifs et Gram négatifs. Cette activité est due principalement aux composés phénoliques, terpéniques... liée à son action sur le fonctionnement essentielle de la cellule [24].

II.2. Historique

La première étude sur l'activité antibactérienne de la propolis a été réalisée par Kivalkina dans les années 1940, les propriétés bactériostatiques de la propolis ont trouvé des résultats positifs sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus propigiosus*, une grande sensibilité des *Staphylocoques* blancs, dorés et sur les bacilles pyocyaniques. Par la suite, et en 1958 l'activité de divers extraits de cette substance a été prouvée sur plusieurs souches de bacille et sur la tuberculose [23].

II.3. Mécanisme d'action

La richesse de la propolis en substances actives lui permet d'avoir un pouvoir antibactérien très important, parmi ces substances celle qui inhibent la synthèse de la protéine, la croissance bactérienne et d'autres qui désorganisent la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire (les flavonoïdes diminuent le potentiel de la membrane bactérienne et provoquent une altération de la perméabilité) [25].

Les flavonoïdes sont responsables de la plupart des activités biologiques, bien qu'ils aient un effet principal sur une large gamme de micro-organismes, avec un mécanisme d'action probablement basé sur l'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique [26, 27].

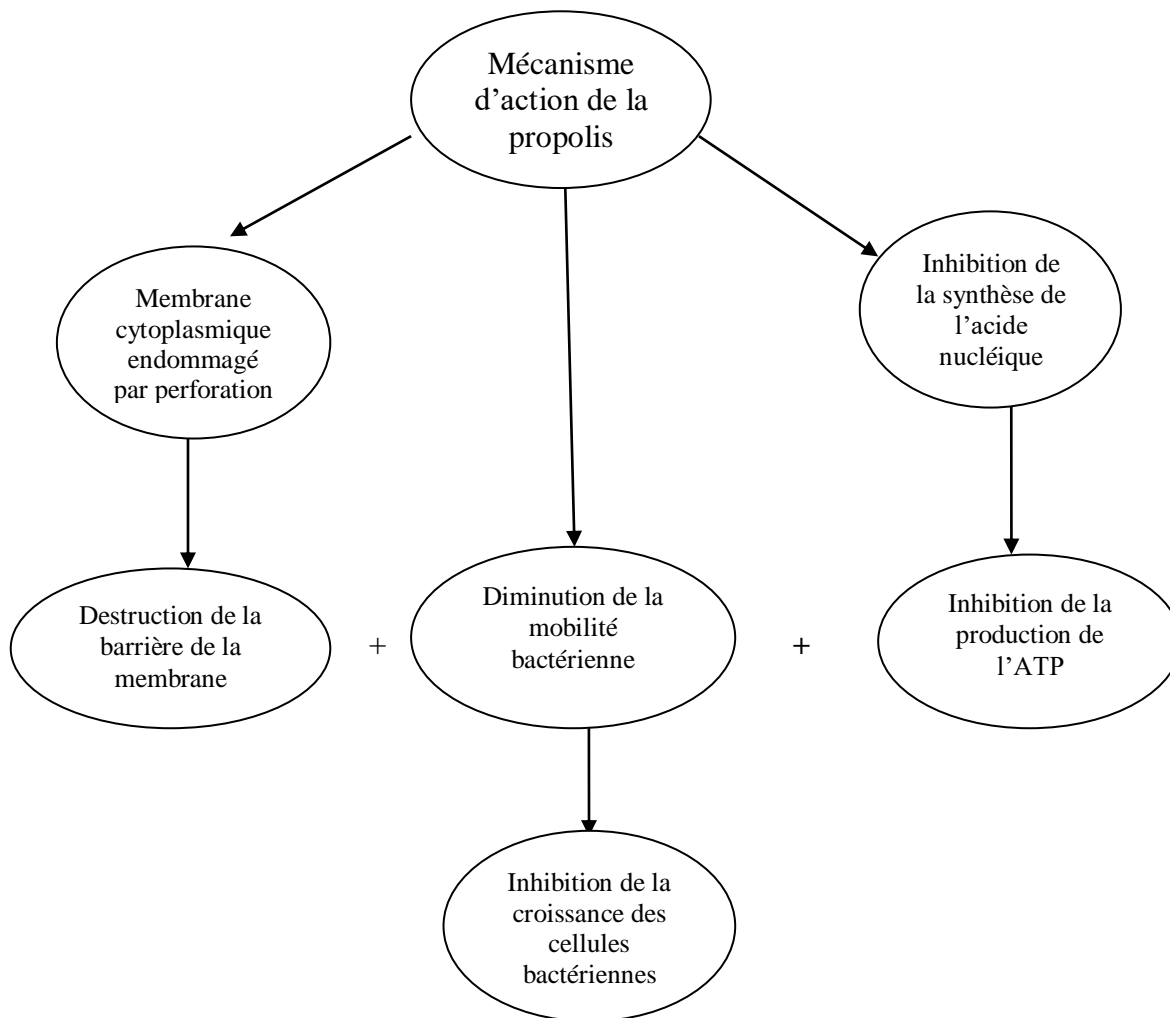


Figure II.1. Mécanisme d'action de la propolis comme un agent antibactérien

II.4. Description des bactéries

La différence de coloration entre des bactéries Gram positives et des bactéries Gram négatives est due à des différences au niveau de leurs parois cellulaires. Elles sont également responsables de différents types d'infection, et sont sensibles aux différents types d'antibiotiques [28].

Les bactéries Gram positives se colorent en bleu lorsque cette coloration est appliquée. D'autres bactéries se colorent en rouge, elles sont dites Gram négatives.

II.4.1. Les staphylococcus aureus

C'est une bactérie du genre coques, de gram positives et coagulas positive, elle se trouve dans l'environnement extérieur, sur la peau, et les muqueuses, comme on peut la trouver en commensaux sur les épithéliums de l'homme et des animaux [29].

II.4.1.1. Morphologies

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, sporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [30].

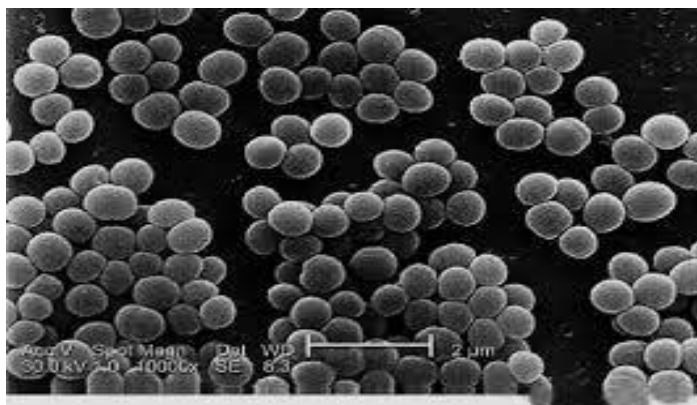


Figure II.2. *Staphylococcus aureus*

II.4.2. *Candida albicans*

Les *Candida albicans* font partie de la famille des champignons, ce sont des mycotiques, habituellement inoffensifs.

Ils sont présents au niveau des voies génitales, dans la muqueuse digestive, dans la bouche et sur la peau [31].

II.4.2.1. Morphologie

Ils se présentent toujours comme des petites levures rondes ou ovalaires de 2 à 4 microns, non capsulé, non pigmentée et aérobie, souvent accompagnées de filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens.



Figure II.3. *Candida albicans*

II.4.3. *Bacillus cereus*

C'est des bactéries de gram positive, de type bacille, elles sont saprophytes. On peut les rencontrer dans de nombreux environnements (denrées alimentaires, le sol, les eaux...) [32].

II.4.3.1 morphologie

Ce sont des bactéries de forme bacille, avec des dimensions variables qui peuvent aller de (0,5 par 1,2 μm) jusqu'à (2,5 par 10 μm). Elles peuvent être aérobies ou aéro-anaérobies, qui sont capables de produire des endospores en leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables [33].



Figure II.4. *Bacillus cereus*

II.4.4. Escherichia coli

Appelée également colibacille, c'est une bactérie intestinale de gram négative. La majorité des souches E. coli sont inoffensives, et quelques une seulement sont pathogènes pour l'homme [30].

II.4.4.1. Morphologies

Sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [14].

Elle se forme en rassemblant des bacilles droits, à Gram négatif, non sporulés, parfois capsulés, immobiles ou mobiles grâce à une ciliature péritriche ou aéro-anaérobie.

E. coli constitue la majeure partie de la flore microbienne du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux.



Figure II.5.Escherichia coli

II.5. Le pouvoir pathogène de chaque bactérie

Les bactéries pathogènes sont des bactéries responsables d'une maladie ou d'une infection. Ce pouvoir pathogène dépend de type de maladie et de l'espèce bactérienne qui est responsable de l'infection, le tableau ci-dessous résume quelques infections provoqué par les bactéries présentées avant :

Chapitre II : L'activité antibactérienne de la propolis

Tableau II.1. Les effets pathogènes de chaque bactérie

Les bactéries	Les effets pathogènes
<p style="text-align: center;">Staphylococcus aureus</p>	<p>-La diarrhée, ostéomyélite et la méningite [14]. -Des infections cutanées, des valves et des infections osseuses. -Des infections de la circulation sanguine. -Des infections endocardites ostéomyélites et pulmonaires [33].</p>
<p style="text-align: center;">Candida albicans</p>	<p>- Un muguet au niveau de la bouche. - Des rougeurs et démangeaisons au niveau cutané. - Des inflammations locales génitales comme une urétrite chez l'homme ou vulvo-vaginite avec pertes blanchâtres et démangeaisons chez la femme [31].</p>
<p style="text-align: center;">Bacillus cereus</p>	<p>- La maladie du charbon ou fièvre charbonneuse. - La toxi-infection, infections urinaires, les diarrhées, les péritonites. - Les infections septicémies. Elle provoque la peste, le choléra et la fièvre typhoïde [33,34].</p>
<p style="text-align: center;">Staphylococcus aureus</p>	<p>-Les infections urinaires, les gastro-entérites ou les speiss. -Certains souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme -des infections spontanées des voies -digestives ou urinaires, ou bien encore des méningites néo-natale [35].</p>

II.6. Comment la propolis réagit-elle sur chacune des bactéries ?

Parmi les sources naturelles d'agents antimicrobiens utilisés pour traiter les maladies infectieuses, on trouve la propolis.

Des études ont montré que quelques souches sont sensibles à la propolis, cette dernière a un large spectre antibactérien, avec une forte activité sur les GRAM positive et encore sur les GRAM négative [36].

II.6.1. Staphylococcus aureus

Actuellement cette bactérie est traitée par la β - lactamines, cependant les souches résistantes présentent un problème majeur de santé publique, car ces bactéries peuvent être circulées dans l'environnement.

Des études ont révélé que les Staphylocoques pouvaient avoir de différentes résistances face aux antibiotiques, plus précisément les Staphylococcus aureus ont développé une résistance aux β -lactamines par synthèse de chromosomes ou de plasmides codant les β -lactamases.

L'extrait de propolis est connu pour son effet antibactérien grâce à sa composition chimique, comme les polyphénols et les flavonoïdes. Les polyphénols exercent leur action à travers des perturbations de la membrane. Ces perturbations de la membrane cellulaire, couplées à l'action des beta- lactamines, ce qui pourraient mener à une augmentation des effets antibactériens [37].

II.6.2. Bacillus cereus

L'efficacité de la propolis a été prouvée sur les bacilles de type GRAM positif, mais également sur bacillus cereus qui est responsable des infections et des intoxications [32].

II.6.3. Candida albicans

Candida est une bactérie qui cause des pathologies humaines, mais qui présente des résistances aux antibiotiques, la recherche actuelle est focalisée sur des nouvelles substances qui présentent une activité antifongique. La propolis est parmi ces substances qui ont un effet fongicide puissant.

L'effet de la propolis contre Candida s'explique par ses activités fongistatique et fongicide. La propolis inhibe le dimorphisme de Candida. Ce dimorphisme permet au champignon de passer de l'état de levure à celui d'hyphe. Pour ce qui est de l'activité fongicide de la propolis

Chapitre II : L'activité antibactérienne de la propolis

des champignons du genre *Candida*, elle contribue à l'activation des capasses, qui jouent un rôle lors de l'apoptose, qui contrôle la prolifération [38].

II.6.4. *Escherichia coli*

L'*Escherichia coli* est une bactérie à GRAM négatif qui est la cause principale des infections du tractus urinaire [28].

Elle présente une sensibilité et une fragilité pour la propolis, il a été prouvé dans certain cas son association avec des antibiotiques peut réduire son adhésion avec les cellules.

La propolis est utilisée comme un irrigant efficace pour l'élimination complète d'*E. Coli*, cependant elle ne pouvait pas éliminer les endotoxines présentes dans le canal de la racine, parce que ces derniers sont libérés pendant la mort bactérienne et l'extrait de propolis élimine complètement *E. coli* [14].

Conclusion

La propolis est une alternative thérapeutique que l'on peut utiliser dans de nombreuses pathologies humaines. Les domaines d'utilisation de la propolis sont très variés. Outre son activité bactériostatique et bactéricide est la plus largement documentée, elle permet de combattre de nombreux champignons pathogènes, des virus et certains parasites

Chapitre III :
Les techniques d'analyses

Introduction

La chimie analytique est une science qui étudie le comportement et l'analyse des espèces chimiques, elle met en œuvre des techniques physico-chimiques de détection, d'identification, de caractérisation, et de quantification de composées chimiques et biochimiques.

Les méthodes utilisées permettent d'effectuer des analyses quantitatives et qualitatives, les applications de ces méthodes dépendent de l'identification des molécules dans un échantillon, et de la validation de la méthode de production [39].

I. La chromatographie

La chromatographie est une méthode qui permet la séparation ou la purification des constituants d'un mélange variés, même très complexe, qui a pour objet de les identifier et de les quantifier [40].

Il existe trois principaux types de chromatographie :

I.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

C'est une chromatographie de partage dans laquelle la phase mobile est un gaz. Elle est considérée comme la méthode la plus puissante pour séparer, identifier, et quantifier les corps gazeux et volatilisable.

La CPG est basé sur l'équilibre de partage des analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire. La séparation repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire.

Le mélange à analyser est injecté dans une colonne qui comprend une phase liquide stationnaire. Le transport se fait à l'aide d'un gaz inerte, appelé gaz vecteur qui est la phase mobile [41].

On distingue deux modes de chromatographie en phase gazeuse :

- La chromatographie de partage (ou la chromatographie gaz-liquide (CGL)) : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte par imprégnation ou par greffage.
- La chromatographie d'adsorption (ou chromatographie gaz-solide (CGS)) : la phase stationnaire est un solide poreux adsorbant.

Chapitre III : Les techniques d'analyse



Figure III.1. Chromatographie en phase gazeuse.

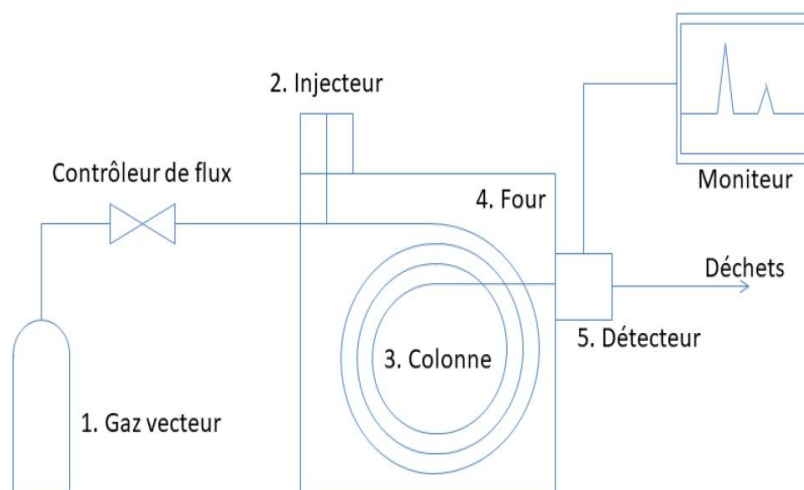


Figure III.2. Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse

I.2. La chromatographie en couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est la méthode la plus simple et la plus facile, une des principales techniques utilisées dans les laboratoires dans le but d'analyser, de purifier, et de séparer les composants.

L'avantage qui présente cette méthode est qu'elle nécessite peu de matériel, elle comprend :

- ✓ une phase mobile liquide ou éluant : c'est un solvant ou un mélange de solvant qui va entraîner les composés à séparer le long de la phase stationnaire.
- ✓ Une phase stationnaire : une couche mince d'environ 0.25 d'adsorbant (plus souvent le gel de silice, l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose), qui est fixé sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté, l'amidon ou un polymère organique[42].

• Principe de la chromatographie sur couche mince

- ✓ L'échantillon à analyser est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium).
- ✓ il est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou éluant), et migre avec lui.
- ✓ Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est plus ou moins entraîné par l'éluant en fonction de son affinité avec la silice.
- ✓ Après migration les taches doivent être révélées, la détection peut se faire par :
 - Pulvérisation d'un réactif caractéristique ;
 - Par immersion dans un bain de permanganate de potassium ;
 - Par pulvérisation de vapeur de diode ;
 - Par observation à la lumière UV si la plaque silice comporte un indicateur de fluorescence.

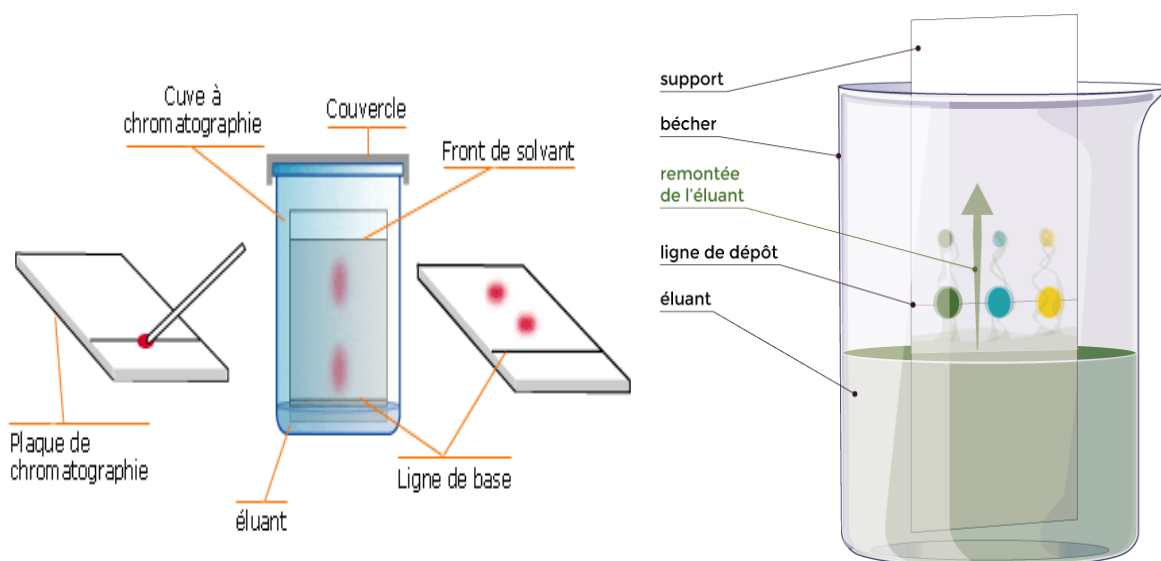


Figure III.3. Schéma d'une chromatographie sur couche mince (CCM)

I.3. La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide est une chromatographie à haute pression dont la phase mobile est un fluide (liquide) qui parcourt des tubes appelés colonnes en verre, cette méthode a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible coupler avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse et c'est la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique[43].

Les composés à séparer (soluté) doivent être préparés sous forme d'une solution, en les diluants dans la phase mobile à l'entrée de la colonne (éluant).

I.3.1.Appareillage

Un appareillage d' HPLC se compose de différents organes qui sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus. Elle est composée de :

I.3.1.a. Réservoir de la phase mobile (éluant) : il contient la phase mobile qui est pompée à partir d'une bouteille

I.3.1.b. La pompe : pour assurer l'écoulement de la phase mobile à un débit constant avec une certaine pression dans la colonne, elle permet de travailler :

- ✓ En mode isocratique : c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.

Chapitre III : Les techniques d'analyse

- ✓ En mode gradient: c'est-à-dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min [44].

I.3.1.c. L'injecteur :

L'injection de l'échantillon se fait en deux manières :

- ✓ Manuelle
- ✓ Automatique [45].

I.3.1.d. La colonne :

C'est l'élément principal de l'HPLC.

I.3.1. e. Le détecteur :

il est relié à la sortie de la colonne. Il permet de détecter l'apparition des solutés. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps.

Il existe des différents types de détecteur :

- ✓ réfractomètre différentiel
- ✓ UV à barrette de diodes
- ✓ électrochimique
- ✓ Fluorimétrie...

Ainsi que différents types de couplage :

- ✓ Spectrométrie infrarouge
- ✓ Spectrométrie de masse
- ✓ Résonance Magnétique Nucléaire... [46].

I.3.1.f. L'enregistreur :

Reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration d'analyse qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. [47]

Il existe deux méthodes de séparation en HPLC :

- ✓ la chromatographie liquide à haute performance en phase normal.
- ✓ La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse [48].

Chapitre III : Les techniques d'analyse

I.3.2. Principe

La phase mobile est poussée par une pompe sous haute pression, donc le mélange à analyser est transporté grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté soumis à une rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile.

Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique.

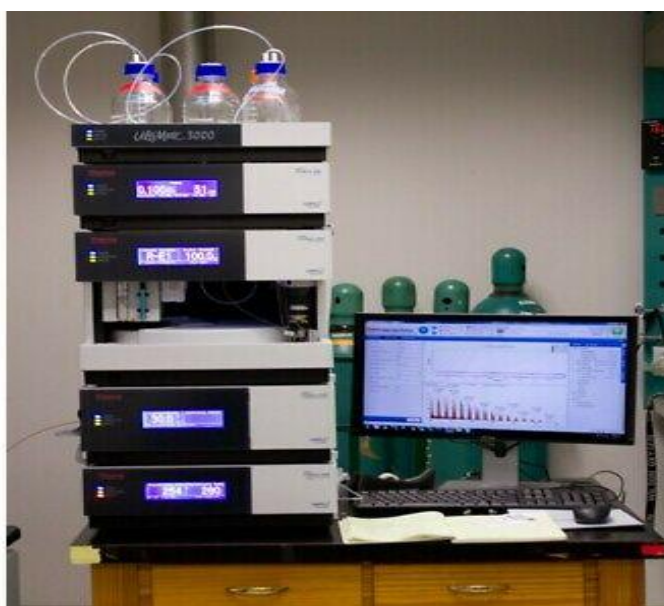


Figure III.4. Chromatographie en phase liquide à haute performance

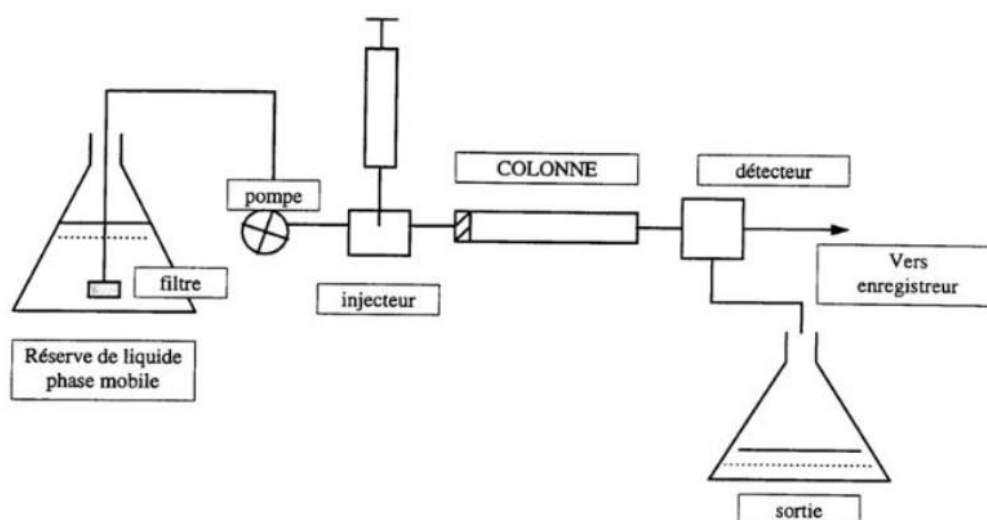


Figure III.5. Schéma représentant le fonctionnement de l'HPLC

II. La spectroscopie

La spectroscopie est l'étude des rayonnements électromagnétiques émis, absorbés ou diffusés par la matière, autrement dit c'est l'ensemble des méthodes d'analyses spectrales permettant d'accéder à la composition et à la structure de la matière.

La spectrométrie est fondée sur l'étude qualitative et quantitative des spectres fournis par l'interaction de la matière avec divers rayonnement comme la lumière, les rayons X et les électrons.

II.1. La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est considérée comme une méthode analytique basée sur l'absorption d'un rayonnement électromagnétique IR. Elle permet l'identification des fonctions chimiques par les vibrations caractéristiques (vibration d'élongation ou de déformation), par des liaisons existantes dans l'échantillon à analyser, avec les conditions normales de pression et de température.

L'absorption du rayonnement IR par les composés organiques correspond à deux types principaux de vibrations atomiques :

- ✓ Vibration de valence ou d'élongation.
- ✓ Vibration de déformation angulaire.

Les impuretés des produits analysés peuvent être aussi détectées par une comparaison avec le spectre de référence, la sensibilité aux structures moléculaires donne la possibilité d'identifier de nouveaux produits [49].

Chapitre III : Les techniques d'analyse

➤ Principe de la spectroscopie infrarouge

L'échantillon est soumis à un domaine d'application de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} .



Lorsque la fréquence de cette radiation est égale à la fréquence de résonance de l'oscillateur harmonique, il y a absorption de l'énergie lumineuse et amplification des vibrations.



L'état excité ne dure qu'une fraction de seconde. Le retour à l'état fondamental libère l'énergie absorbée sous forme de chaleur.

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse qualitative et quantitative, elle permet l'identification de matières premières pour assurer les réactions colorées et la préparation des produits caractéristiques dont on mesure le point de fusion[50].

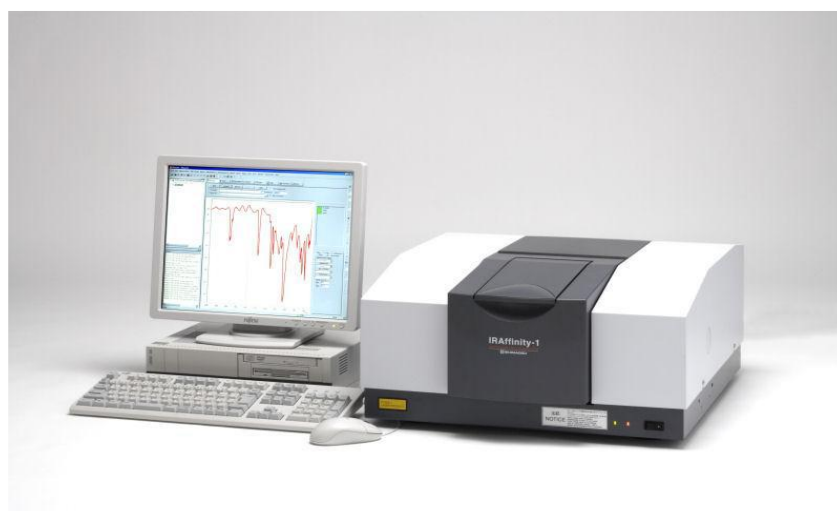


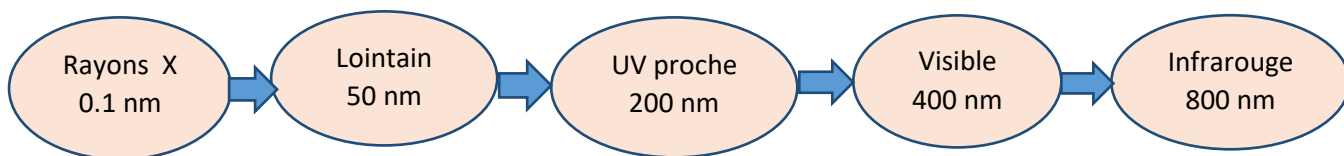
Figure III.6. Spectroscopie infrarouge

II.2. La spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est une technique analytique fondée sur la propriété des molécules à absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde bien déterminée.

Dans une molécule, les transitions électroniques ont lieu dans la région de l'ultraviolet et du visible. Le domaine UV-Visible s'étend environ de 200 à 800 nm [51].

Chapitre III : Les techniques d'analyse



➤ Principe de la spectroscopie UV-Visible

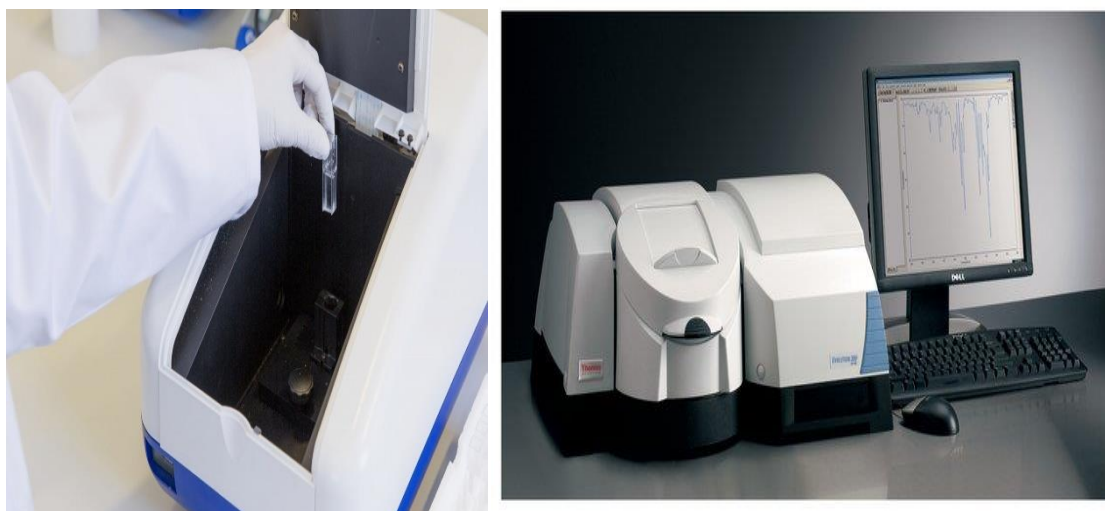
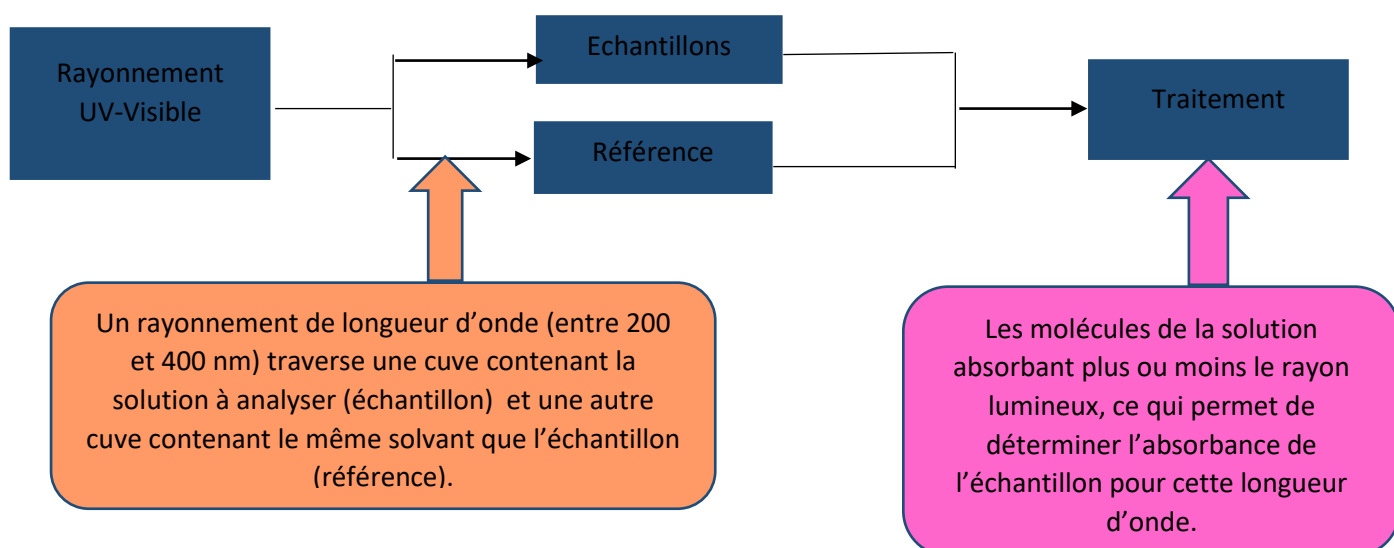


Figure III.7. Représentation d'un spectrophotomètre UV-visible

II.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une technique d'analyse spectroscopique qui permet de déterminer la structure d'une molécule organique. Elle est basée sur la mesure de

Chapitre III : Les techniques d'analyse

l'absorption et de la radiofréquence (RF) par un noyau atomique dans un champ magnétique très intense [52,53].

La spectroscopie par RMN constitue l'un des plus puissants instruments de détermination de la structure des espèces organiques aussi bien qu'inorganiques. Cette technique s'est également montrée utile dans la détermination quantitative des espèces absorbantes.

✓ Principe de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Tous les noyaux atomiques possèdent une charge en rotation, identifiée sous le nom de **spin** nucléaire (ils sont assimilables à des petits aimants et de ce fait peuvent présenter un moment magnétique nucléaire).

Le principe de la RMN est de faire passer le moment magnétique nucléaire d'un niveau d'énergie plus bas vers un niveau plus haut par absorption d'un photon. Lorsque l'énergie du photon est libérée, elle permet d'obtenir une transition à une fréquence bien déterminé dite résonance [54].

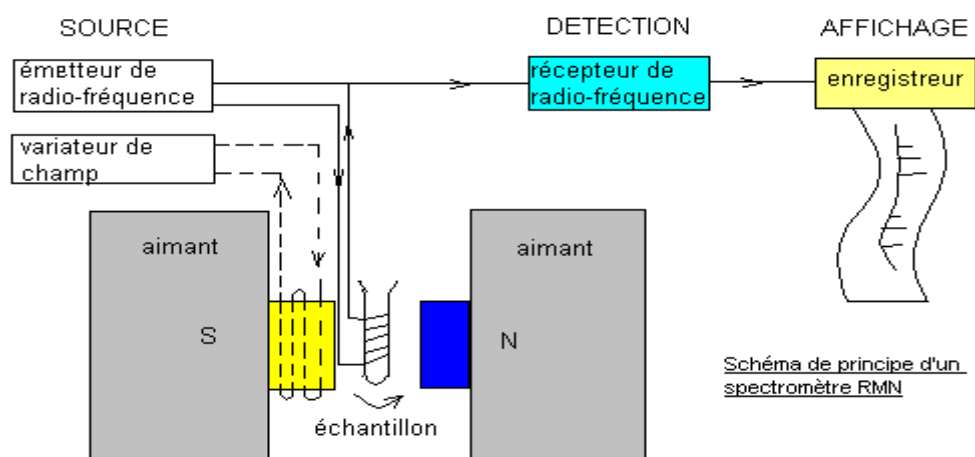


Figure III.8. Schéma représentatif de principe d'un spectromètre RMN



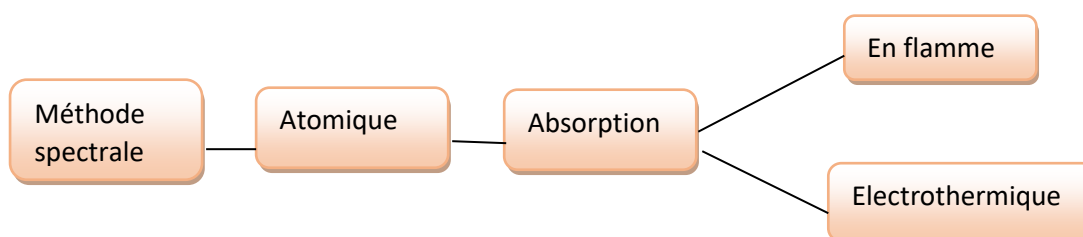
Figure III.9. Photo d'un spectromètre RMN

II.4. La spectroscopie d'absorption atomique (SAA)

La spectroscopie d'absorption atomique est une technique qui permet de quantifier les éléments chimiques en solution. La SAA est très répandue pour l'analyse minérale.

Cette technique est basée sur des méthodes optiques, elle conduit à des résultats qualitatifs qu'à des données quantitatives. L'absorption est utilisée généralement pour faire un dosage, d'élément connu, et pour déterminer sa concentration.

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est une technique qui possède une haute sensibilité et une grande spécificité, et dans cette technique l'influence de la composition du milieu analysé est négligeable [55].



Chapitre III : Les techniques d'analyse

✓ Principe de la spectroscopie d'absorption atomique (SAA)

La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'onde, en les faisant quitter l'état fondamentale vers un état excité.

La quantité d'énergie lumineuse absorbée est proportionnelle au nombre d'atomes analytes dans le trajet optique.

La technique est étalonnée en introduisant des concentrations connues d'atomes analytes dans le trajet optique et en faisant un graphique d'absorption par rapport à la concentration [55].

✓ Schéma d'une installation générale d'une Spectroscopie d'absorption atomique :

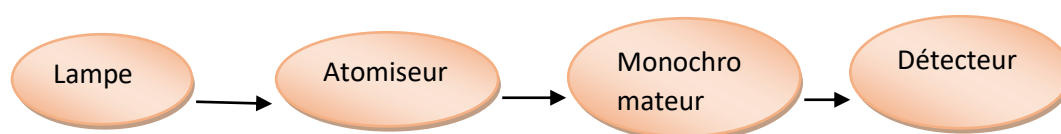


Figure III.10. Présentation d'une spectroscopie d'absorption atomique

Chapitre III : Les techniques d'analyse

Conclusion

Les différentes méthodes d'analyses prévoient une évolution à long terme car elles sont utilisées dans plusieurs domaines, et elles permettent l'identification, le dosage, et contribuent à résoudre les problèmes de pureté et la détection des composés isolés.

Chapitre IV :
Matériels et méthodes

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre nous allons présenter les étapes suivies pour la caractérisation des extraits éthanoliques de la propolis de différentes régions de Bejaia (Adekar, Akfadou, Baccaro, El kseur, Kherrata, Kendira, et Melbou) par HPLC, qu'on a eu à partir d'une extraction par deux méthode (agitation et ultrason), et à la fin Nous allons étudier leurs activités biologiques y compris l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire.

IV.2. Identification et quantification des extraits éthanoliques de la propolis des différentes régions de Bejaia par HPLC

L'identification de quelques composés phénoliques (acide caféique, vanilline, acide p-coumarique, et cinnamique) est réalisée par HPLC, et la détermination de leurs quantités dans les différents extraits est effectuée en utilisant les courbes d'étalonnages, tous les échantillons et les standards sont filtré à travers les filtres seringues de 0.45 μm et sont analysés sous les conditions opératoires suivant :

- ✓ Phase mobile (A) : 0.5% acide acétique
- ✓ Phase mobile(B):1% d'acide acétique/Acetonitrile
- ✓ Diluant : méthanol
- ✓ Colonne: C18cm
- ✓ La longueur d'onde : 290nm
- ✓ Le volume d'injection : 25 μl
- ✓ Débit:1ml/min.

IV.2.1. Matériels utilisés

- Fioles de 25 ml
- Pipettes de 5 ml et 1 ml
- La poire
- Spatule
- Béchers
- Barreaux magnétiques
- Tubes à essais.

IV.2.2. Appareillage

- Balance analytique (Denver).
- Chromatographie en phase liquide haute performance HPLC (Dionexultimate3000)
- Plaque agitatrice multipostes (VELP Scientifica).

IV.2.3. Produits utilisés

- Méthanol (grade HPLC Biochem Chemopharma)
- Acetonitrile Biochem Chemopharma
- Acide acétique (VWR chemicals)
- Extraits éthanoliques de propolis
- Standards : acide caféique, cinnamique, p-coumarique, et vanilline (Sigma-Aldrich).

IV.2.4. Méthode

Quatre courbes d'étalonnages de cinq (05) différentes concentrations sont préparées (0.01 à 0.08mg/ml), ensuite ils sont filtrés, puis remplir les vials et analysés [56].

IV.3. L'étude des activités biologiques des extraits éthanoliques de propolis des différentes régions

IV.3.1. L'activité antibactérienne

Les souches utilisées pour le test de l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques de la propolis sont : *Candida albicans*, *Escherichia coli* (ATCC8739), *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (ATCC6538).

IV.3.1.1. Matériels utilisés

- ✓ Les boîtes à pétries.
- ✓ Les écouvillons.
- ✓ Une micropipette
- ✓ Les embouts
- ✓ Les tubes à essais
- ✓ Les microplaques.

IV.3.1.2. Appareillages

- ✓ Bain marie (Memmert)
- ✓ Etuve (Binder)
- ✓ Becs benzène

IV.3.1.3. Produits utilisés

- ✓ Ethanol (Biochem Chemopharma)
- ✓ La gélose Muller Hinton
- ✓ Les extraits éthanoliques de la propolis.
- ✓ DMSO (Sigma-Aldrich)
- ✓ Les souches bactériennes

IV.3.1.4. Méthode

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits éthanolique de la propolis des différentes régions de Bejaia, on a utilisé la méthode de diffusion sur disque, le principe de cette technique est d'utiliser des disques stériles de papier Whatman, ensuite les boites à pétries sont remplis avec de la gélose puis laisser sécher, la prochaine étape était d'effectuer l'ensemencement qui consiste à faire un dépôt initial de la bactérie en faisant des étalements successifs dans plusieurs sens, une fois ce dernier est fait, on dépose sur chaque boîte à pétrie trois disques du papier, chaque disque est imprégné de 10 microlitres d'extrait, et à la fin les boites sont incubées à 37° pendant 24h, le diamètre d'inhibition est lu en mm [57].



Figure IV.1. Technique d'ensemencement



Figure IV.2. Remplissage des boîtes avec la gélose

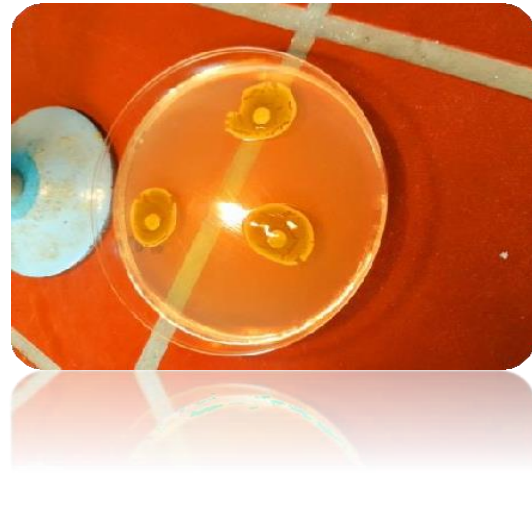


figure IV.3. Dépôt des disques

IV.3.2. Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée afin de déterminer la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible à l'œil.

IV.3.2.1. Protocole

Cette expérience est réalisée par la méthode de dilution et à l'aide des microplaques, pour premier témoin on a fait un prélèvement de 200 μl de DMSO et pour le deuxième on mélange 150 μl de la souche bactérienne plus 50 μl de DMSO.

Dans les autres puits on a mis 50 μl d'extrait éthanolique de la propolis puis on lui a rajouté 150 μL de la souche bactérienne, pour les prochains prélèvements on a fait une dilution de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16..., ensuite les microplaques de cette expérience sont incubés dans l'étuve à une température de 37°C pendant 24H et la CMI est calculé [56].

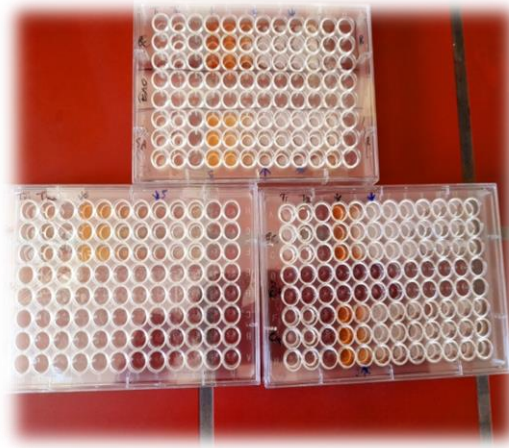


Figure IV.4. Les microplaques utilisées pour la détermination de la CMI

IV.3.3. Détermination de l'effet bactéricide et bactériostatique de la propolis en utilisant le test de la CMI

Ce test est réalisé en prélevant 10 μ l de chaque CMI à partir des microplaques, ensuite on les dépose sur les boîtes à pétries gélosées, et la lecture est faite après 24h d'incubation sous une température de 37 C°.

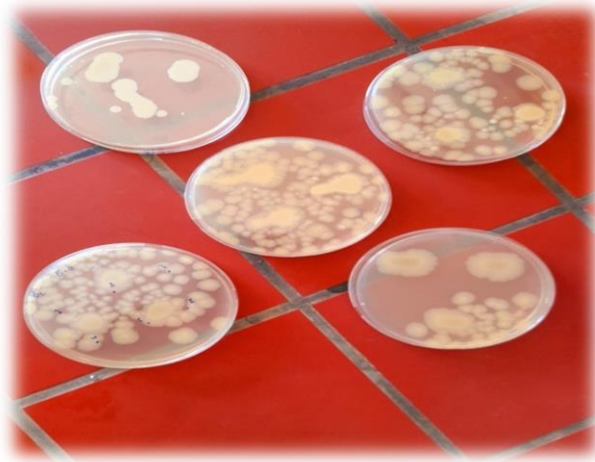


Figure IV.5. L'activité bactéricide et bactériostatique réalisé à partir de la CMI

IV.3.2. L'activité anti-inflammatoire in vitro

L'activité anti-inflammatoire in vitro a été évaluée en utilisant la méthode de dénaturation de la protéine albumine de sérum bovin BSA sur les extraits éthanolique de propolis de différentes régions.

IV.3.2.1. Matériel utilisé

- ✓ Spatule
- ✓ Tubes a essaies
- ✓ Béchers
- ✓ Pipettes de 1ml, la poire.
- ✓ Barreaux électromagnétique
- ✓ Eprouvette.

IV.3.2.2. Produits chimiques

- ✓ BSA
- ✓ NaCl (Biochem Chemopharma)
- ✓ Phosphate dipotassique(Biochem Chemopharma)
- ✓ Phosphate monopotassique(Biochem Chemopharma)
- ✓ Ethanol(Biochem Chemopharma)
- ✓ Hydroxyde de sodium NaOH(Biochem Chemopharma)
- ✓ HCl (Biochem Chemopharma)
- ✓ Ibuprofène

IV.3.2.3. Appareillages

- ✓ Balance analytique (Denver)
- ✓ Bain marie (Memmert)
- ✓ Etuve (Binder)

IV.3.2.4.Méthode

Pour étudier l'activité anti inflammatoire in vitro des extraits éthanolique de propolis on a commencé par préparer le Tris de PH=6.8, puis la BSA, et au final nous allons préparer nos échantillons.

➤ Préparation d'un Tris (PH 6.8)

Pour préparer 100 ml d'une solution Tris, on a pesé 0.11g de phosphate monopotassique avec 0.2g de phosphate dipotassique, 0.94g de NaCl, et on le laisse sous agitation.

➤ Préparation d'une solution de BSA (bovine sérum albumine)

On prend 0.025g de BSA et on lui ajoute 12.5 ml de Tris de PH 6.8 et on le met sous agitation a l'abri de la lumière.

➤ Préparation des échantillons

Blanc = (1ml d'extrait éthanolique de propolis) + (1ml Tris)

Contrôle positive = (1 ml d'ibuprofène) + (1ml BSA)

Contrôle négative = (1 ml d'H₂O) + (1ml de BSA)

Echantillons = (1 ml d'extrait éthanolique de propolis) + (1ml BSA à 0.2%)

Après la préparation de ces échantillons dans des tubes à essais on les mets dans l'étuve à une température de 37°C pendant 15min, puis dans un bain marie à une température de 72°C pendant 5min, et après refroidissement, on mesure leurs absorbance à 660 à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible [57].



Figure IV.6. Les échantillons dans l'étuve à 37 C°



Figure IV.7. Les échantillons dans un bain-marie

Chapitre V :
Discussion des résultats

V.I. Identification et quantification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de la propolis des différentes régions de Bejaia par HPLC

V.I.1. Résultats

L'analyse chromatographique de quelques composés phénoliques et flavonoïdes (acide p-coumarique, l'acide caféique, la vanilline, et l'acide cinnamique) montre des pics à des temps de rétentions différentes, 7.94, 10.51, 11.40, et 15.09 respectivement (voir les figures V.1, V.2, V.3, et V.4)

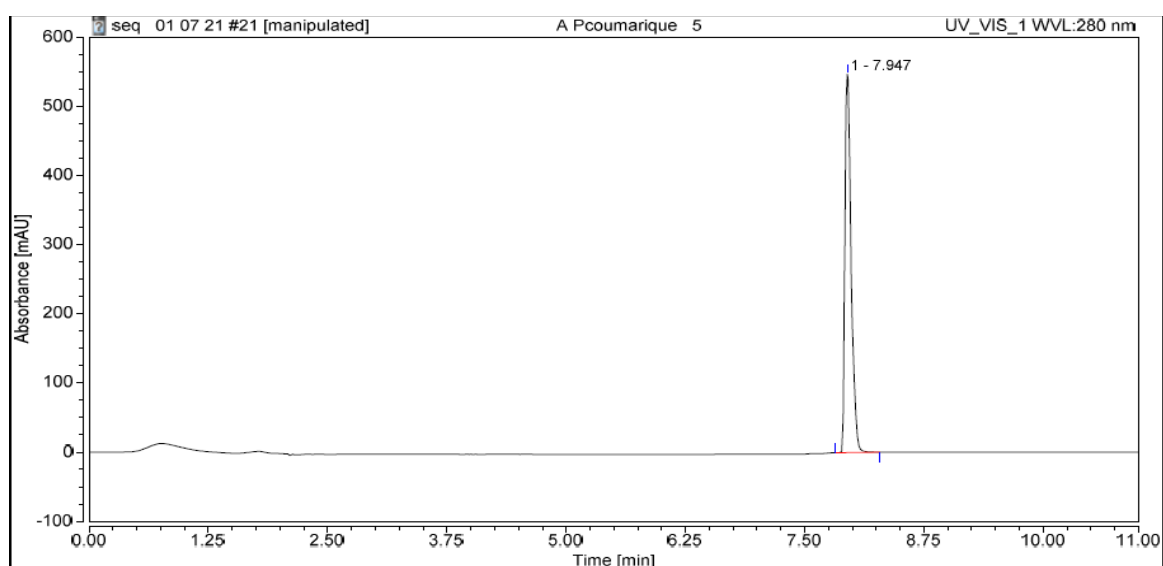


Figure V.1. Chromatogramme de l'acide p-coumarique

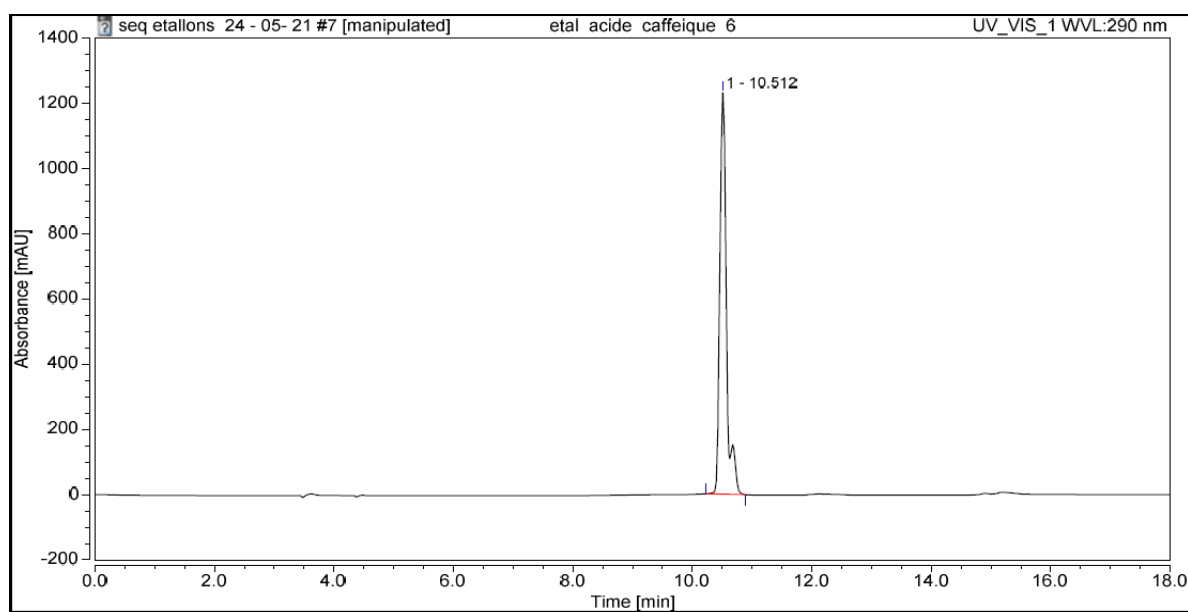


Figure V.2. Chromatogramme de l'acide caféique

Chapitre V : Discussion des résultats

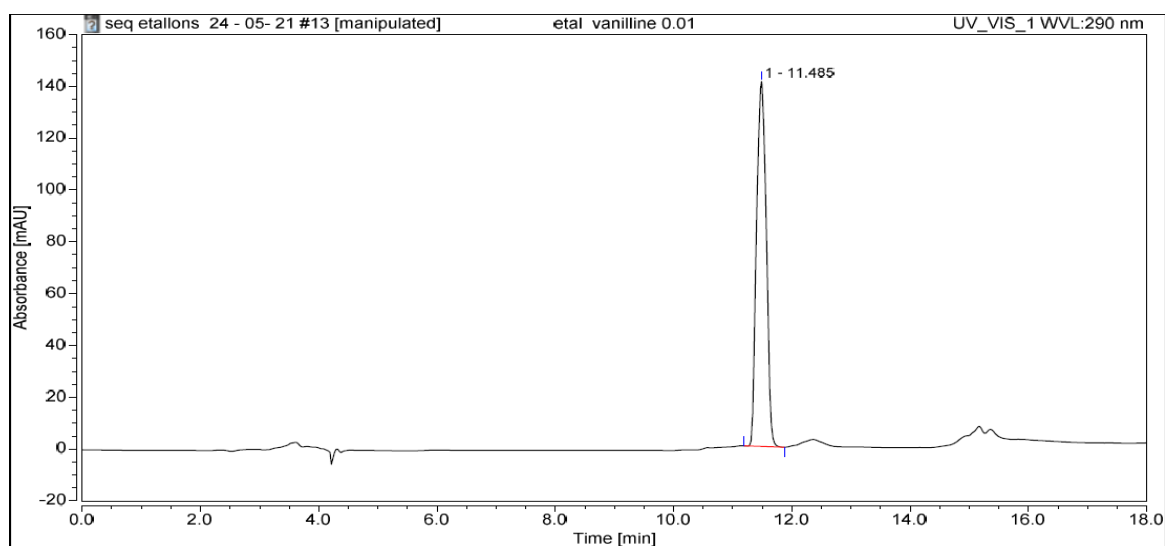


Figure V.3. Chromatogramme de la vanilline

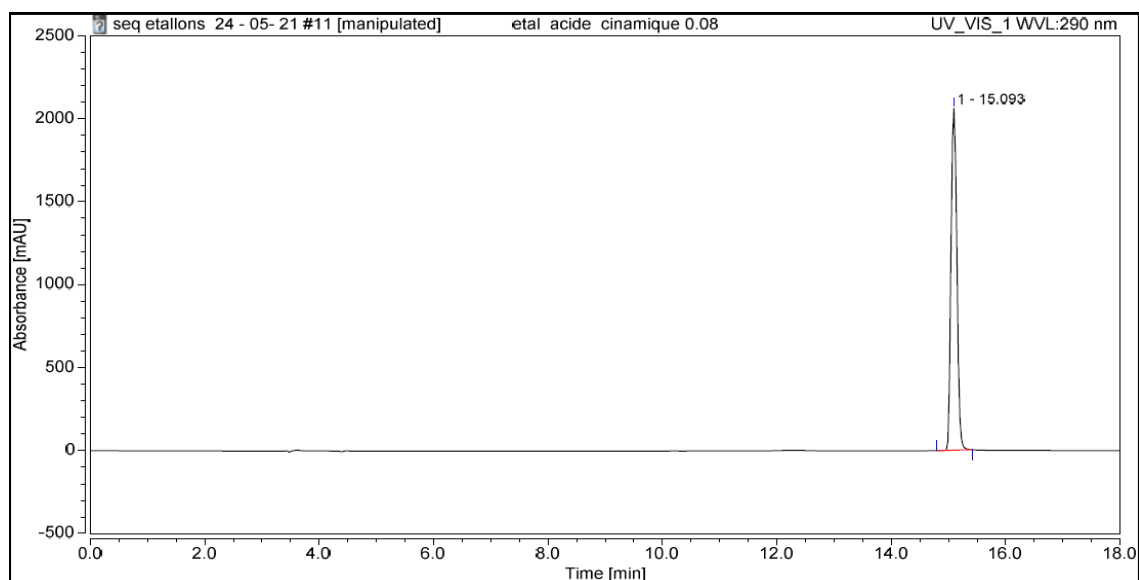


Figure V.4. Chromatogramme de l'acide cinnamique.

❖ Courbes d'étalonnages

Les courbes d'étalonnages de chaque standards identifiés sont réalisés à différentes concentrations (de 0.01 à 0.08 mg/ml), qui sont présentés dans les figures (V.5, V.6, V.7, et V.8).

Chapitre V : Discussion des résultats

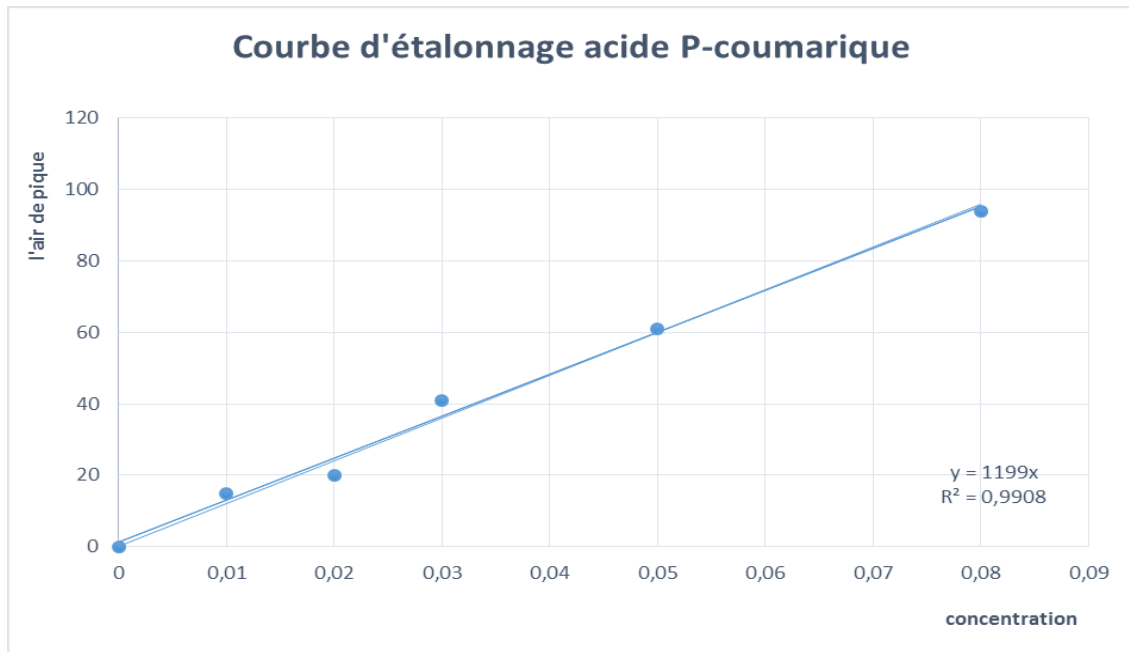


Figure V.5. La Coubre d'étalonnage de l'acide p-coumarique

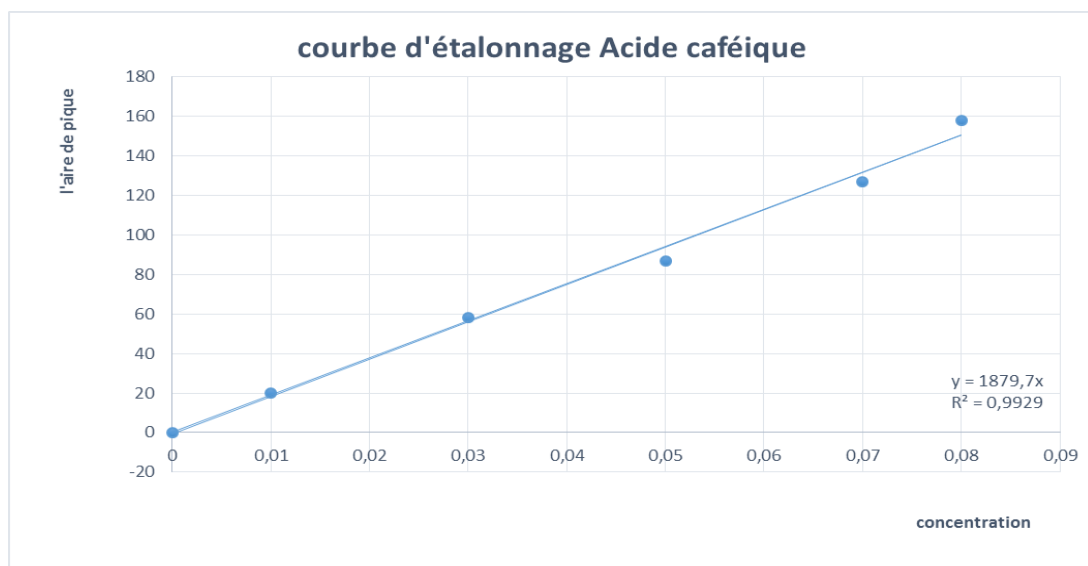


Figure V.6. La courbe d'étalonnage de l'acide caféique

Chapitre V : Discussion des résultats

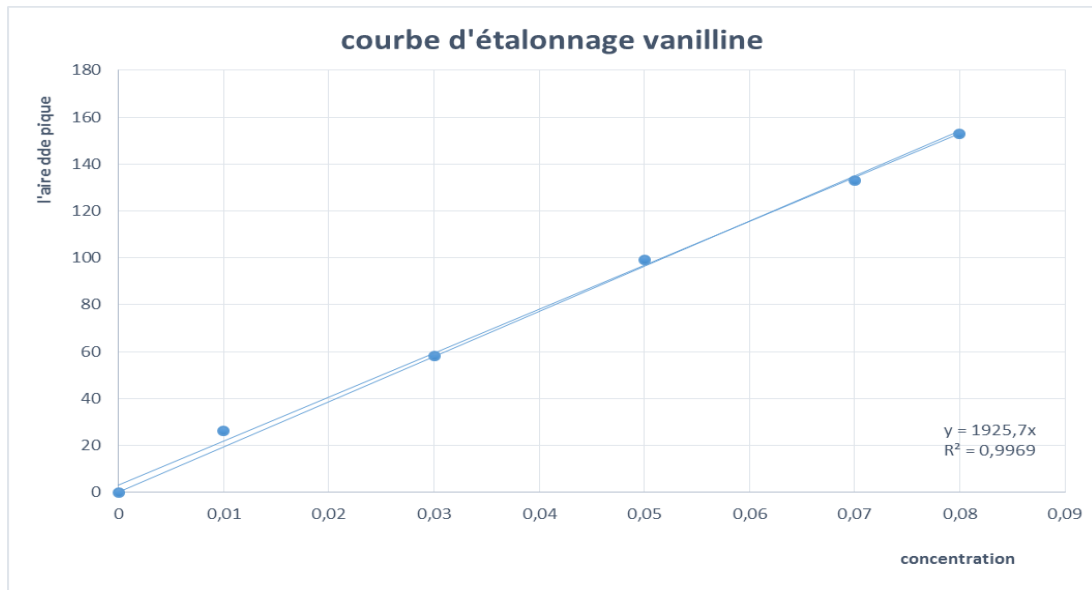


Figure V.7. La courbe d'étalonnage de la vanilline

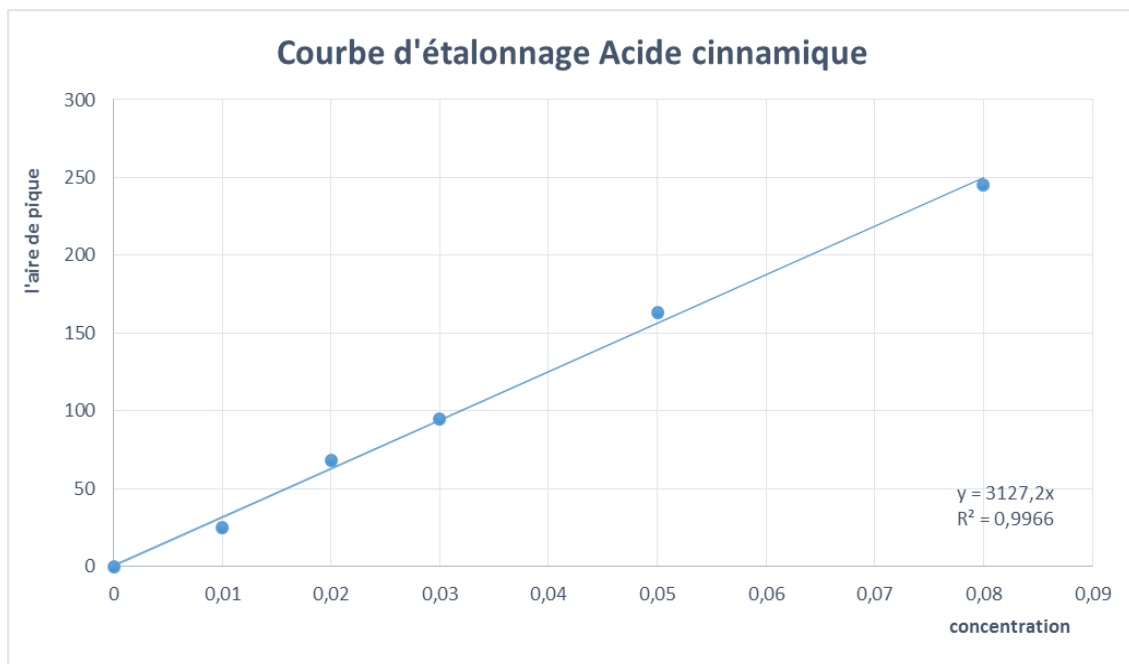


Figure V.8. La courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique

V.I.2. Observation

On remarque que ce sont toutes des courbes qui passent par l'origine et d'une équation de la forme $y = ax$.

Chapitre V : Discussion des résultats

L'analyse HPLC nous a permis d'identifier les quatre composés phénoliques dans les différentes régions de Bejaia, mis à part l'absence du pique de l'acide p-coumarique sur le chromatogramme de la propolis de la région de kendira (ultrason).

Les chromatogrammes sont présentés dans les figures (V.9, V.10, V.11, V.12, V.13, V.14, V.15, V.16, V.17, V.18, V.19, et V.20).

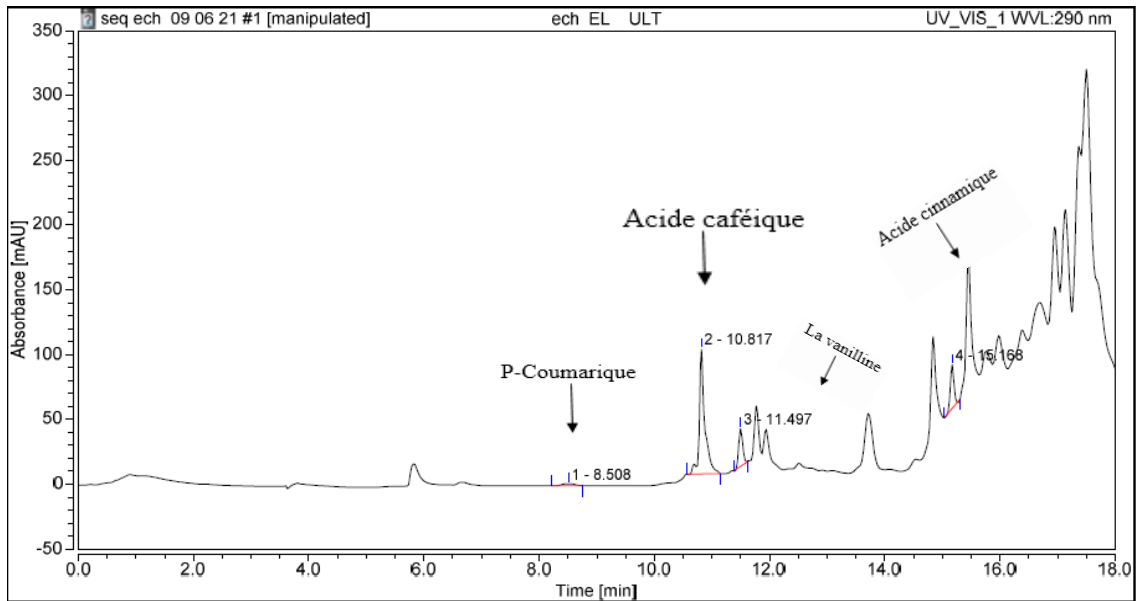


Figure V.9. Chromatogramme de la région d'El kseur par ultrason

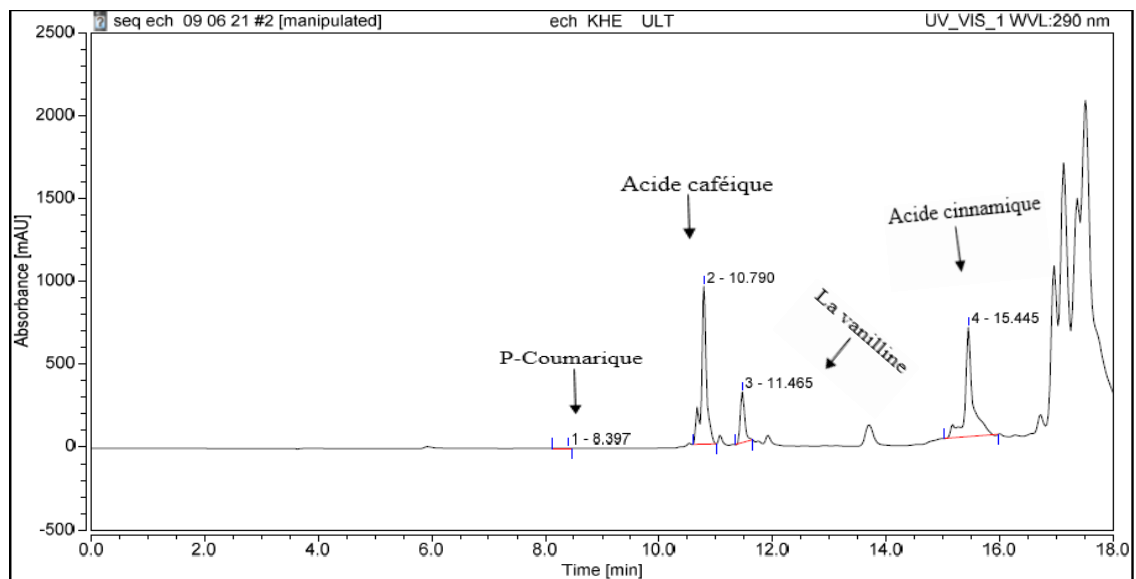


Figure V.10. Chromatogramme de la région de Kherrata par ultrason

Chapitre V : Discussion des résultats

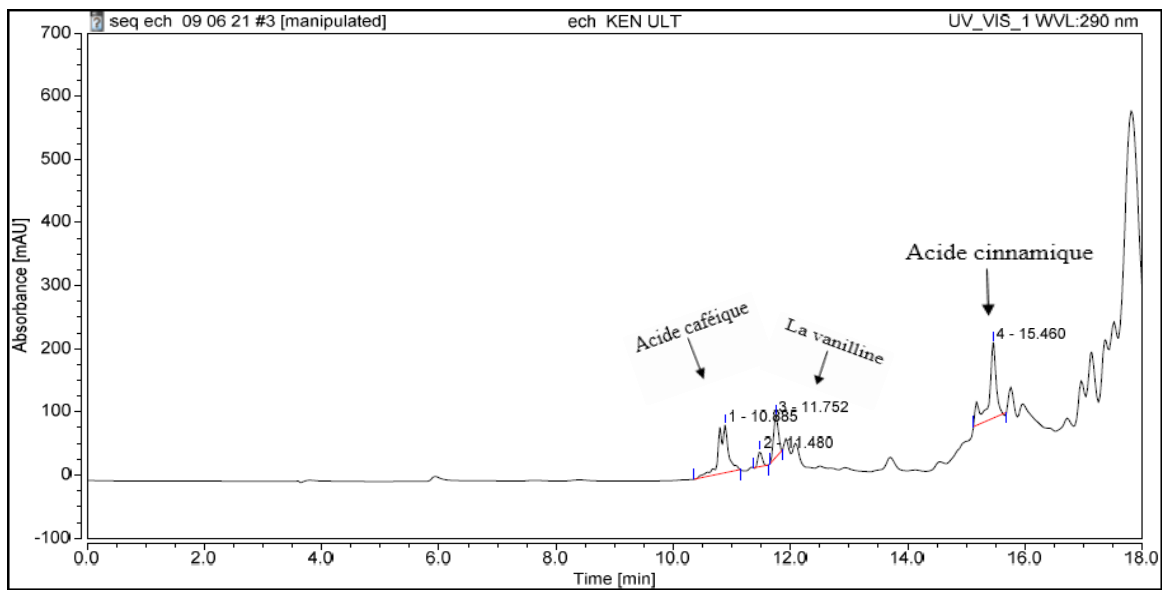


Figure V.11. Chromatogramme de la région de Kendira par ultrason

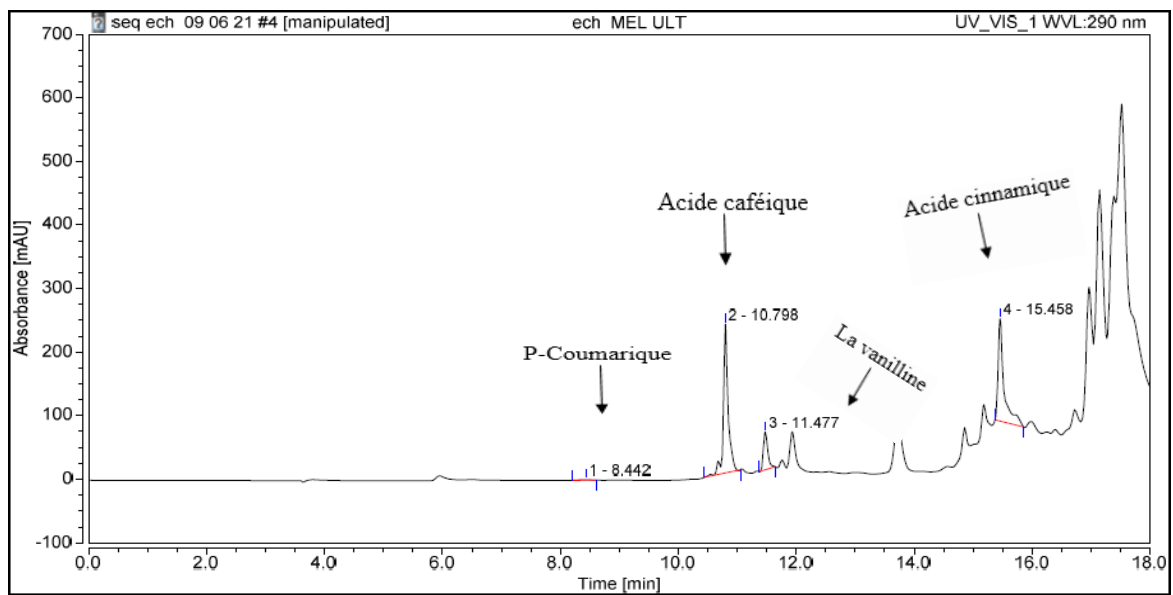


Figure V.12. Chromatogramme de la région de Melbou par ultrason

Chapitre V : Discussion des résultats

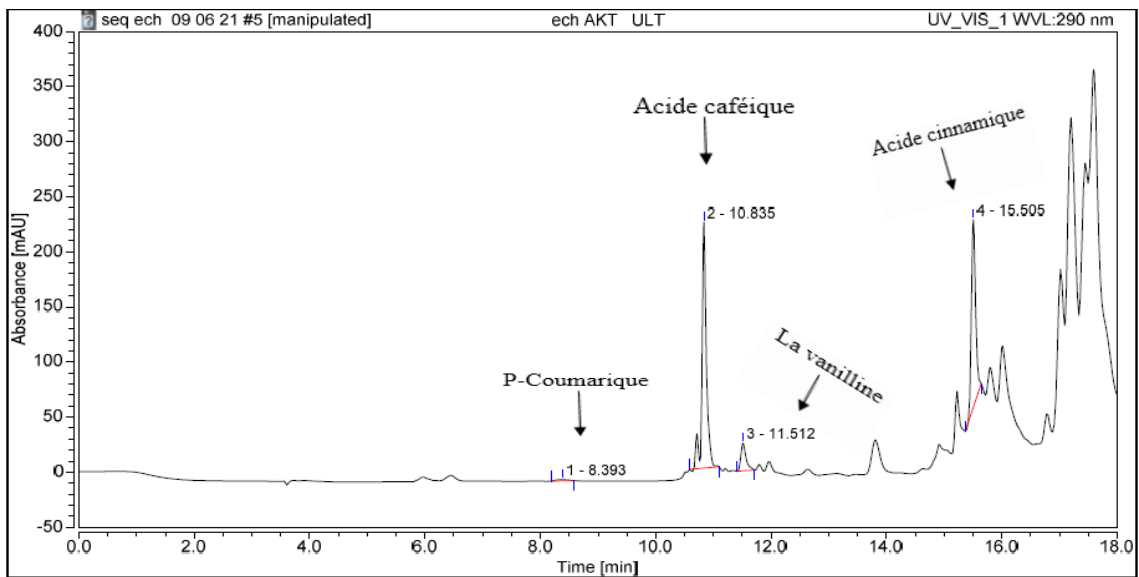


Figure V.13. Chromatogramme de la région d'Akfadou par ultrason

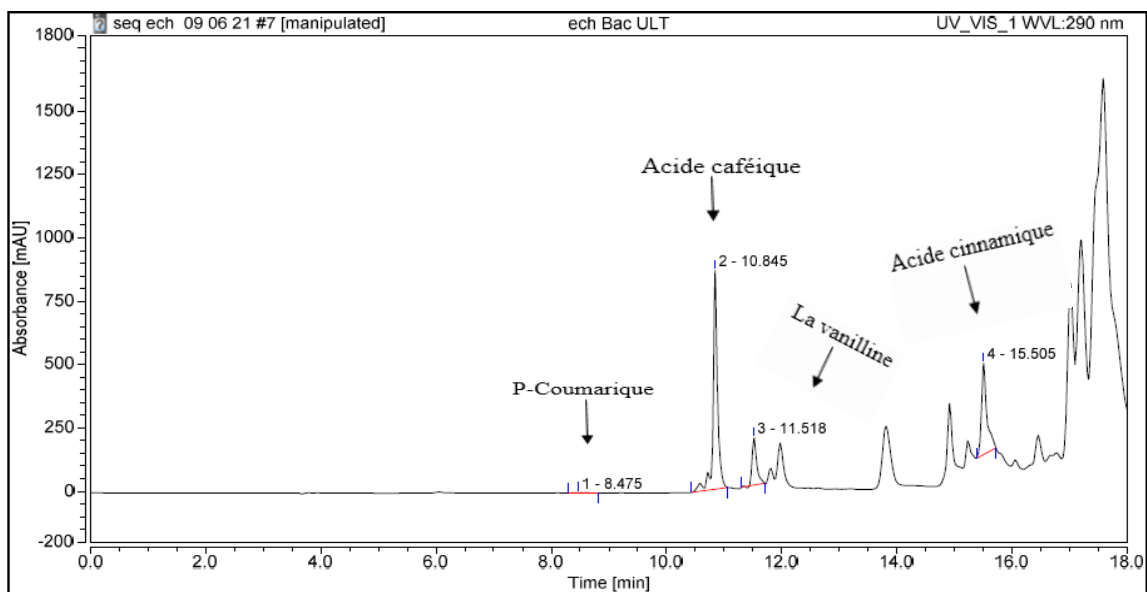


Figure V.14. Chromatogramme de la région de Baccaro par ultrason

Chapitre V : Discussion des résultats

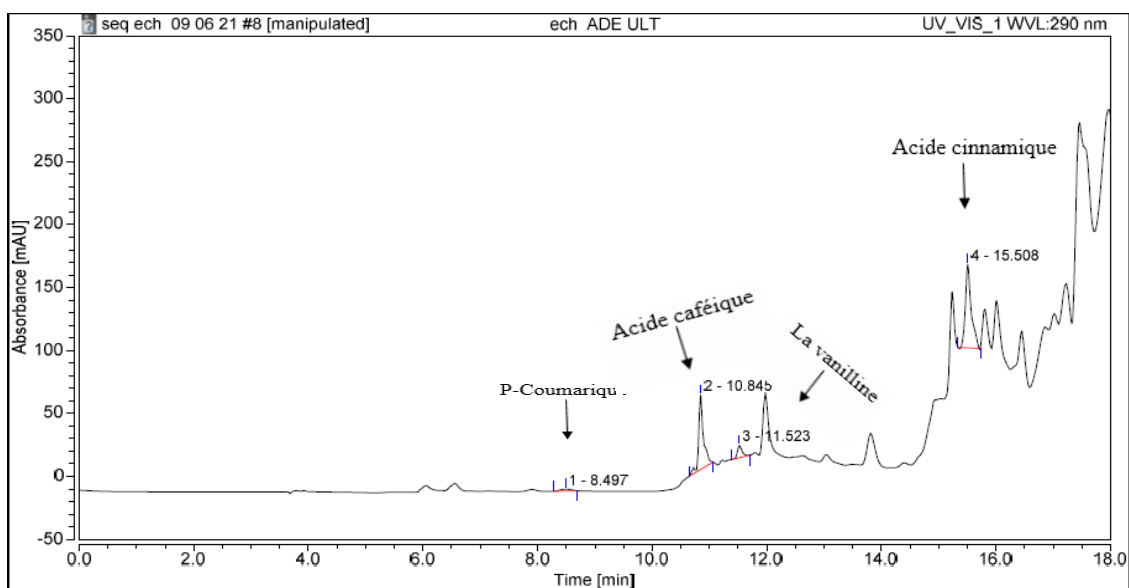


Figure V.15. Chromatogramme de la région d'Adekar par ultrason

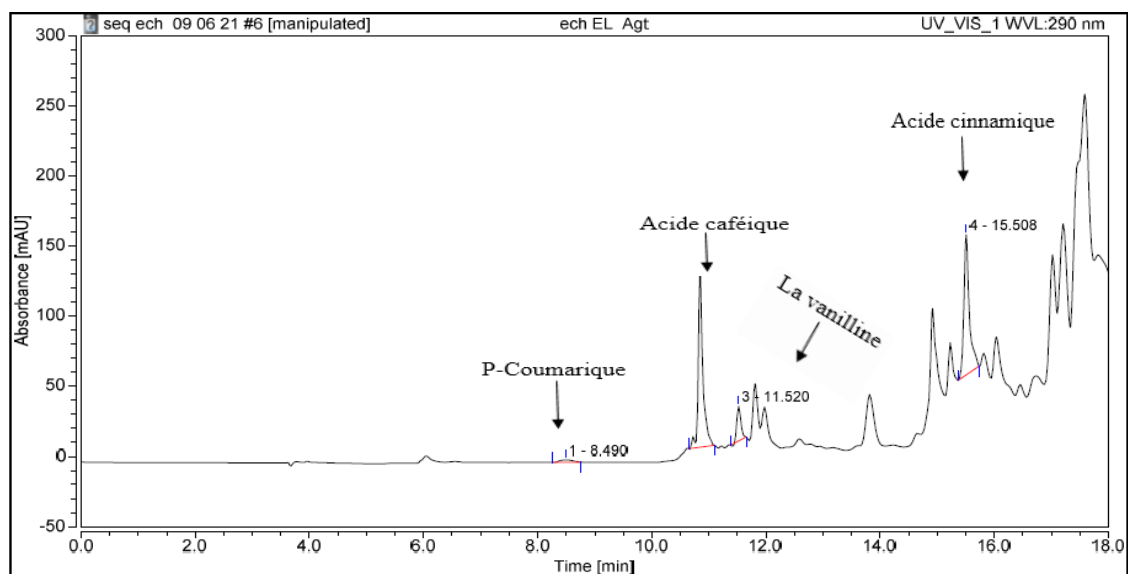


Figure V.16. Chromatogramme de la région d'El kseur par agitation

Chapitre V : Discussion des résultats

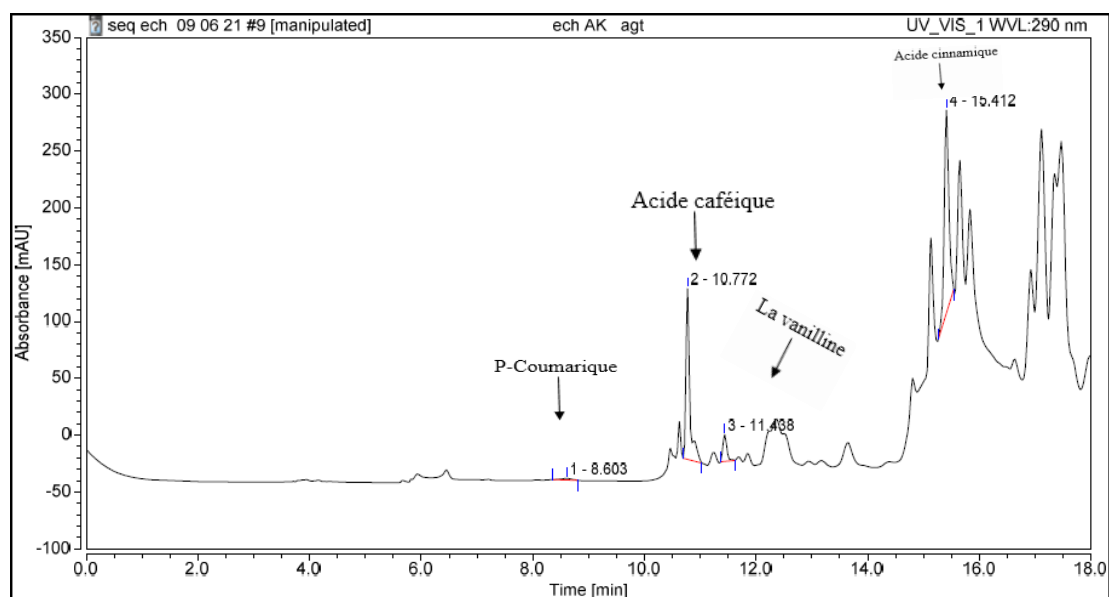


Figure V.17. Chromatogramme de la région d'Akfadou par agitation

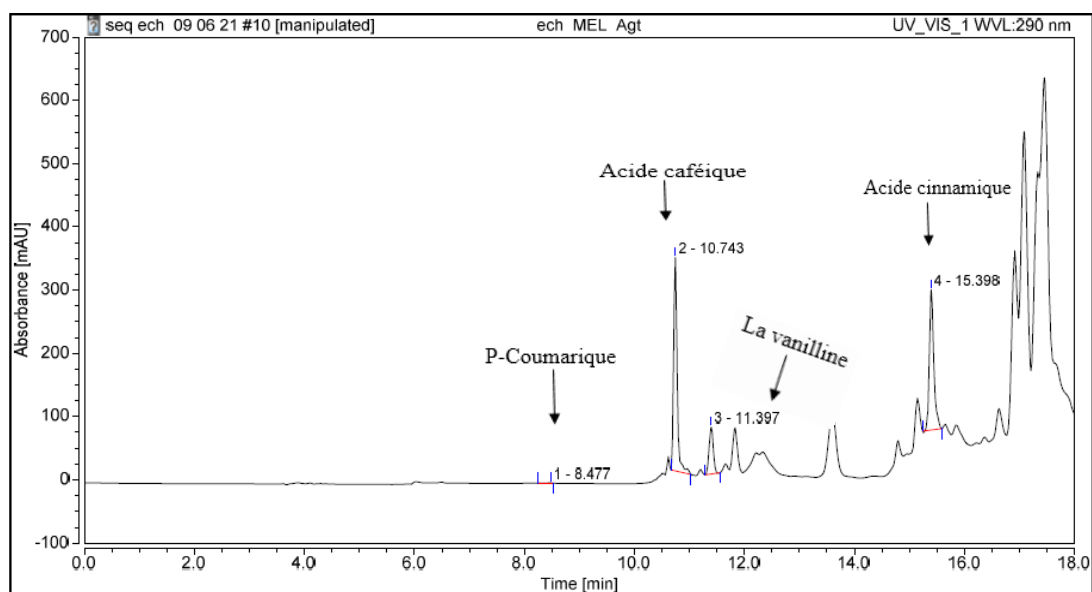


Figure V.18. Chromatogramme de la région de Melbou par agitation

Chapitre V : Discussion des résultats

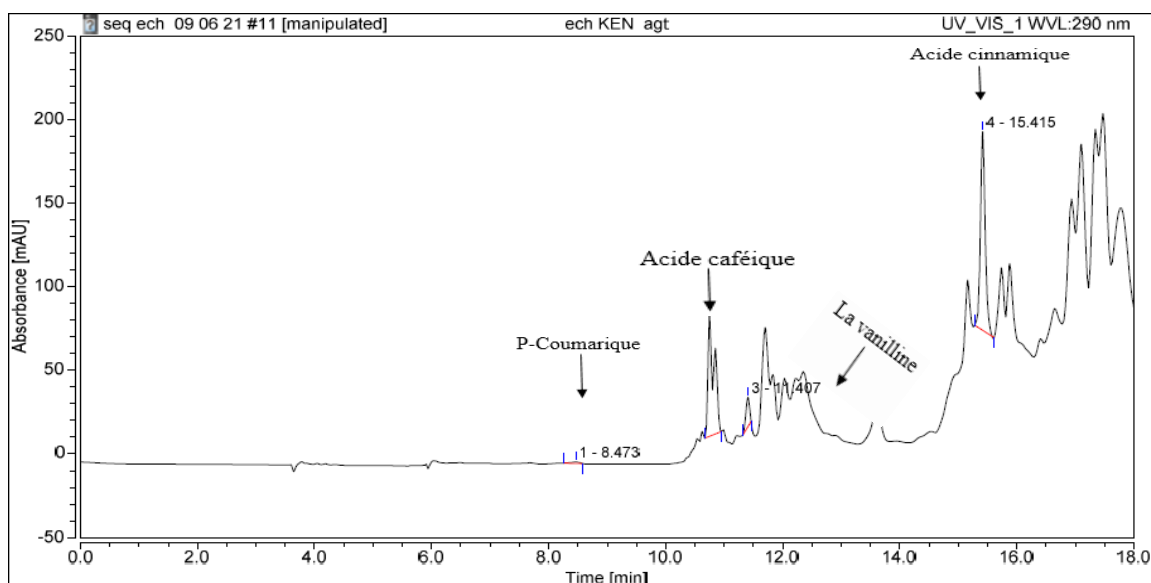


Figure V.19. Chromatogramme de la région de Kendira par agitation

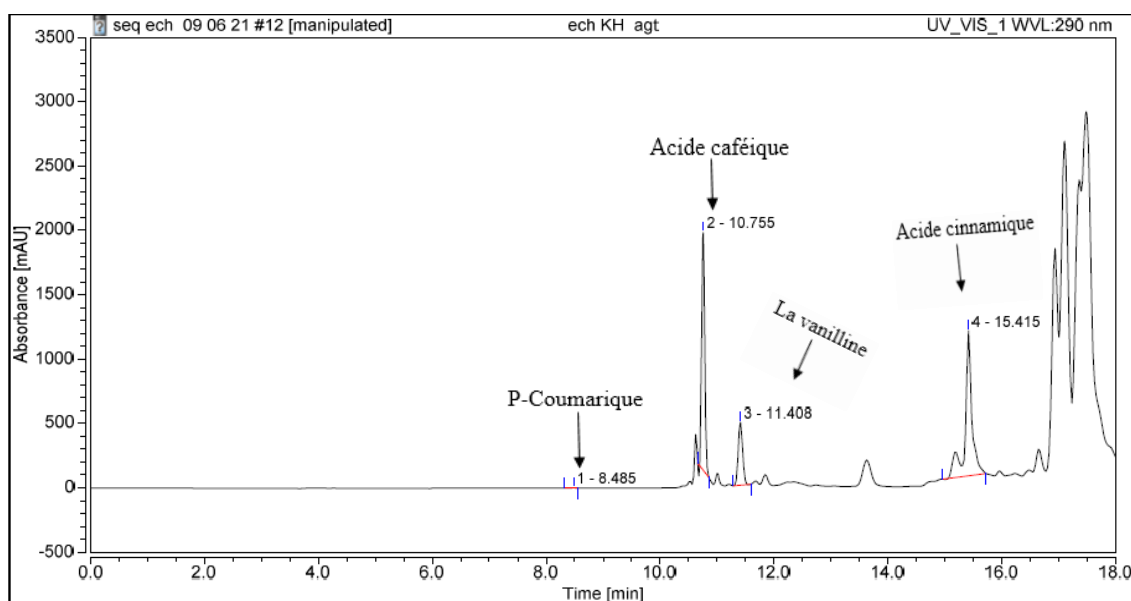


Figure V.20. Chromatogramme de la région de Kherrata par agitation

A partir des courbes d'étalonnage de chaque composés on a pu calculer leurs concentrations dans la propolis de chaque région, les résultats de la quantification des quatre flavonoïdes sont montrés dans le **tableau V.1** (en mg/g).

Chapitre V : Discussion des résultats

Tableau V.1. La quantité des composés phénoliques de la propolis de différentes régions

Les composants Les régions	Acide p- Coumarique (mg/g)	Acide caféique (mg/g)	La vanilline (mg/g)	Acide cinnamique (mg/g)
ELKSEUR (ULT)	0.162	2.785	0.585	0.3895
KHERRATA (ULT)	0.0208	25.95	6.5	16
KENDIRA (ULT)	Non détecté	1.596	0.4902	2.79
MELBOU(ULT)	0.072	5.5	1.294	2.995
AKFADOU (ULT)	0.12	5	0.665	2.27
BACCARO (ULT)	0.091	20	4.49	6
ADEKAR (ULT)	0.141	1.485	0.234	1.22
ELKSEUR (Agt)	0.189	3.075	0.050	1.72
AKFADOU (Agt)	0.135	3.17	0.517	2.715
MELBOU (Agt)	0.0129	6.6	1.685	3.275
KENDIRA (Agt)	0.055	2.323	0.3183	1.814
KHERRATA (Agt)	0.0362	31	11.35	24.5

V.I.3. Interprétation

Le tableau nous montre les quantités en mg/g des composés phénoliques de la propolis de différentes régions de Bejaia, on remarque que chaque propolis contient une quantité de composés différente de l'autre, la plus grande contenance en polyphénols est obtenue avec l'acide caféique dans la région de Kherrata (agt) avec 31 mg/g.

D'après ces résultats les propolis étudiés possèdent pas les mêmes quantités des composés ni les mêmes composés par exemple celle de kendira ultrason ne contient pas l'acide p-coumarique contrairement aux autres propolis. Cette variété en composés phénoliques dépend de son origine géographique et de la saison de la récolte.

Chapitre V : Discussion des résultats

V.II. Les activités biologiques des extraits éthanoliques de propolis de différentes régions de Bejaia

V.II.1. l'activité antibactérienne

V.II.1.1. Résultats

Les résultats de l'activité antibactérienne son illustrés dans le **tableau V.2**, et les figures ci-dessous (**V.21, V.22, V.23, V.24, et V.25**), et ils ont montrés une différence significative des diamètres des zones d'inhibitions des extraits éthanoliques de la propolis de différentes régions de Bejaia entre les souches bactériennes testées.

Tableau V.2. Résultats des diamètres des zones d'inhibitions selon les différentes régions de béjaia.

souches régions	E. Coli (mm)	Bacillus. C (mm)	Candidat.A (mm)	Staphylococcus.A (mm)
E1	8.91	11.25	12.83	12.25
E2	10.25	10.41	13.33	18.66
E3	10.33	9.71	14.08	16
E4	9.66	12.41	15.5	19.16
E5	11.33	13.91	23.6	27
E6	9.91	15.33	36.16	26.75
E7	12.08	15.58	15.5	22.16
E8	9.16	11.83	13.58	14.91
E9	15.75	9.75	22.16	23.16
E10	16.58	15.41	37.91	31.225
E11	20.41	26.41	33	33.33
E12	21.58	28.5	33.33	35.5
T	8.33	11.66	10.66	7.5

Avec : E1:Adekar (ULT), **E2 :** Akfadou (ULT), **E3 :** Akfadou (agt),**E4 :** EL (ULT), **E5 :** EL (agt), **E6 :** kherrata (ULT), **E7:**Kherrata (agt), **E8 :** kendira (ULT), **E9 :** Kendira (agt),**E10 :** Baccaro (ULT), **E11 :** Melbou (ULT), **E12 :** Melbou (agt).

Chapitre V : Discussion des résultats

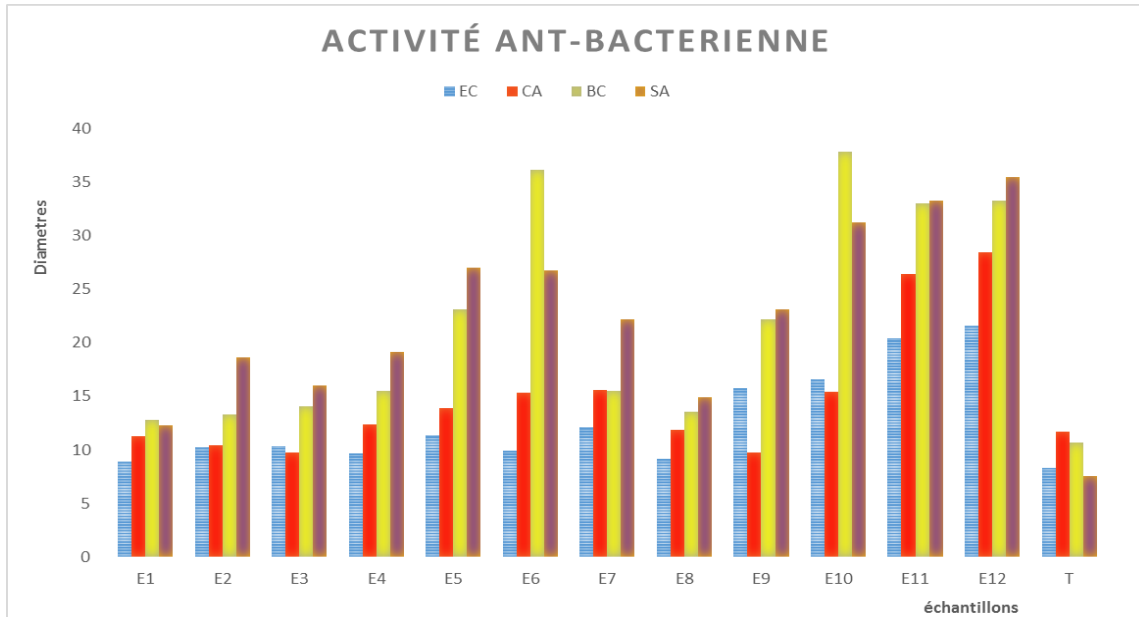


Figure V.21. Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes

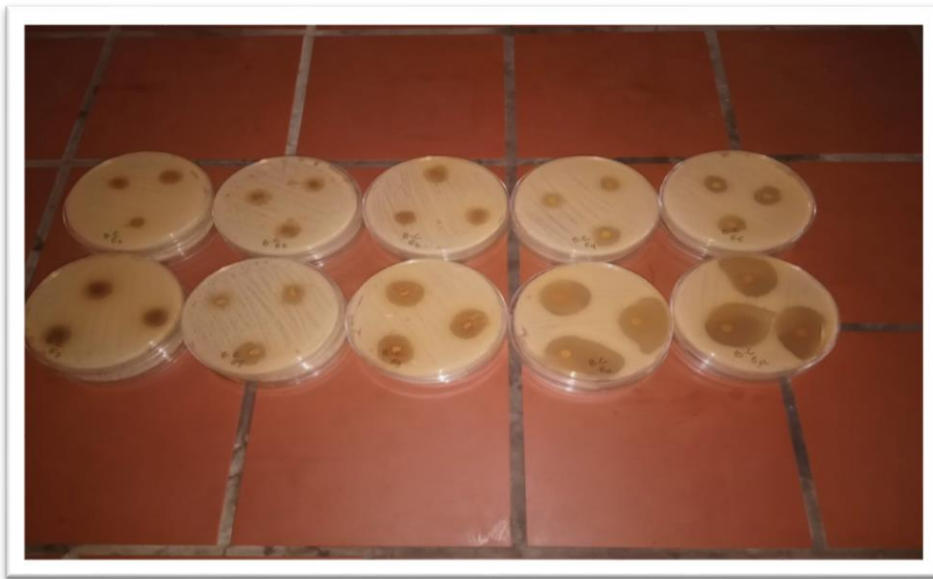


Figure V.22. Les diamètres des zones d'inhibition de *Bacillus cereus*

Chapitre V : Discussion des résultats



Figure V.23. Les diamètres des zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus*



Figure V.24. Les diamètres d'inhibitions de *Candida albicans*



Figure V.25. Les diamètres d'inhibitions d'Escherichia Coli

V.II.1.2. Observation

D'après l'histogramme, la propolis de toutes les régions a un effet remarquable sur toutes les souches bactériennes testées.

Les résultats obtenus dans le tableau V.2, ont montrés que les extraits éthanoliques de la propolis de différentes régions de Bejaia ont un effet antibactérien très considérable sur les souches bactérienne de gram positive (*S.aureus*, *C.albican* et *B.cereus*), par contre pour les bactéries de gram négative ont plutôt un effet moins faible.

- Pour *Bacillus cereus* le diamètre de la zone d'inhibition est oscillé entre 9.75 (mm) enregistré pour la région de kendira (agt) et 28.5 (mm) pour la propolis de Melbou (agt).
- Pour la souche *E. Coli* le diamètre de la zone d'inhibition commence par 8.91 (mm) enregistré pour la région d'Adekkar (ult) et la meilleure propolis enregistré c'est Melbou (agt) avec un diamètre de la zone d'inhibition de 21.58 (mm).
- Pour *Staphylococcus aureus* le diamètre de la zone d'inhibition est oscillé entre 12.25 (mm) comme minimum enregistré pour la région d'Adekar (ult) et 35.5 (mm) pour la région de Melbou (agt).
- La souche *Candidaalbicans* le meilleur diamètre été enregistré pour la région de Baccaro (ULT) avec $d = 37.91$ (mm).
- Diamètre de la zone d'inhibition < 5 mm : absence de l'activité antibactérienne.
- Diamètre de la zone d'inhibition égale à 5mm : une activité très faible.

Chapitre V : Discussion des résultats

- Diamètre de zone d'inhibition varie entre 5mm et 10mm : activité antibactérienne faible mais pas négligeable.
- Diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10mm et 15mm : une activité antibactérienne modérée.
- Diamètre de la zone d'inhibition varie de 15mm à 20mm : activité antibactérienne forte.
- Diamètre de la zone d'inhibition >20mm : activité antibactérienne très forte.

V.II.1.3. Interprétation

Selon les résultats obtenus l'activité antibactérienne des extraits de propolis dépend de la région ou plutôt l'origine géographique, de la présence des composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénoliques), et de la capacité d'inhiber la croissance de bactéries, donc les origines jouent un rôle primordial dans l'influence de cette activité biologique [59].

L'explication que l'extrait de baccaro (ult) et Melbou (agit) ont un effet très remarquable est due aussi à leurs contenances en acide caféique 20 et 6.6 mg/g respectivement d'après nos résultats d'HPLC.

Par comparaison à des travaux similaires **Djillali Liabs** qui a effectué un travail concernant l'effet de la propolis sur les bactéries, et on a trouvé les mêmes résultats sur gram positive.

Ainsi que d'après la thèse de **potier florence** sur la propolis et les intérêts thérapeutiques, les résultats qu'on a trouvés sur l'effet de la propolis sur les souches bactériennes sont similaires.

V.II.2. Concentration minimale inhibitrice CMI

V.II.2.1. Résultats

- La CMI est calculé par la loi de dilution qui est représentée dans le **tableau V.3**, et dans la **figure V.26**.

Tableau V.3 Résultats de la CMI

CMI (Sa) _{E12}	CMI (Bc) _{E12}	CMI (Ca) _{E12}	CMI (Ec) _{E12}	CMI (Bc) _{E10}
C4	C5	C2	C3	C6
1.5625 mg/ml	0.390625 mg/ml	25 mg/ml	6.25 mg/ml	0.0976 mg/ml

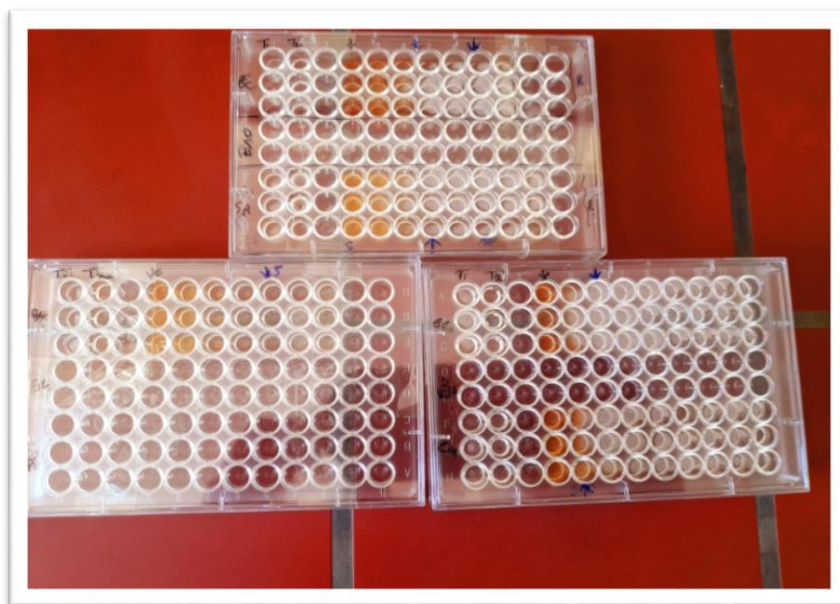


Figure V.26. Image qui représente le test de la CMI

V.II.2.2. Observation

D'après l'expérience on remarque que E12 (Melbou agt) et E10 (Baccaro ult) ont une concentration minimale inhibitrice sur les quatre souches bactériennes.

V.II.2.3. Interprétation

D'après le test de la CMI effectué sur les deux régions Melbou et Baccaro comme elles procèdent la meilleure activité antibactérienne sur les quatre souches étudiées, on a conclu que les deux extrais éthanoliques ont une concentration minimale inhibitrice très remarquable pour E12 sur *Bacillus cereus* avec $C = 0.39026\text{mg/ml}$, et E10 sur la même souche avec $C = 0.0976\text{mg/ml}$.

La propolis présente une action inhibitrice très forte contre les souches bactériennes de gram positive, ce résultat peut être expliqué par la structure des bactéries de gram positive ou plus exactement à leur paroi cellulaire qui est moins compliqués par rapport à celle de gram négatives, ce qui permet la diffusion facile et rapide de la propolis qui est responsable de cet effet remarquable sur les gram positives [60].

➤ Après avoir eu les résultats de la CMI pour les deux meilleure propolis on a intérêt à savoir le type d'effet et comment la propolis agit-elle sur les souches, c'est-à-dire si elle a un effet **bactéricide** ou **bactériostatique**, le résultat est montré sur la **figure V.27**.

Chapitre V : Discussion des résultats

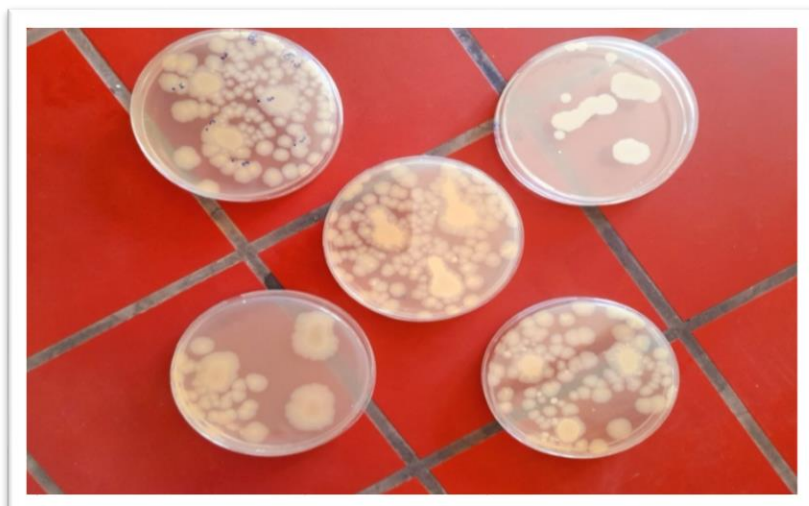


Figure V.27. Le résultat de l'effet bactéricide et bactériostatique

Les résultats obtenus de ce test nous montre que la propolis à la concentration minimale inhibitrice à un effet bactériostatique qui permet l'inhibition temporaire des bactéries, à vrai dire que les bactéries peuvent revivre, et ne sont pas complètement détruites.

Ce résultat peut être expliqué par la concentration minimale inhibitrice comme elle ne détruit pas les bactéries définitivement, donc les concentrations utilisés sont trop faible pour tuer les souches, ces résultats montrent aussi que la propolis à un effet bactéricide si on augmente un peu plus les concentrations (supérieur à la CMI) des extraits éthanoliques de la propolis.

V.II.3. L'Activité anti-inflammatoire in vitro

V.II.3.1. Résultats

L'activité anti-inflammatoire est calculée selon la formule suivante :

$$\% (AI) = [(Abs\ control - Abs\ \acute{e}chantillon) / Abs\ control] * 100$$

Les résultats sont présentés dans le **tableau V.4** et la **figure V.28**.

Chapitre V : Discussion des résultats

Tableau V.4. Tableau qui représente les résultats du test anti-inflammatoire

Echantillons	Absorbance	Pourcentage (%)
Contrôle négatif	0.027	
Contrôle positif	0.006	77.7
AKF ULT (E1)	0.003	88.8
Bacc ULT (E2)	0.010	62.96
MEL ULT (E3)	0.006	77.7
KEN ULT (E4)	0.005	81.48
ADE ULT (E5)	0.005	81.48
EI ULT (E6)	0.017	37.03
KHE ULT(E7)	0.003	88.8
MEL agt (E8)	0.001	96.29
KEN agt (E9)	0.020	25.92
AKF agt (E10)	0.024	11.11
EL agt (E11)	0.007	74.07

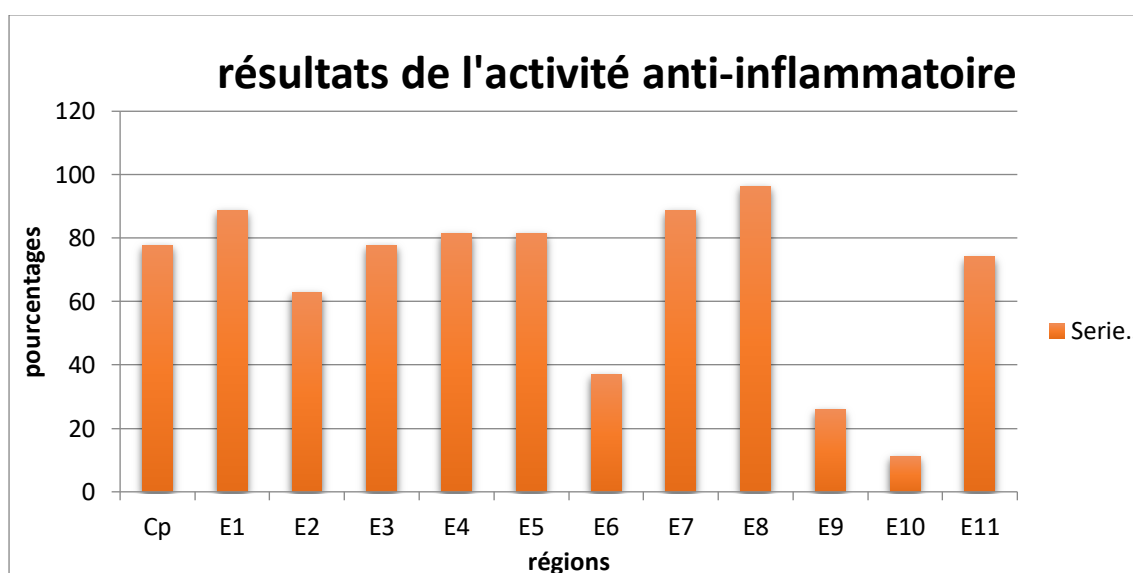


Figure V.28. L'histogramme des différentes régions en fonction du pourcentage d'inhibition

V.II.3.2. Observation

D'après les résultats obtenus on remarque que la propolis de différentes régions de Bejaia à un effet anti-inflammatoire et les pourcentages d'inhibitions dépendent de la provenance.

V.II.3.3. Interprétation

D'après l'histogramme l'évolution du pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA montre que les extrais éthanoliques de la propolis ont un effet anti-inflammatoire d'où la région qui représente le pourcentage le plus élevé est Melbou (agt) contrairement à Akfadou (agt) qui a le plus petit pourcentage.

Le contrôle positif de ce test était un médicament commercialisé connu sous le nom de **l'ibuprofène** qui a donné un effet remarquable évidemment avec un pourcentage de 77.7%, et en comparant à ce contrôle la propolis a un effet plus efficace que ce médicament, c'est-à-dire elle est plus puissante avec un pourcentage de 96.29% pour la région de Melbou (agt) qui vient en premier suivis par kherrata (ult) avec 88.8% et kendira (ult) avec 81.48%.

Ces résultats nous montrent une autre activité biologique de la propolis, l'effet anti-inflammatoire qui est due a sa richesse en composition phénolique cet effet est confirmé avec nos résultats HPLC par exemple Kherrata ult contient 25.5 mg/g d'acide caféique et 16 mg/g en acide cinnamique, qui est différente aussi d'une région à une autre, cette richesse en polyphénols plus précisément est due à sa contenance en acides phénoliques et en flavonoïdes qui lui permet d'être une substance très puissante avec diverse propriétés biologiques même comparant a un médicament commercialisé [61].

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail nous sommes arrivés à identifier quelques composés de la propolis de sept régions de Béjaïa par HPLC, et nous avons évalué leur activité antibactérienne et anti-inflammatoire.

La propolis est une substance naturelle très précieuse, importante et une alternative thérapeutique utile dans de nombreuses pathologies humaines mais également en association avec certains médicaments.

En effet, nous avons préparé les extraits éthanoliques de la propolis de différentes régions de Béjaïa (Adekar, Akfadou, Baccaro, El kseur, Kendira, Kherrata, et Melbou), par deux différentes méthodes (agitation et ultrason), ensuite ils sont analysés par HPLC pour identifier et quantifier quatre composés phénoliques, au final nous avons étudié l'effet de ces extraits sur quatre différentes souches bactériennes, et aussi nous avons étudié leurs effet anti-inflammatoire in vitro en utilisant la BSA.

D'après cette étude, nous sommes arrivés aux résultats suivant :

- L'analyse par HPLC nous a permis d'identifier et quantifier quelques composés phénoliques (acide cinnamique, acide P-coumarique, vanilline, l'acide caféique).
- selon la méthode de diffusion sur disque, nos résultats indiquent que la propolis de différentes régions de Bejaïa a un effet antibactérien sur toutes les souches utilisées.
- A la suite de ces résultats, un test d'activité anti-inflammatoire a été réalisé en utilisant la BSA, ce qui nous a permis d'assurer que la propolis de différentes régions de Bejaïa a un effet anti-inflammatoire et la meilleure selon ce teste c'était celle de la région de Melbou.

Les résultats obtenus nous ont permis de prouver l'effet antibactérien et anti-inflammatoire de la propolis provenant de la région de Bejaïa, cela est dû à sa richesse en composés phénoliques. L'utilisation de cette substance a de nombreux avantages dans le domaine médical, il sera donc intéressant d'approfondir sur les autres activités biologiques et d'envisager une valorisation industrielle des produits de la ruche plus exactement la propolis comme ressources naturelles dans le domaine de l'agro-alimentaire, pharmaceutique et en cosmétique.

Référence bibliographiques

Référence bibliographique

- [1] : YOUSFI Khadidja, ZITOUNI Fatma ;. « L'effet anti fongique des Api produit (miel – propolis) sur C.albican ». Mémoire de master, spécialité pharmacognosie et pharmacothérapie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. (2015-2016).
- [2] : BAGHDAD Hicham. Etude de la composition chimique et évaluation biologique de la propolis de plusieurs régions de Tlemcen. Mémoire de master. Université de Tlemcen. 2017.
- [3] : LARBI Sadia, HAMDY Lynda ;, « étude de synthèse sur les travaux réalisés sur la propolis en Algérie ». Thèse de doctorat. Université Saad Dahlab Blida -1-. (2017-2018).
- [4] : RICHOMM Pascal. « Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis ». Thèse de doctorat. Université Angers. (2014).
- [5] : STEFAN Stangaciu. Recherches sur la propolis. 1998.
- [6] : EL HOUSSEINI Nader. Intérêt et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. Thèse de doctorat. Université de Nantes ; unité de formation et de recherche d'odontologie. 2013.
- [7] : BOUCHAMA Radia, DJAOUANI Djouza ;. « Etude de l'activité antibactérienne des produits de la ruche (miel, propolis et gelée royale) ». Mémoire de master. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. (2014-2015).
- [8] : BENSALAH Nourhane, BELHADJ Anfal ;. « Etude comparative du contenu en polyphénols totaux et de l'activité antimicrobienne de trois extraits de propolis locale ». Mémoire de master. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. (2018).
- [9]: M. MARCUCCI. "Propolis: composition chimique, propriétés biologique et activité thérapeutique," *Apidologie*, 1995; 26(2), 83–99.
- [10]: L. Al Msrghitaş, D. S. Dezmirean, and O. Bobiş. "Le développement important de Romerecherché propolis "base évidence complémentaire, médecine alternative. 2013.
- [11] : PHILIPPE JM. Le guide de l'apiculteur. Paris : Épisode, 1994.
- [12] : NAMUR. Journée d'information organisée aux facultés Notre-Dame de la paix à namur place de la justice. Auditoire M.03 (faculté de Médecine). Présentation du bilan des activités développées dans le secteur apicole avec l'aide du programme miel de la communauté européenne. 2016.

- [13] : ABBAD Houssam, OULDAMER Sofiane ; « Contribution à l'étude des effets anti oxydants d'extrait éthanolique de propolis de la wilaya de Sétif ». Mémoire de master. Université de Bouira. (2016).
- [14] : FLORENCE Potier ; « La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique », Thèse de doctorat. Université de Lorraine. (2014).
- [15] : S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama ; 'activité antioxydante de la propolis de différentes régions géographiques', chimique; vol 84 ; 2004; 84; 329–339.
- [16] : Bonvehí, J.; Gut iérrez, Activité antioxydante et totale phénolique de la propolis de nord d'Espagne. Journal de 'the American Oil Chemists' Society 2011, 88, 1387–1395.
- [17]: R. KRELL., 1996. Value -edded produits de nourriture d'apiculture et agriculture organisation des états unis Roné chapitre. 5.
- [18]: Nolkemper S., Reichling J., Sensch K.H., Schnitzler mecanisme de suppression du virus herps simplex de type 2 par des extraits de propolis. Phytomedicine. 2010, pp. n.17(2), p. 132-138.
- [19] : BOUREDJOUL Zineb., « les récentes tendances et les importants développements dans la recherches de la propolis » mémoire de fin d'études en vue de l'obtenions du diplôme des études supérieures en biologie. université de JIJEL.2012.
- [20] : INOUE et al. , 2010; Jawad &Langrish, 2012.
- [21] : SEGUENI Narimane ; « Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis ».Thèse de doctorat. Université Constantine. (2011).
- [22] : Machado J.L., Assunção A.K.M., Da Silva M.C.P., Dos Reis A.S., Costa G.C., Arruda D.S., Rocha B.A., Leite Vaz M.M.O.L., Paes A.M.A., Guerra R.N.M., Berretta A.A., Nascimento F.R.F. Brazilian Green Propolis : propriétés anti-inflammatoires avec une activité immunodulatrice.« Base évidence complémentaire, médecine alternative » 2012, pp. Volume 2012, Article ID 157652.
- [23]: E.L., Ghisalberti. Propolis. A review. Bee World. 1979, pp. n. 60, p. 59-84
- [24] : Oksuz H., Duran N., Tamer C., Cetin M., Silici S. Effect of propolis in the treatment of experimental Staphylococcus aureus keratitis in rabbits. . Ophthalmic Res. 2005, pp. n. 37, p. 328–334.

- [25]: Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2003, pp. vol. 47, no. 10, pp. 3357–3.
- [26]: A.uzel, ö. öncag, D.coğlu, öncag, ö. Gençay, chemical composition and anti-microbial activities of four different Anatolian propolis sample Microbial. 2005.
- [27]: T.T. Cushine, A.J. Lamb, detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in Staphylococcus aureus by measuring potassium loss, J. Ethno Pharmacol. 2005.
- [28]: Mkrtchyan, Z.G. Methods and means of Helicobacter pylori eradication in the oral cavity. New Armenian Medical Journal. 2011.
- [29]: Espèce décrite et isolée à Lyon en 1988. Cf. F. Lecuire, D. Gontier, J. Carrere, M. Basso, I. Benureau, J. Rubini, « infection staphylocoque. Lydunensis sur prothèses articulaire : à propos de 7 cas » revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil. 2007.
- [30]: article, bactériologie. Chapitre trois « Staphylococcus aureus » Médecine. Université de la Sorbonne, France.
- [31]: Ann-Christinedella Valle article, avril 2019.
- [32]: CLAVE Danielle, fiche technique bactériologie. Centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique. 2014.
- [33]: Larry M. Bush MD, FACP, Charles E. Schmidt College of Medicine, Florida University. Juin 2019.
- [34]: Maria T. Vazquez-Pertejo, MD, FACP, Wellington Regional Medical Center.
- [35]: Verretteluc, symptômes de l'infection à E.Coli. Université de Montréal 2018.
- [36]: DEBAB Mokhtaria « Analyse pollinique et activités biologiques de la propolis de l'ouest algérien ». Thèse de doctorat. Université de Sidi Bel Abbès. 2019.
- [37]: Esimone C.O., Iroha I.R., Ibezim E.C., Okeh C.O., Okpana E.M. l'évaluation de l'interaction entre les extraits du tea et la pénicilline contre Staphylococcus aureus in vitro. . Afr. J. Biotechnol. 2006, pp. n. 5, p. 1082–1086.
- [38]: De Castro S.L., Bom V.L.P., Brown N.A., Almeida R.S.C.D., Ramalho L.N.Z., Savoldi M., Goldman M.H.S., Goldman G.H. l'identification des cibles cellulaires importantes de la

mort cellulaire induite par la propolis chez candida albicans. FungalGenetics and Biology. 2013.

[39] : DUCAUZE Christian ; . « Chimie analytique, analyse chimique et chimiométrie ‘concepts, démarche et méthode’ ». Université de Lavoisier, Paris. 2014.

[40]: BOUHAJIB Mohamed ;. “Analyses des Glycoside de piceamariana (Mill.) B.S.P. ; mémoire présenté comme Exigence partielle de la Maitrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi. (1992).

[41]: A. J. P. Martin, L. Synge; Biochem. J. 1941, 35, 1359.

[42] : GHANI Souhila ;. « Elucidation de structures configurationnelles par des méthodes théoriques », . Mémoire de magister. Université d’Oran Es-sénia. 2011.

[43] : DAIKH Takoua ; DAFRI Fouzia, «contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la FLUVASTATINE LDM 80 mg ». Mémoire de master. Université Frère Mentouri Constantine 1. 2016-2017.

[44] : Dr Thierry Briere - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion, (2001), p36-37.

[45] : Dr Thierry Briere - Professeur agrégé – Département de Chimie, Université de La Réunion,(2001), p44-45.

[46] : BEN SAAD Latifa ; . « Etude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC : application à l’étude de leur dégradation par rayonnement gamma ».Thèse de master. Université Tunis El Manar. 2013.

[47]: K. HAMZA, A. TOUATI, A. AIT YAHIA, and A. MEKLAT. “Mise En Evidence De L’activité antimicrobienne de deux séries de Nitrones et d’Isoxazolidininessynthetisees », Sci. Technol. C, vol. N° 28 Décem, pp. 65-72. 2008.

[48] : Berkani Manal ; . Séparation de vitamers lipophiles dans quelques huiles végétales par chromatographie HPLC. Mémoire de master. Université de Tlemcen. 2017-2018.

[49] : GRATIEN Aline ; . Spectroscopie ultraviolet-visible et infrarouge de molécules clés atmosphériques. Thèse de doctorat. Université Paris12 –Val de Marne UFR de Sciences et Technologies. 2008.

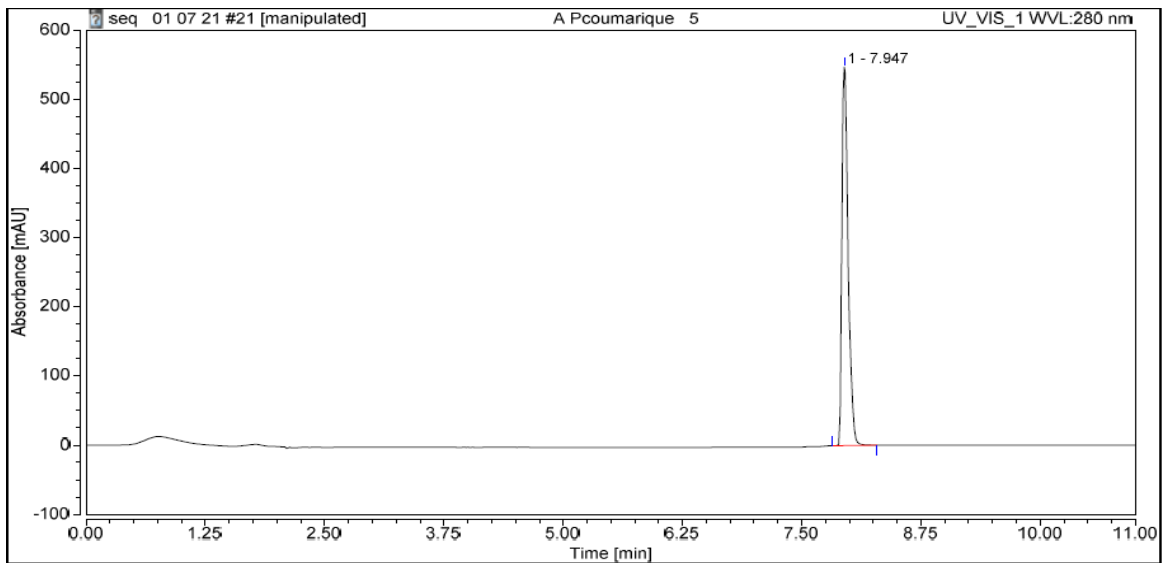
- [50] : YAHATENE Djazia; « Mise au point et validation d'une méthode de dosage de la Méthylprédnisolone par spectrophotométrie UV/Visible ». Mémoire de master. Université A. M. OULHADJ – Bouira. 2016.
- [51] : LOUAHAB Hassina ;. « Métabolites primaires de fenouil (Foeniculumvulgare Mill) ». Mémoire. Université AKLI MOHAND OULHADJ – Bouira. 2018.
- [52] : Abragam, A. ; les principes du magnétisme nucléaires ; bibliothèque de science technique nucléaires, Saclay, 1961.
- [53] : Canet, D. ; La RMN concepts et méthodes ; inter éditions, 1991.
- [54] : SAIDI Fadila ;. « RMN haute résolution solide par multiple-résonance : transfert de polarisation simple et multiple entre noyaux à fréquences de Larmor proches. Thèse de doctorat. Université Versailles. 2016.
- [55] : RAZAFINTSALAMA Tahiana ;. « DOSAGE DE METAUX LOURDS (Pb, Cd, Fe) PAR LA SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE DANS LES TISSUS ». Thèse de doctorat. Université d'Antananarivo. 2009.
- [56] : Elsevier, journal de photochimie et photobiologie, B : biologie (journal Pre-Proof).2020.
- [57] : AIJAZ Ahmed ;.Article « the in vitro antimicrobial activity of cymbopogon essential oil(lemon grass) and it's interaction with silver ions. Université de JEDDAH Arabie saoudite.2015 [657.665].
- [58]: MOUHANIKA Manel ; FITA Wissaam ; KAKA Zohra ;. « Evaluation de l'activité anti-inflammatoires et antalgique de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel ». Mémoire de master. Université Mohammed SeddikBenyahia de Jijel. 2018-2019.
- [59] : NADHI et LOUCIF ;.Gestion de valorisation des ressources naturelles et développement durable. Thèse de doctorat. Université de Sidi Bel Abas. 2014.
- [60] : Mkrtchyan, Z.G. méthode et signification de Hilcobater pylorie radication dans la cavité orale. New American Medical Journal. 2011.
- [61] : BOUSSAHA Bilal, SIAFA Farid; « L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brute de propolis in Vitro ». Mémoire de Master. Université 8 mai 1945 Galma. 2018.

Annexes

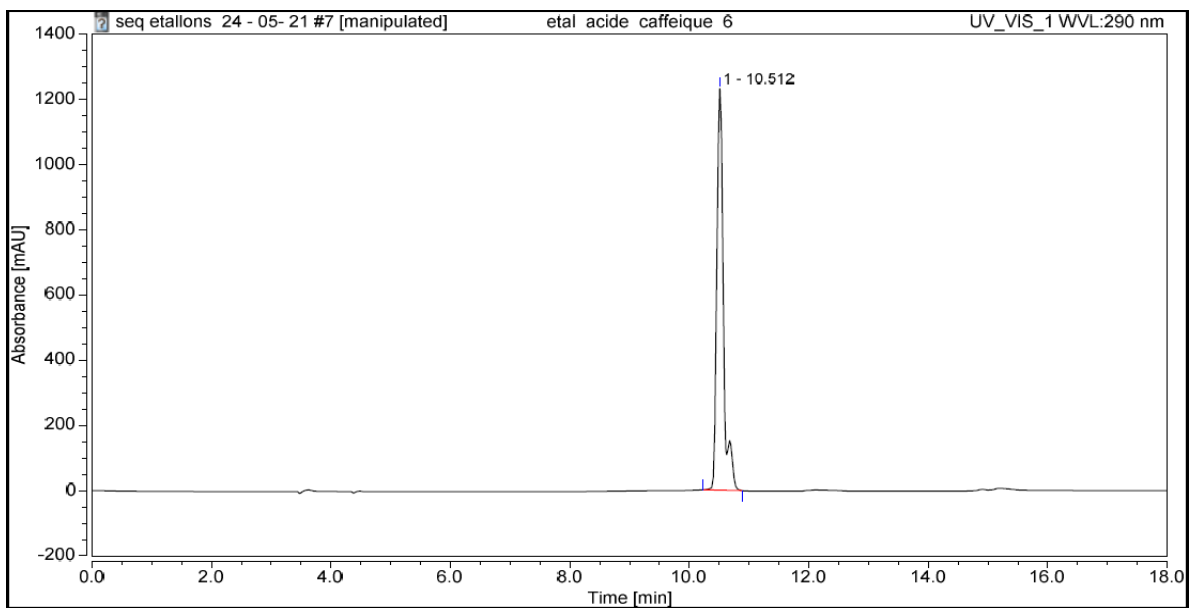
Annexes

Annexe 1 : résultats de l'analyse chromatographique des échantillons.

a) Chromatogramme de l'acide p-coumarique.

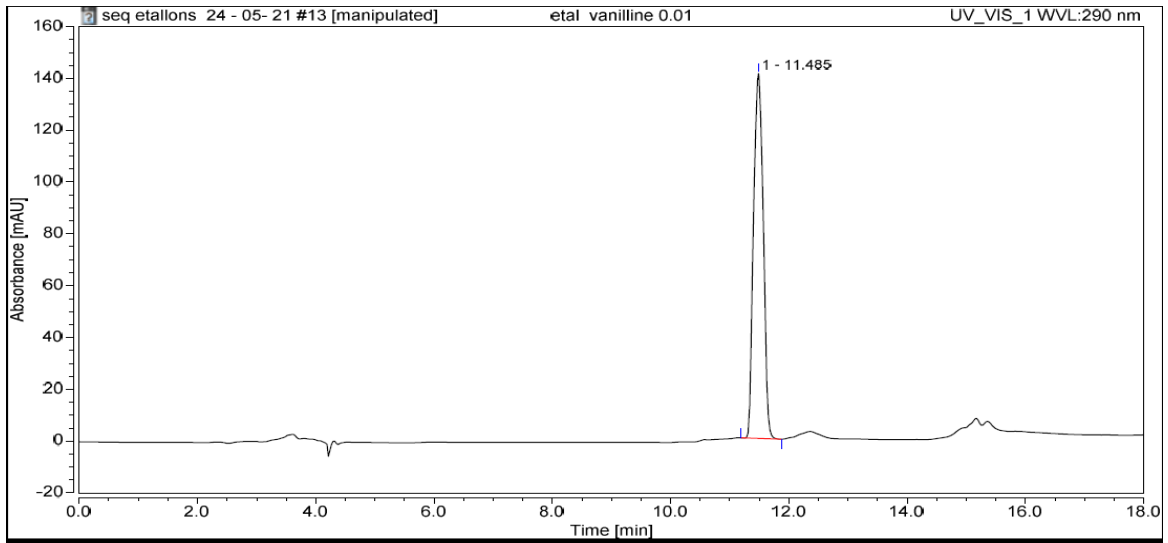


b) Chromatogramme de l'acide caféique

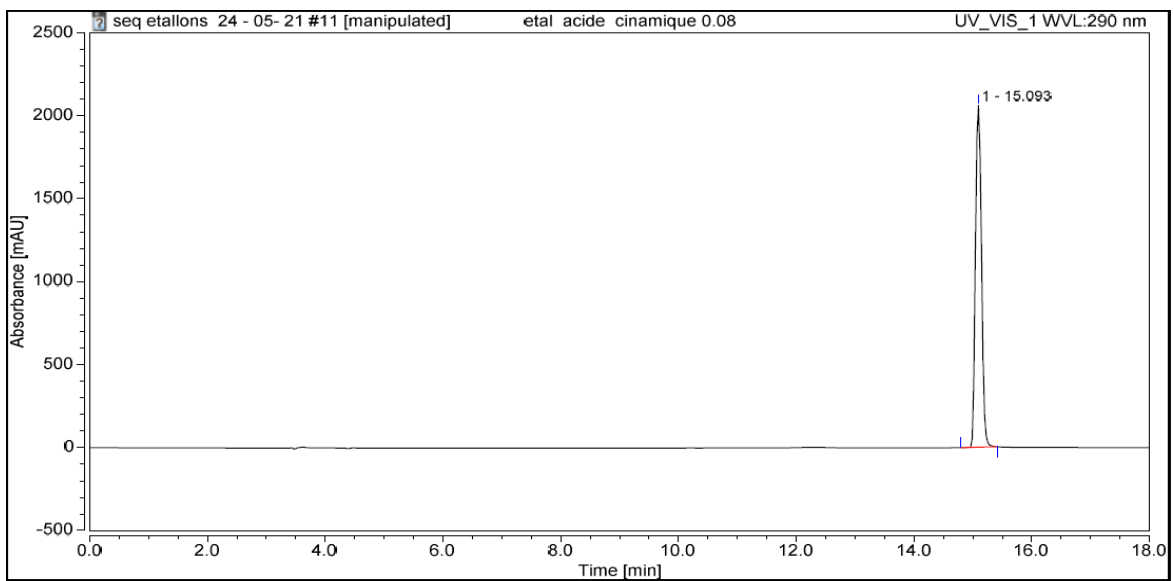


Annexes

c) Chromatogramme de la vanilline.

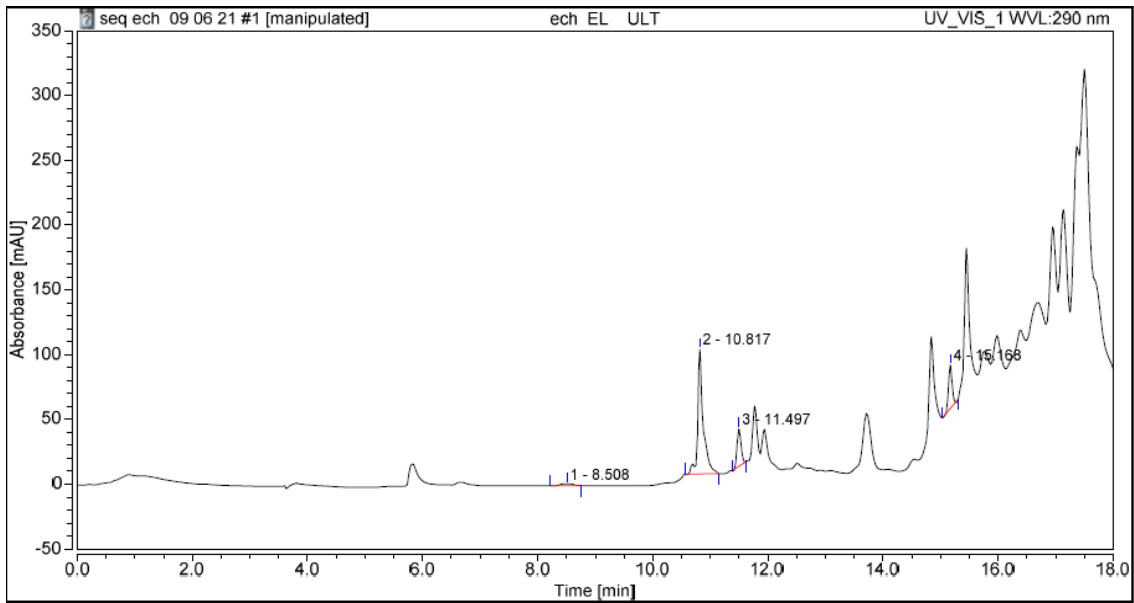


d) Chromatogramme de l'acide cinnamique.

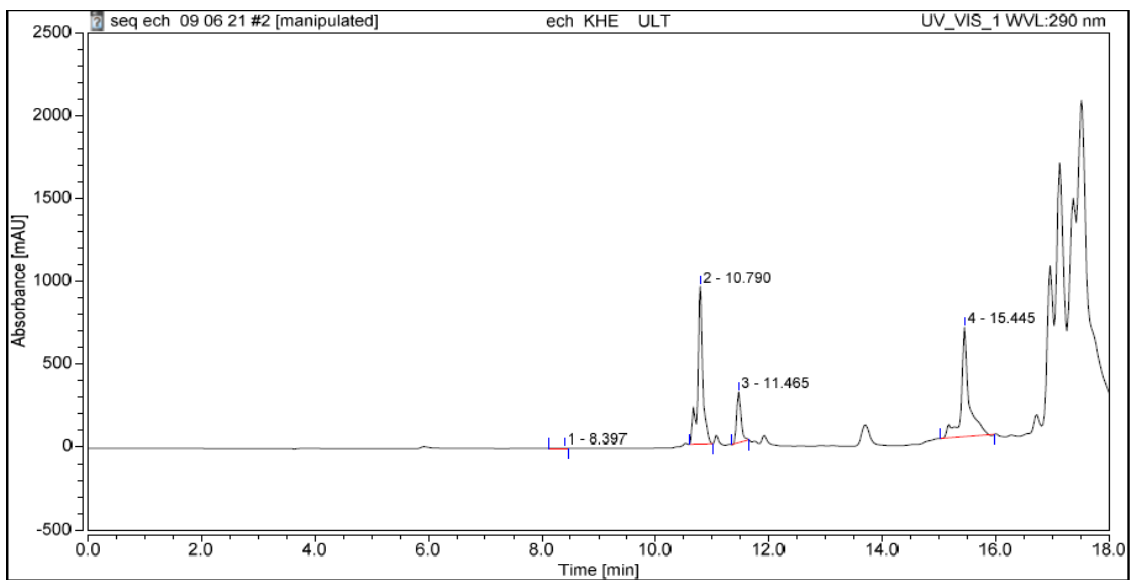


Annexes

e) Chromatogramme de la région d'El kseur par ultrason.

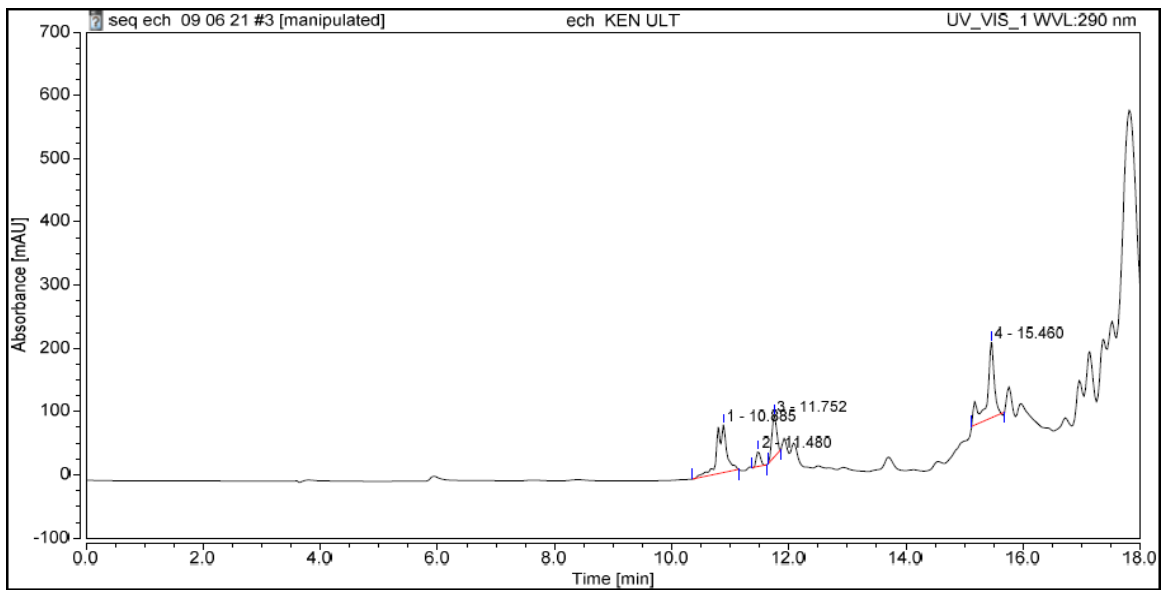


f) Chromatogramme de la région de Kherrata par ultrason.

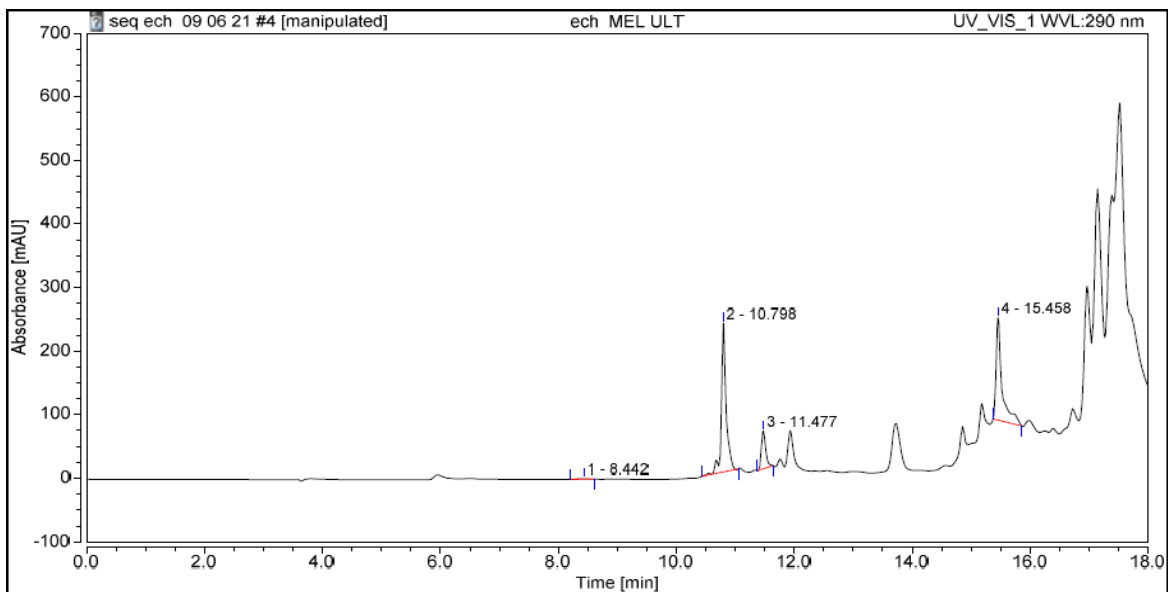


Annexes

g) . Chromatogramme de la région de Kendira par ultrason

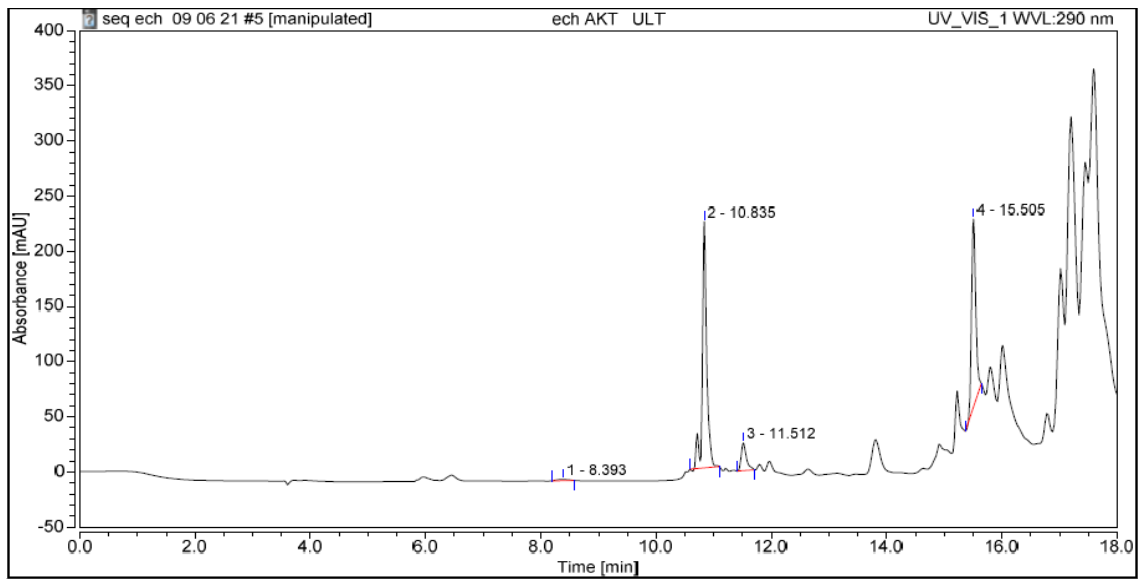


h) Chromatogramme de la région de Melbou par ultrason

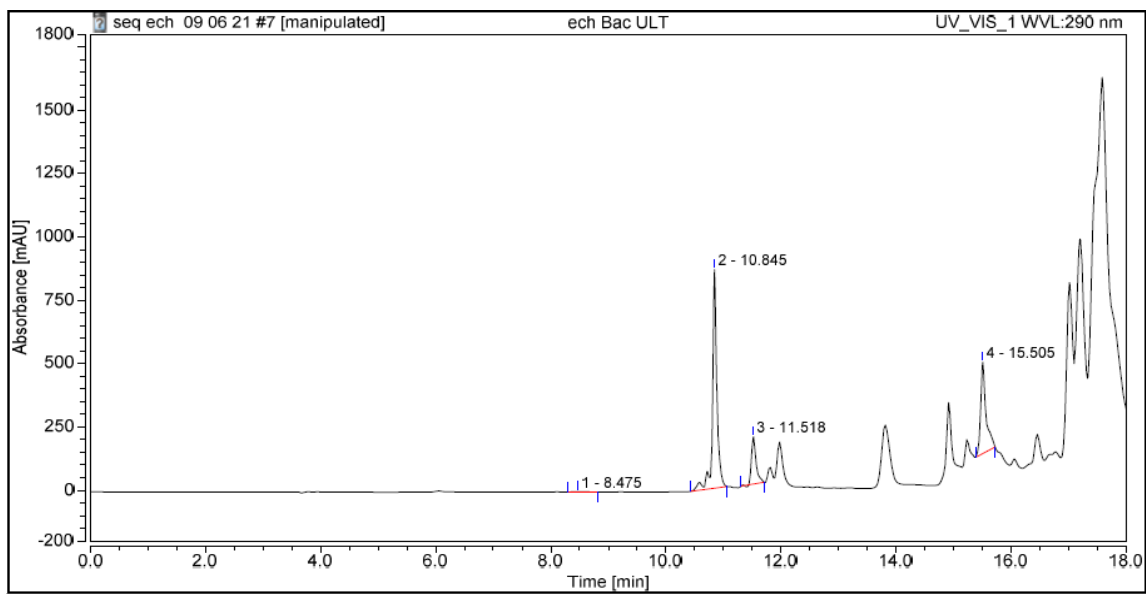


Annexes

i) Chromatogramme de la région d'Akfadou par ultrason.

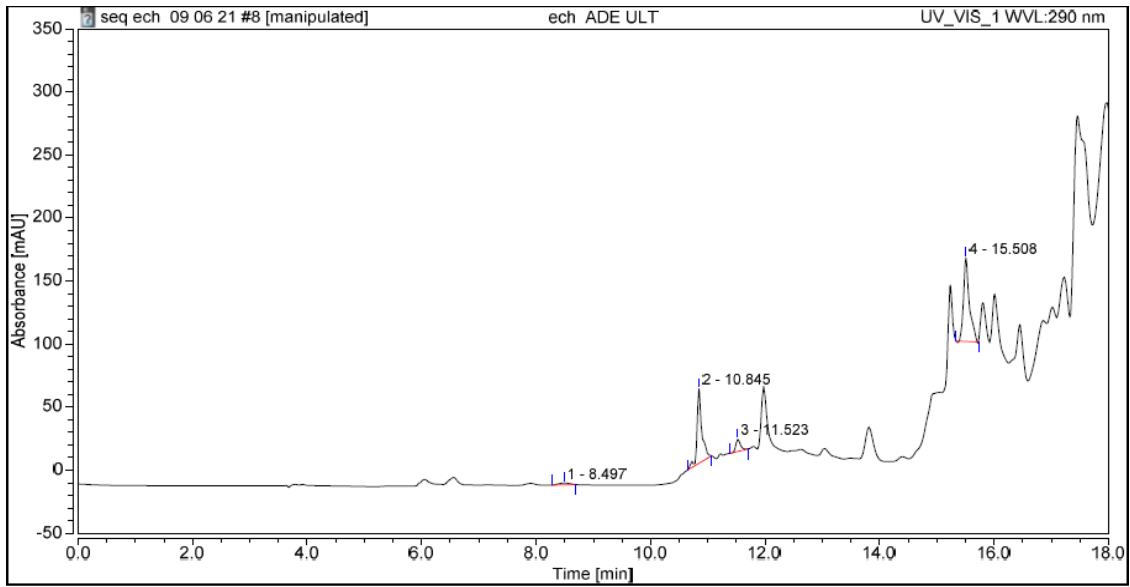


j) Chromatogramme de la région de Baccaro par ultrason.

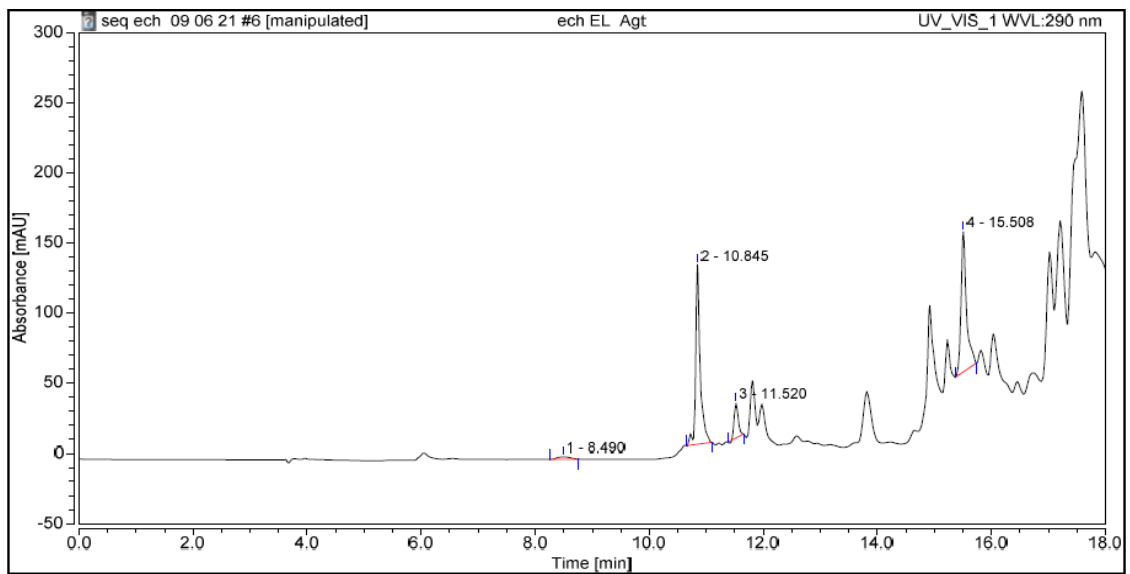


Annexes

k) Chromatogramme de la région d'Adekar par ultrason

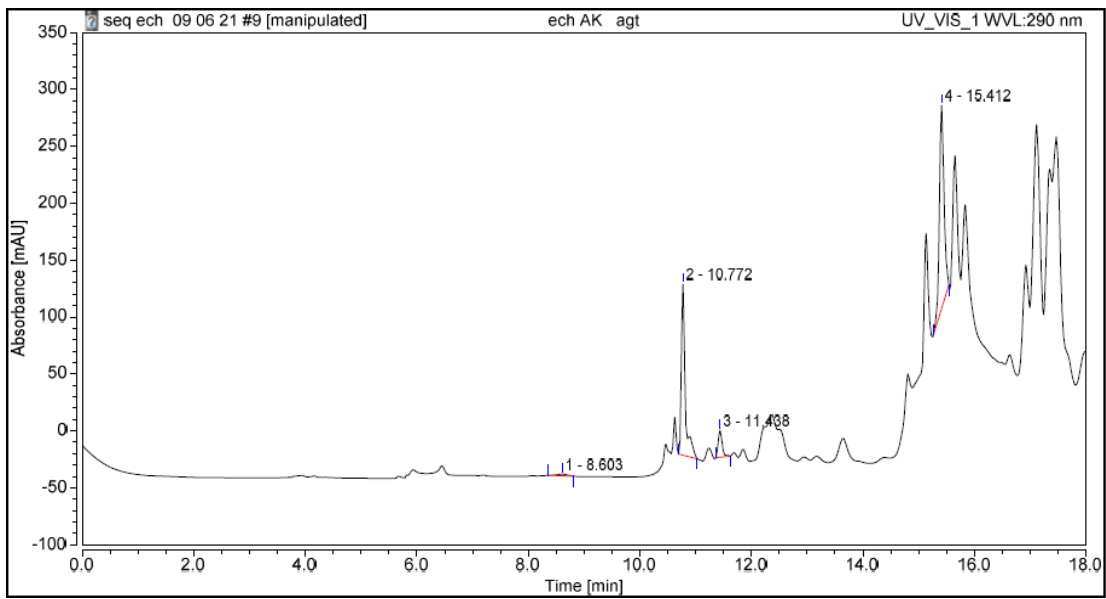


l) Chromatogramme de la région d'El kseur par agitation

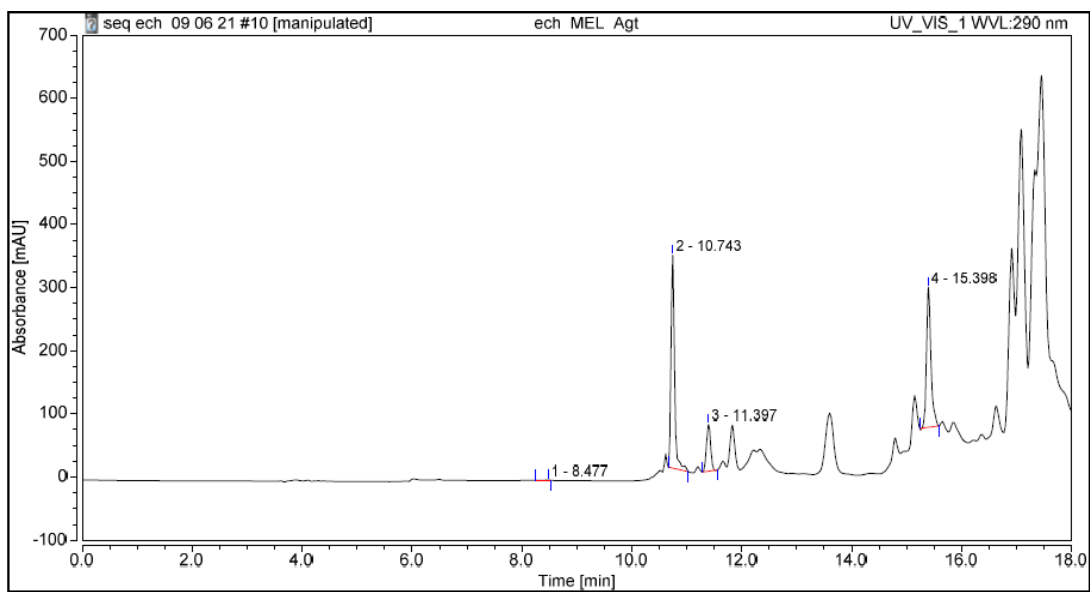


Annexes

m) Chromatogramme de la région d'Akfadou par agitation

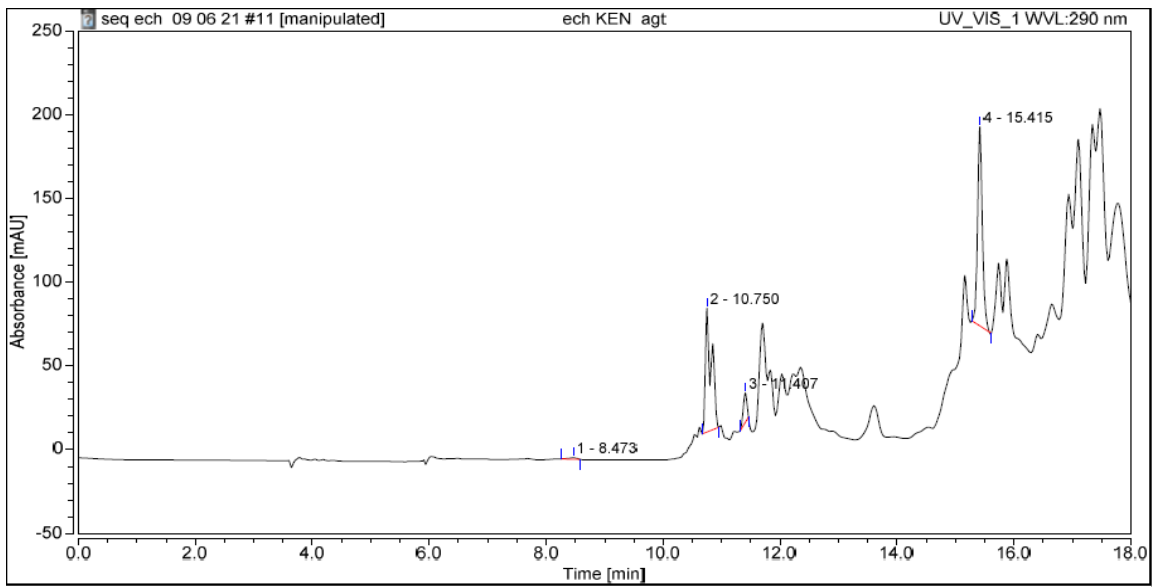


n) Chromatogramme de la région de Melbou par agitation

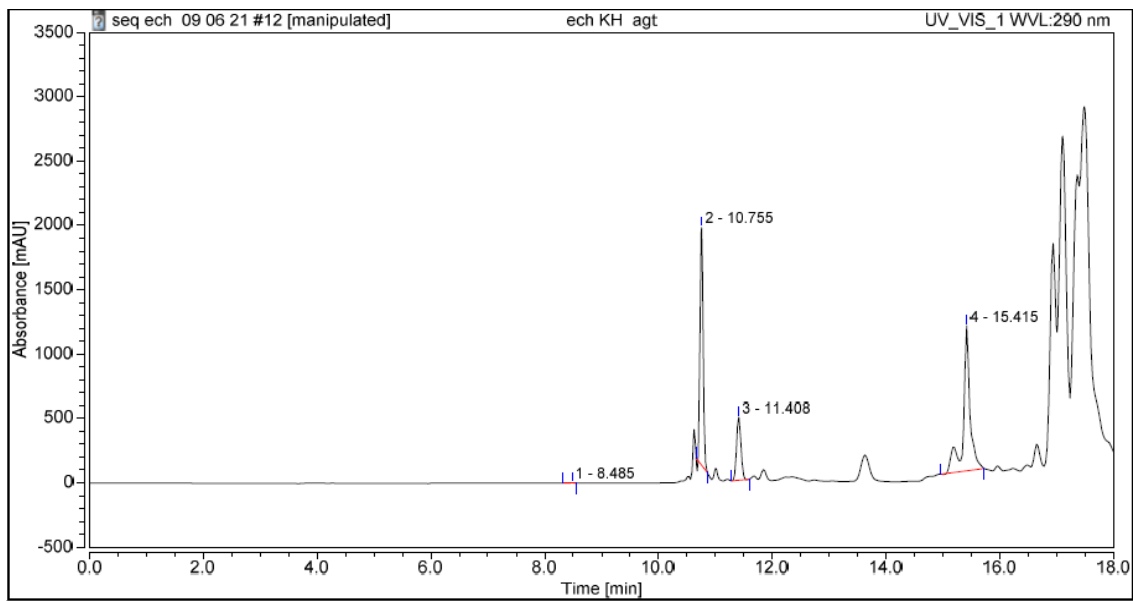


Annexes

o) Chromatogramme de la région de Kendira par agitation.



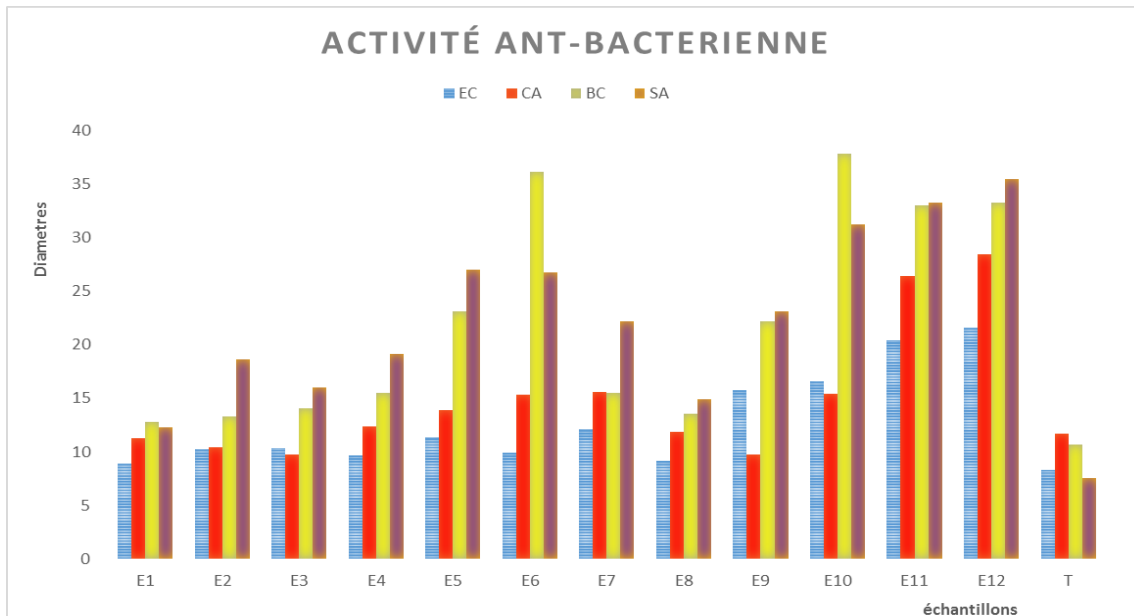
p) Chromatogramme de la région de Kherrata par agitation.



Annexes

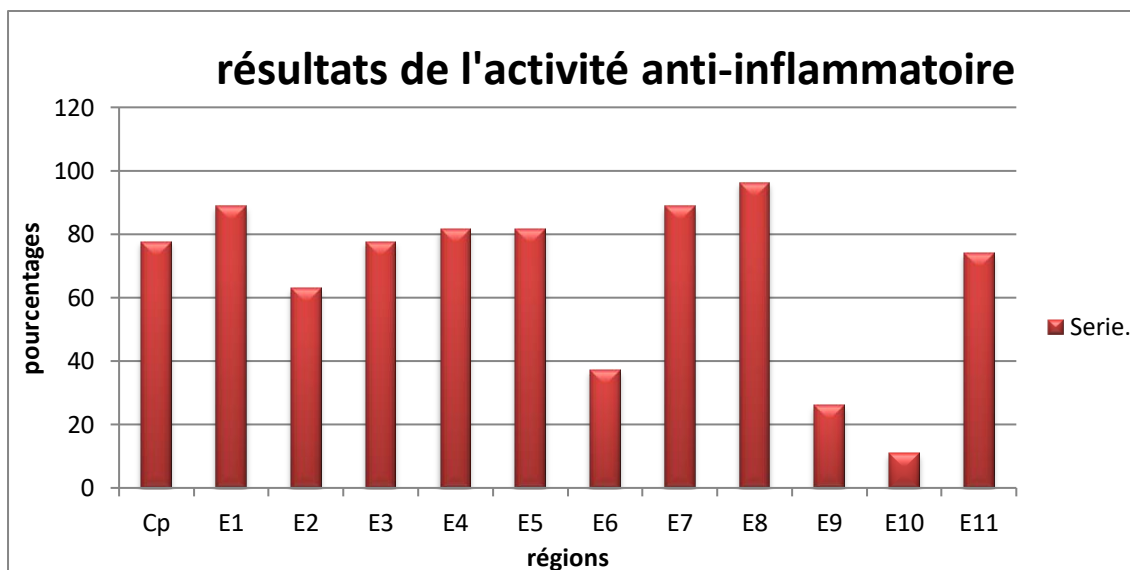
Annexes 2 : les diagrammes des résultats de l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire.

a) Les diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes.



Avec : **E1**:Adekar (ULT), **E2** : Akfadou (ULT), **E3** : Akfadou (agt),**E4** : EL (ULT), **E5** : EL (agt), **E6** : kherrata (ULT), **E7**:Kherrata (agt), **E8** : kendira (ULT), **E9** : Kendira (agt),**E10** : Baccaro (ULT), **E11** : Melbou (ULT), **E12** : Melbou (agt).

b) L'histogramme des différentes régions en fonction du pourcentage d'inhibition



Annexes

Annexes 3 : équipement et appareils utilisés durant cette étude.

- a) Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (UltiMate 3000)



- b) Balance électrique (Denver)



Annexes

c) L'étuve.



Annexe 4 : la propolis

a) L'échantillon étudié



Résumé

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir des plantes, la résine collectée se fait transformer par leur enzyme secrété par le système glandulaire en produisant la propolis, elle est utilisée à l'intérieure de la ruches pour protéger leur colonies, du fait de leur propriétés biologiques et physico-chimiques.

Notre travail est une contribution à l'évaluation de l'effet antibactérien, anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de propolis préparés par ultrason et par agitation de sept différentes régions de Bejaïa, et d'identifier leurs composés phénolique en utilisant l'HPLC.

Au final nous avons obtenue les résultats suivant :

- Nous avons pu identifier et quantifier quatre composés phénoliques (acide cinnamique, acide P-coumarique, vanilline, l'acide caféique).
- La propolis de différentes régions de Bejaïa à un effet antibactérien sur toutes les souches utilisées et plus puissant sur gram positives.
- Le meilleur effet anti-inflammatoire est obtenu avec la région de **Melbou** par la méthode d'agitation.

Mots clés : Propolis, HPLC, composés phénoliques, activités biologiques.

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by bees from plants, the collected resin is transformed by their enzyme secreted by the glandular system producing **propolis**, it is used inside the hives to protect their colonies, for their biological and physico-chemical properties.

Our work is a contribution to evaluate the antibacterial, anti-inflammatory effect of ethanolic extracts of propolis prepared by ultrasound and by agitation of seven different Bejaia regions, and identified their phenolic compounds using HPLC.

In the end, we obtained the following results:

- We were able to identify and quantify four phenolic compounds (cinnamic acid, P-coumaric acid, vanillin, and caffeic acid).
- Propolis from different Bejaia regions has an antibacterial effect on all the strains used and stronger on gram positive.
- The best anti-inflammatory effect is achieved with Melbou region by the agitation method

Keywords: Propolis, HPLC, phenolic compounds, biological activities.