

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 Alimentaire.**

### **Thème :**

**Elaboration et optimisation des films d'emballage alimentaire à base de PLA et d'extrait éthanolique de propolis**

Présenté par :

**DJOUDI LYDIA & SAHI SABRINA**

Devant le jury composé de :

Mr. Fatmi Sofiane	MCA	Université de Bejaia	Président
Mr. Azzoug Mouffok	MCA	Université de Bejaia	Examineur
Mme. Chibani Nacera	MCB	Université de Bejaia	Promotrice
Mme. Bensidhoum Leila	Docteur	Université de Bejaia	Co-Promotrice
Mr. Bourkab Fares			Invité

**Année universitaire : 2018 / 2019.**

## **Remerciements**

*On remercie le bon Dieu de nous avoir donné le savoir et la force de pouvoir réaliser ce travail.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre promotrice **Dr CHIBANI Nacéra** et à notre Co-promotrice **Dr BENSIDHOUM Leila** qui nous ont permis de bénéficier de la qualité de leurs encadrement, les conseils qu'elles nous ont prodiguées, la patience et la confiance qu'elles nous ont témoignées.*

*On remercie également **Pr NABTI Hafid** qui nous a accueillis dans son laboratoire de recherche **LMER**.*

*Nos vifs remerciements vont au **Dr FATMI Sofiane** d'avoir accepté la présidence du jury, nous tenons compte à exprimer toute nos reconnaissances au **Dr AZZOUG Moufok** qui nous a fait l'honneur d'examiner notre travail, leurs regards critiques ne sauront que rehausser le niveau de notre savoir-faire.*

*On présente nos remerciements à l'apiculteur et vétérinaire **Mr Fares** qui nous a fourni la matière première essentielle à la réalisation de ce travail.*

*On remercie **Mme HAMMADACHE Hassiba**, **Melle ARDJOUR Nadjet** et **Melle BELHAMEL Chiraz** pour leurs aides et conseils pendant la réalisation de ce travail.*

*Merci également aux techniciens du Département de Génie des Procédés sans qui ce mémoire ne serait pas illustré de si beaux spectres infrarouge et d'UV-visible.*

*On s'adresse plus particulièrement à la technicienne de laboratoire de Génie des Procédés de l'Environnement **Mme ADRAR Kahina** qui nous a toujours mis à l'aise dans le laboratoire. On tient à remercier aussi tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette étude.*

## ***Dédicace***

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents Karima et Djamel qui ont été ma source d'espoir*

*Je vous en serai éternellement reconnaissante.*

*Mon cher Fouzy qui m'a toujours encouragé et soutenu.*

*Mes frères et sœurs : Choumaïssa , Houda , Félicia , Chaima, Wathik qui*

*Étaient toujours à mes côtés.*

*Mes tantes et mes oncles*

*Mes amies Wissem, Lilia, Maïssa et Rachel.*

*A ma collègue Lydia et à toute la promotion Master Génie alimentaire 2018-*

*2019, à qui je souhaite bonheur et réussite.*

*Ce travail n'aurait pas pu être finalisé sans la présence de ces personnes dans  
ma vie.*

***Sabrina***

## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*A Dieu, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser  
ce précieux travail.*

*A mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui  
qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu le garde.*

*Mon Père*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur.*

*Ma mère*

*A mes chères sœurs Narimene, Zahra et Maissa qui étaient toujours à mes côtés.*

*A mes chers cousines : Katia, kamilia, Sofia, Yara, Kenza, Faiza, Zoulika,  
Anissa, Houria.*

*A tous mes oncles et mes tantes.*

*A mes très chères amis : Sabrina, Wissem, Sabria.*

*à toute la promotion Master Génie alimentaire 2018-  
2019, et à toutes les personnes que j'aime...*

*A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.*

***Lydia***

## ***Liste des figures***

- Figure I.1.** Transfert de la matière entre aliment et emballage.
- Figure I.2.** Capacité globale de production des bioplastique.
- Figure I.3.** Matrice des bioplastiques.
- Figure I.4.** Classification des bioplastiques.
- Figure I.5.** Exemple d'application du PLA dans l'emballage alimentaire.
- Figure II.1 :** La propolis brute.
- Figure II.2.** Récolte de la propolis par l'abeille.
- Figure II.3.** Récolte de la propolis par l'homme (grattage des cadres).
- Figure II.4.** Récolte de la propolis par l'homme (grilles moulées).
- Figure IV.1.** PLA sous forme de granulés.
- Figure IV.2.** Evaporateur rotatif (rotavapor).
- Figure IV.3.** Réaction de chlorure d'aluminium et des flavonoïdes.
- Figure IV.4.** Réduction du radical DPPH par un antioxydant .
- Figure IV.5.** Mise en évidence de l'effet bactérien de l'extrait de propolis.
- Figure IV.6.** Mise en évidence de l'effet antifongique de l'extrait de propolis.
- Figure IV.7.** Ultra-Turax.
- Figure IV.8.** Machine d'attraction.
- Figure IV.9.** Taux d'absorption d'eau des films.
- Figure V.1.** Spectre UV-visible de l'extrait de propolis.
- Figure V.2.** Spectres IR-TF de la propolis brute et de l'extrait EEP.
- Figure V.3.** Histogramme de teneurs en polyphénols, en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de propolis.
- Figure V.4.** Histogramme de DPPH de l'extrait éthanolique de propolis.
- Figure V.5.** Histogramme du pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de propolis.
- Figure V.6.** Résultats du test d'inhibition de la croissance bactérienne par EEP.
- Figure V.7.** Histogramme de diamètre d'inhibition de l'extrait éthanolique de propolis.
- Figure V.8.** Diamètres d'inhibition de la propolis pour les bactéries.
- Figure V.9.** Résultats du test d'inhibition de la croissance antifongique par EEP.
- Figure V.10.** Histogramme de diamètre d'inhibition de l'extrait éthanolique de propolis.

**Figure V.11.**Diamètres d'inhibition de la propolis pour les champignons.

**Figure V.12.** Spectre IR-TF des films à base de PLA

**Figure V.13.**résultats du test d'inhibition de la croissance bactérienne des films de PLA/EEP.

**Figure V.14.** Photographie des films obtenus PLA / EEP obtenue par casting. .

**Figure V.15.**facteurs statistiques obtenus.

**Figure V.16.**Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le module d' Young.

**Figure V.17.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le Test d'absorption d'eau.

**Figure V.18.**facteurs statistiques obtenus.

**Figure V.19.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le module d' Young.

**Figure V.20.**Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le Test d'absorption d'eau.

## ***Liste des Tableaux***

**Tableau I.1.**Principales propriétés du PLA.

**Tableau I.2.**Propriétés mécaniques de quelques polymères.

**Tableau IV.1.**Principales propriétés physiques du PLA.

**Tableau IV.2.** Souches bactériennes testées.

**Tableau IV.3.**La matrice des essais proposés par MODDE 6.

**Tableau V.1.** Diamètres d'inhibitions en mm d'EEP pour l'activité antibactérienne.

**Tableau V.2.**Diamètres d'inhibitions en mm d'EEP pour l'activité antifongique.

**Tableau V.3.**La matrice d'étude complète.

**Tableau V.4.**Valeurs numériques des caractéristiques numériques.

**Tableau V.5.**Valeurs cibles de module d'Young et de test d'absorption d'eau.

**Tableau V.6.**Détermination de l'optimum.

**Tableau. 7.**Caractéristiques du film optimal.

## ***Liste des abréviations***

**PE** : Polyéthylène.

**PP** : Polypropylène.

**PET** : Polyéthylène téréphtalate.

**PS** : Polystyrène.

**PLA** : Polylactic acid .

**Bio PE** : Biopolyethylene.

**LDPE** : Low density polyethylene.

**PA6** : Polyamide 6 ou polycaprolactame.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**FSL** : Food simulating liquids.

**PEG** : Polyéthylène glycol.

**CB** : calcium bentonite.

**CNC** : Cellulose nanocrystals composites.

**TBE** : Tanacetum balsamita essential oil.

**LAB** : Lactic bacteria.

**AF** : Active film.

**AA** : Active agent.

**DDM** : Disc diffusion method .

**CNF** : Nano cellulose fibers.

**ZEO** : Ziphora Essential oil.

**EPE** : Ethanolic propolis extract.

**ZME** : Zataria multiflora essential oil .

**TIAC** : Toxi-infections alimentaires collectives.

**SP** : Espèce.

**IRTF** : Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier.

**UV** : Ultraviolet.

**PT** : polyphénols totaux.

**DPPH** : diphénylpicrylhydrazyle.

**EEP** : extrait éthanolique de propolis.

**UFC** : Unité formant colonie.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**MH** : Muller Hinton.



**EAG** : Equivalent en acide gallique.

**EQ** : Equivalent de quercitine.

**EAA** : Equivalent en acide ascorbique.

## *Sommaire*

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale.....	1
I.1.Introduction.....	3
I.2.Catégories d’emballage alimentaire.....	3
I.3.Fonctions de l’emballage .....	3
I.4.Norme liée à la maîtrise de l’hygiène des emballages :.....	4
I.5.Matériaux d’emballages alimentaires .....	4
I.6.Essai de contrôle de qualité de l’emballage plastique .....	5
I.6.1.Contrôle de la qualité microbienne de l’emballage alimentaire.....	5
I.7.Interaction physico- chimiques Emballage / Aliment.....	5
I.7.1.Perméation.....	6
I.7.2.Sorption .....	6
I.7.3.Migration.....	6
I.8.Bioplastiques.....	8
I.8.1.Définition des biopolymères (bioplastiques).....	8
I.8.2.Classification des bioplastiques .....	8
I.8.3. Application des biopolymères dans l’emballage alimentaire.....	9
I.9. L’acide polylactique.....	10
I.9.1.Propriétés thermiques .....	11
I.9.2. Propriétés physiques.....	12
I.9.3. Propriétés mécaniques.....	13
I.9.4.Biodégradation de l’acide poly lactique.....	13
Chapitre II. Généralités sur la Propolis .....	18
II.1. Généralités sur la propolis .....	18
II.2. Récolte de la propolis .....	18
II.3. Propriétés physiques de la propolis .....	20
II.4. Composition de la propolis.....	20
II.5. Substances bioactives de la propolis .....	20
II.5.1.Flavonoïdes .....	20

II.5.2.Acides aromatiques et dérivés .....	21
II.5.3.Huiles essentielles .....	21
II.5.4.Acides organiques .....	21
II.5.5.Vitamines et oligoéléments .....	21
II.6.Activités biologiques de la propolis .....	21
II.6.1. Activité antimicrobienne de la propolis .....	21
II.6.2. Activité antioxydante .....	22
II.6.3. Activité anti-tumorale .....	22
II.6.4. Activité antivirale.....	22
II.6.5. Activité anti-protozoaire : .....	22
II.6.6. Activité antifongique .....	23
II.7. Applications de la propolis .....	23
IV.1. Présentation des produits utilisés .....	34
IV.1.1. Acide poly lactique (PLA) .....	34
IV.1.2. Propolis.....	35
IV.1.3. Chloroforme .....	35
IV.1.4. Alcool éthanolique .....	36
IV.1.5. Glycérol.....	36
IV.2. Matériel biologique .....	36
IV.2.1. Souches bactériennes.....	36
IV.2.2. Souches fongiques .....	38
IV.3. Méthodes expérimentales.....	39
IV.3.1. Nettoyage de la propolis.....	39
IV.3.2. Extraction de la propolis.....	39
IV.3.3. Techniques de caractérisation .....	40
IV.3.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF) .....	40
IV.3.3.2. Spectroscopie ultra-violet-visible .....	41
IV.3.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de propolis .....	41
IV.3.3.4.Test d'activité antimicrobienne .....	45
IV.3.3.4.1. Activité antibactérienne .....	45
IV.3.3.5. Activité antifongique .....	46
IV.3.4. Elaboration des films PLA / Propolis .....	47
IV.3.4.1. Choix des facteurs et réponses .....	47
IV.3.4.2.Choix du plan d'expérience .....	47
IV.3.4.3. Plan d'expérience retenu .....	47

IV.3.4.4.Réalisation des essais de la matrice d'expérience .....	48
IV.3.4.5.Evaluation du Module de Young .....	49
IV.3.4.6.Test d'absorption d'eau .....	50
IV.3.4.7.Test d'activité antibactérienne.....	50
V.1.Extrait éthanolique de la propolis.....	55
V.1.1.Analyse spectrophotométrie UV-visible de l'extrait de propolis .....	55
V.1.2.Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR.....	56
V.1.3.La teneur en composés phénoliques .....	57
V.1.3.1.La teneur en polyphénols totaux .....	57
V.1.3.2.La teneur en flavonoïdes .....	57
V.1.4.Activité antioxydante.....	59
V.1.4.1.Effet de piégeage du radical DPPH.....	59
V.1.4.2.Pouvoir réducteur.....	60
V.1.5.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	61
V.1.6.Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait éthanolique de propolis.....	64
V.2. Films PLA / EEP .....	67
V.2.1.Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR.....	67
V.2.2.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	68
V.2.3.Réalisation des essais de la matrice d'expériences.....	69
V.2.4.Analyses globales des résultats.....	71
V.2.4.1.Analyses statistiques .....	71
V.2.4.2.Exploitation des résultats .....	71
V.2.4.3.Analyses des effets propres des facteurs sur les réponses.....	72
V.2.4.4.Interprétation des histogrammes .....	73
V.2.4.5.Modèle mathématique proposé .....	75
V.2.4.6.Détermination et validation de l'optimum .....	77
V.2.4.6.1.Détermination de l'optimum.....	77
Conclusion.....	83

# Introduction Générale

## ***Introduction générale***

La fin de ce siècle est marquée par un développement prodigieux de l'industrie agro-alimentaire. Les progrès technologiques de conditionnement et de conservation ont permis de mettre à la disposition du consommateur une gamme extrêmement variée de produits alimentaires, répondant sans cesse à des besoins grandissants. De nos jours, avec la mondialisation des marchés, l'aspect distribution des marchandises prend une dimension de plus en plus grande, dont il importe de considérer tous les paramètres ayant une incidence technico-économique, tels les contraintes physiques et chimiques, les coûts de l'emballage, les réglementations, etc... Cette nécessaire distribution impose donc une étude sérieuse touchant à la fois à la conception du produit et à la conception de son emballage. Dans l'industrie agro-alimentaire, l'emballage traduit l'interface entre la filière produit et la filière distribution. Les emballages sont si nombreux et si variés qu'ils permettent la conservation et la distribution de toutes les formes de présentation des denrées alimentaires que l'on peut mettre, aujourd'hui, sur le marché. Il est devenu fondamental de déterminer les caractéristiques des matériaux d'emballage utilisés en fonction du produit et de sa distribution.

Au moment où le monde des matériaux se développe, où de nouvelles techniques de fabrication apparaissent, le concepteur doit avoir une parfaite connaissance des matériaux et du produit à emballer. Dans la pratique, le choix des matériaux d'emballage est très difficile. Cette difficulté vient du fait que le plus souvent, on a besoin d'un ensemble de propriétés qu'un matériau unique ne possède pas ou ne possède qu'insuffisamment. Le choix du matériau d'emballage sera défini en fonction du produit à conditionner, des technologies de conservation utilisées, de la durée de vie commerciale souhaitée, des conditions de stockage, de transport et de distribution.

A l'heure actuelle, les matières plastiques (les polymères) sont requises pour de très nombreuses applications parmi ces dernières l'application en emballage alimentaire. Le succès des polymères dans le domaine de l'emballage s'explique par leur diversité et leurs propriétés [1].

La production de ces matières plastiques, toujours en croissance, est devenue un indice économique de développement et la demande croissante des pays émergents pose la question des ressources à l'échelle mondiale. La pression sur la diminution des rejets de CO<sub>2</sub> pour lutter contre le réchauffement climatique, et la contrainte de gestion des ressources fossiles ont amplifié cette dernière décennie la recherche de nouveaux plastiques dits biodégradables issus de la biomasse. L'avantage de faire appel à l'utilisation de ces composés permet, à l'inverse de ceux provenant de ressources fossiles, d'inclure le produit d'utilisation au sein du cycle

biologique (ou cycle du carbone) et donc ainsi de diminuer son impact sur l'environnement. C'est dans ce contexte que le PLA a vu le jour [2].

L'acide poly lactique (PLA) est l'un des polymères biodégradables les plus utilisés dans les emballages à la fois en recherche et en application, le PLA a attiré beaucoup d'attention en raison de ces ressources renouvelables [3].

Afin d'améliorer les propriétés sensorielle du PLA en vue de son application dans le domaine de l'emballage, les chercheurs se sont intéressés à l'incorporation d'extrait de propolis ayant des propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes...

La propolis est une substance résineuse naturelle recueillie par l'abeille. Cette substance couvre une large gamme d'activités biologiques : antibactériennes, antifongiques, antioxydantes...

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, de mettre en évidence les modifications des films polymères à base d'extrait éthanolique de propolis avec polyacide lactique, puis, dans un deuxième temps, d'évaluer l'effet antibactérien par la méthode de diffusion de ces films plastiques.

Le travail présenté s'articule ainsi en deux parties :

La première partie est une revue bibliographique dans laquelle nous présenterons le contexte général de cette étude en décrivant l'utilisation des matières plastiques dans le domaine de l'emballage alimentaire, et en nous nous intéresserons plus particulièrement à la présentation de la propolis. Nous détaillerons ensuite les différentes activités biologiques de ce produit.

La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à l'étude expérimentale ; après avoir décrit la méthodologie analytique adoptée pour réaliser nos objectifs, nous nous intéresserons tout d'abord à l'étude de l'activité anti-oxydante, antifongique et antimicrobienne de l'extrait éthanolique de propolis, puis à la préparation des films plastiques à base de cet extrait avec l'acide polylactique. Enfin, nous nous intéresserons à l'étude d'activité antibactérienne de ces films pour les utiliser comme emballage alimentaire.

Nous concluons ce mémoire en reprenant les principaux résultats obtenus dans ce projet.

# Chapitre I

## Généralités sur l'emballage alimentaire



## **Chapitre I. Généralités sur l'emballage alimentaire**

### **I.1. Introduction**

Avec les développements scientifiques et les avancées technologiques récentes en matière de conservation des aliments, l'industrie des emballages alimentaires n'a cessé de se développer pour d'une part, suivre ces développements, et d'autre part, répondre aux exigences croissantes du consommateur.

### **I.2. Catégories d'emballage alimentaire**

-L'emballage de vente ou **emballage primaire**, c'est-à-dire l'emballage conçu de manière à constituer, au point de vente, un article destiné à l'utilisateur final ou au consommateur.

-L'emballage groupé ou **emballage secondaire**, c'est-à-dire l'emballage conçu de manière à réunir, au point de vente, un groupe d'un certain nombre d'articles, qu'il soit vendu à l'utilisateur final ou au consommateur (par exemple trois sachets de purée dans une boîte), ou qu'il serve seulement à garnir les présentoirs aux points de vente (par exemple, pack de 6 bouteilles d'eau). Il peut être séparé des marchandises qu'il contient ou protège sans en modifier les caractéristiques de conservation.

-L'emballage de transport ou **emballage tertiaire**, c'est-à-dire l'emballage conçu de manière à faciliter la manutention et le transport d'un certain nombre d'articles ou d'emballages secondaires, en vue d'éviter leur manipulation physique et les dommages liés au transport. Le plus souvent, c'est une palette avec une housse plastique qui regroupe plusieurs colis.

### **I.3. Fonctions de l'emballage**

Tous les emballages répondent à des fonctions précises qui n'ont guère varié dans leur principe, mais qui connaissent une importance croissante dans notre vie quotidienne :

- ✓ Une fonction de contenant : l'emballage est avant tout un récipient, associé à des servitudes métrologiques réglementaires (obligation de l'indication exacte de la masse ou du volume contenu).
  
- ✓ Une fonction de présentation, visant à retenir l'attention et à séduire l'acheteur dans le linéaire de distribution (c'est la fonction qui intéresse les services « marketing »).

- ✓ Une fonction d'information, par l'étiquetage, de plus en plus importante, associée à des servitudes réglementaires quant aux types d'informations et à la loyauté des renseignements donnés.
- ✓ Une fonction de service, dans la mesure où l'emballage apporte un service spécifique : flacon pulvérisateur, flacon saupoudreur, boîte auto –chauffante, etc. La notion de service s'étend également à la commodité d'emploi, notamment à la facilité d'ouverture sans outils particulier. On pourrait inclure dans cette fonction de service une fonction de réutilisation, de nombreux emballages connaissant un second usage, parfois imprévu ; réutilisation parfois utilisée comme argument de vente (on pense au verre à moutarde, par exemple).
- ✓ Une fonction de sécurité alimentaire : protection vis-à-vis d'une contamination ou d'une population délictueuse (fraude, vol par substitutions, malveillance, etc.).
- ✓ Une fonction de conservation et de protection de la qualité du produit alimentaire contre les agents extérieurs d'altération physico-chimiques et biochimiques des aliments associée à une obligation d'innocuité et d'inertie chimique de l'emballage lui-même vis-à-vis de son contenu [4,5] .

#### **I.4. Norme liée à la maîtrise de l'hygiène des emballages :**

Deux normes ISO 22000 et NF EN 15593 permet la certification des systèmes des entreprises, de manière respectivement de sécurité des denrées alimentaires et hygiène dans la fabrication des emballages.

#### **I.5. Matériaux d'emballages alimentaires**

L'industrie de l'emballage se compose de différents secteurs en fonction des matières utilisées :

- ✓ Le papier et le carton : incluant notamment le carton ondulé et le carton plat (par exemple boîtes de céréales) qui peuvent être recyclé, blanchie ou non blanchie.
- ✓ Le verre : transparent et coloré.
- ✓ Le métal : canettes métalliques, boîte de conserve.
- ✓ Les contenants multicouches et composites : comme le carton de jus, de lait, de crème glacée en carton paraffine.

- ✓ Le bois : utilisé pour certains emballages de fromage, ou certaines boîtes contenant des bouteilles d'alcool.
- ✓ Le plastique (PE, PP, PET... selon la composition des polymères) : contenant d'eau de source, de boissons gazeuses, contenants alimentaires [6].

L'emballage plastique est résistant, il évite ainsi des pertes de produit, des risques de dommages pour l'aliment qu'il protège. Il s'est adapté aux cadences de conditionnement de l'industrie agroalimentaire et aux modes de distribution des produits. Les différents matériaux les plus utilisés sont : PET, PS, PP [7].

## **I.6. Essai de contrôle de qualité de l'emballage plastique**

### **I.6.1. Contrôle de la qualité microbienne de l'emballage alimentaire**

L'évaluation de la qualité microbiologique des matériaux mis au contact des aliments demeure un problème complexe car il convient d'une part, de connaître sa signification dans l'ensemble emballage – produit et d'autre part de déterminer son origine ainsi que les moyens éventuels de décontamination à mettre en œuvre [8]. Les emballages peuvent être responsables de contaminations chimiques, physiques, mais aussi microbiologiques des denrées alimentaires. A ce jour, il n'existe aucun texte réglementaire fixant des critères microbiologiques pour les emballages, et la réglementation des matériaux pour contact alimentaire ne statue que sur les contaminations chimiques par migrations.

Certains industriels du secteur agroalimentaire établissent des cahiers des charges fixant des limites de contamination de leurs productions via l'emballage, et imposent des critères microbiologiques à respecter par leurs fournisseurs.

Afin d'évaluer la contamination de leurs produits, les industriels de l'emballage ont à leur disposition les différentes techniques classiques de contrôle de l'hygiène.

La signification de la charge microbienne portée par l'emballage doit être prise en considération lorsque le produit est lui-même très pauvre en germes, ou lorsque des contaminants s'avèrent capables de coloniser certaines parties de l'aliment (exemple de moisissures se développant en surface sous les opercules de fromages frais ou yaourts).

### **I.7. Interaction physico- chimiques Emballage / Aliment**

Les emballages alimentaires sont rarement inertes. L'interaction entre le contenant et le contenu peut aboutir à des transferts de matière. Ces phénomènes sont susceptibles d'altérer la qualité

de l'aliment, de détériorer les propriétés mécaniques de l'emballage et de causer des problèmes toxicologiques [9].

Trois types d'interactions sont possibles entre l'emballage et l'aliment : la perméation, la sorption et la migration.

### **I.7.1. Perméation**

La perméation se caractérise par le transfert de gaz à travers l'emballage, notamment l'O<sub>2</sub> vers l'aliment, le CO<sub>2</sub> vers l'extérieur de l'emballage et le passage des composés volatils de l'extérieur vers l'aliment.

Ce phénomène doit être réduit afin d'éviter la prolifération des bactéries dans l'aliment, les pertes de carbonatation dans les boissons gazeuses, la perte des arômes ou de flaveur dans le produit fini. En effet, les propriétés organoleptiques des aliments résultent d'un équilibre entre les composés volatils qui sont susceptibles de se transférer du produit vers l'extérieur (perte d'arômes) et les substances susceptibles de passer de l'extérieur vers l'aliment (contamination de produit) [10].

### **I.7.2. Sorption**

La sorption est l'assimilation des constituants de l'aliment par la paroi l'emballage plastique suivie de leur pénétration dans le polymère. Le processus de sorption peut induire une perte des arômes de l'aliment et entraîner une modification structurale du polymère.

En effet, le vieillissement irréversible du polymère peut être induit par des modifications de la structure chimique des chaînes macromoléculaires et de son état physique.

Les phénomènes de sorption sont plus fréquents avec des composés lipophiles, cela est dû à la grande affinité pour la plupart des emballages qui sont aussi peu ou pas polaires (PE, PET, PS, PP).

De plus, si le matériau plastique est recyclé ou réutilisé comme emballage destiné au contact alimentaire, les composés étrangers absorbés dans le polymère sont des éventuels migrants [10].

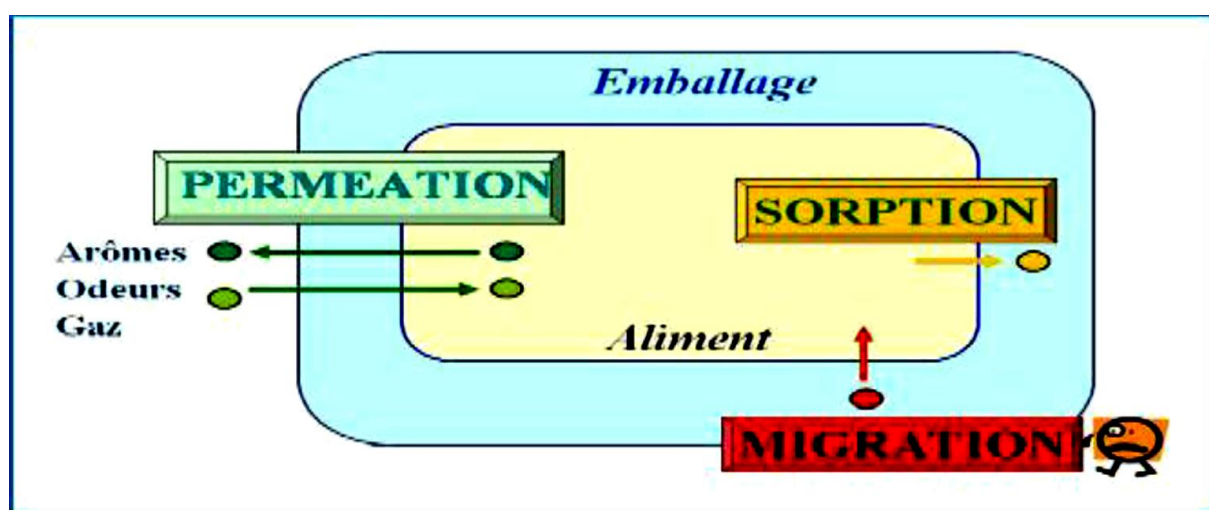
### **I.7.3. Migration**

La migration des constituants de l'emballage (monomères résiduels, additifs, néoformés, etc.) vers le produit conditionné est un autre type d'échange de matière qui constitue un problème de sécurité alimentaire.

La migration peut se définir comme le transfert de matière d'une source externe vers l'aliment. De façon générale, ce transfert de matière peut se produire pendant la production, le transport, le stockage, la cuisson ou même pendant la consommation de l'aliment [11].

Le processus de migration de l'emballage polymérique vers le produit fini peut être décrit en trois étapes étroitement liées entre elles. Ces étapes sont les suivantes :

- La diffusion du migrant à travers le polymère gouvernée par le coefficient de diffusion ( $D$ ).
- La solvataion de l'interface polymère / aliment contrôlée par le coefficient de partage ( $K$ ).
- La dispersion de la molécule diffusante dans l'aliment qui dépend de la solubilité et du coefficient de diffusion [12].



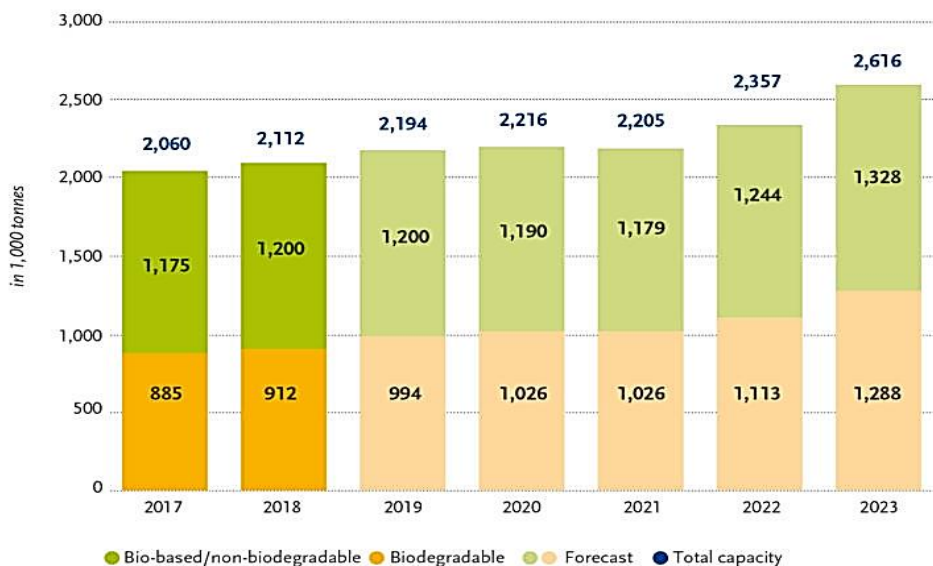
**Figure I.1.** Transfert de la matière entre aliment et emballage.

Depuis la découverte du pétrole, la production des matériaux plastiques augmente chaque année, mais leur caractère polluant a altéré le système écologique. L'impact de ces matériaux sur l'environnement a incité les scientifiques à la recherche de nouvelles alternances pouvant diminuer l'utilisation massive de ressources fossiles. C'est ainsi qu'apparaît de nouveaux matériaux issus de la biomasse. Ces derniers possèdent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'industrie plastique... [13,14]. Ce sont les biopolymères ou polymères biosourcés [15].

Le marché des plastiques biosourcés et / ou biodégradables comme le montre la figure (I.2) est en constante évolution. Il est notamment porté depuis plusieurs années par les importantes évolutions des capacités de production des polymères biosourcés et non biodégradables. Avec 2,1 millions de tonnes de capacité de production en 2018, les bioplastiques représentent ainsi

environ 0,75 % du marché mondial des polymères. Presque la moitié de cette quantité concerne la production de polymères biodégradables, quelle que soit leur origine [16].

### Global production capacities of bioplastics



Source: European Bioplastics, nova-Institute (2018)  
More information: [www.european-bioplastics.org/market](http://www.european-bioplastics.org/market) and [www.bio-based.eu/markets](http://www.bio-based.eu/markets)

**Figure I.2.** Capacité globale de production des bioplastique [16].

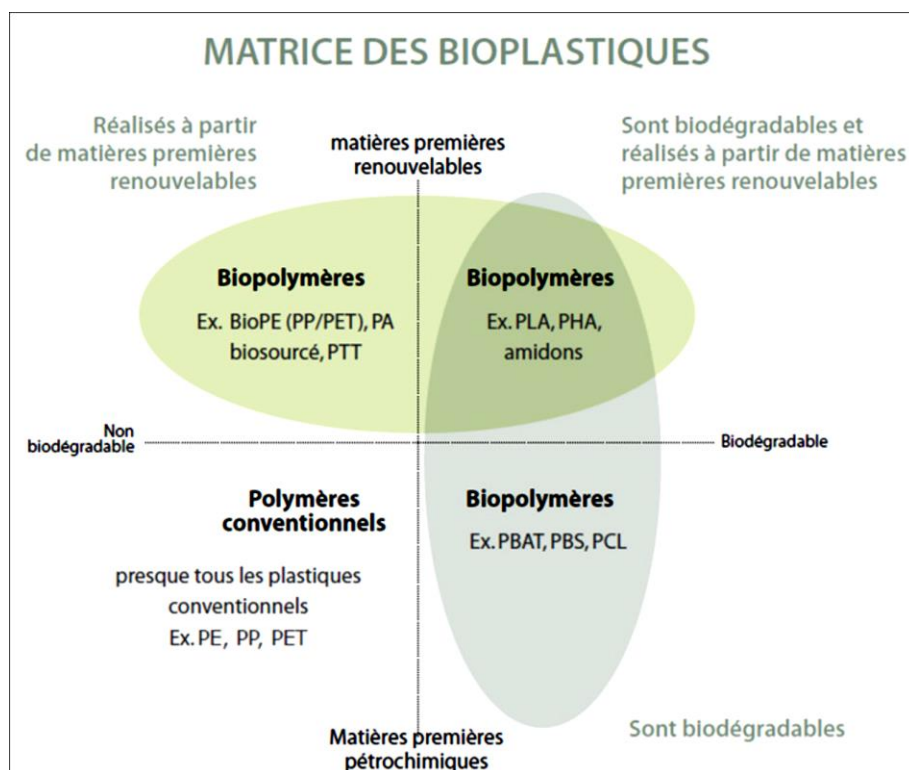
## I.8. Bioplastiques

### I.8.1. Définition des biopolymères (bioplastiques)

Les biopolymères sont des polymères issus exclusivement d'organismes vivants ou de polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables. Ils sont d'origine biologique et ont un caractère biodégradable [17].

### I.8.2. Classification des bioplastiques

Les bioplastiques peuvent être catégorisés selon plusieurs critères. Ils peuvent entre autres être classifiés selon leurs compositions chimiques, leurs méthodes de synthèse, leurs procédés de fabrication, leurs importances économiques ou leurs applications. Une classification selon l'origine des ressources (renouvelables ou non renouvelables) et la gestion en fin de vie (biodégradable ou non biodégradable) a également été couverte précédemment et est présentée par la figure I.3.



**Figure I.3.** Matrice des bioplastiques [16].

### I.8.3. Application des biopolymères dans l'emballage alimentaire

Les biopolymères présentent des propriétés intéressantes pour les applications dans le domaine de l'emballage. À part leur fonction première de protection des produits, les biopolymères offrent aux emballages d'autres fonctions grâce à leurs propriétés intrinsèques. On peut citer, par exemple, leur perméabilité à la vapeur d'eau intéressante pour emballer les produits frais comme les fruits et les légumes [18].

Des bioplastiques des quatre groupes de la figure I.4 sont utilisés comme matériaux afin de produire une gamme très diversifiée d'emballages alimentaires. Des bouteilles, des sacs, des boîtes, des contenants rigides et des plateaux sont quelques-unes des nombreuses applications actuelles. Afin de répertorier des exemples représentatifs du marché actuel, certains des plus gros fournisseurs de bioplastiques sont présentés dans les sections suivantes ainsi que des applications de leurs produits dans le domaine de l'emballage alimentaire. Cette méthodologie est bien adaptée au marché actuel de l'emballage qui est très concentré. Les 5 plus gros producteurs de bioplastiques fournissent plus de 50 % de l'industrie dans ce créneau [19].

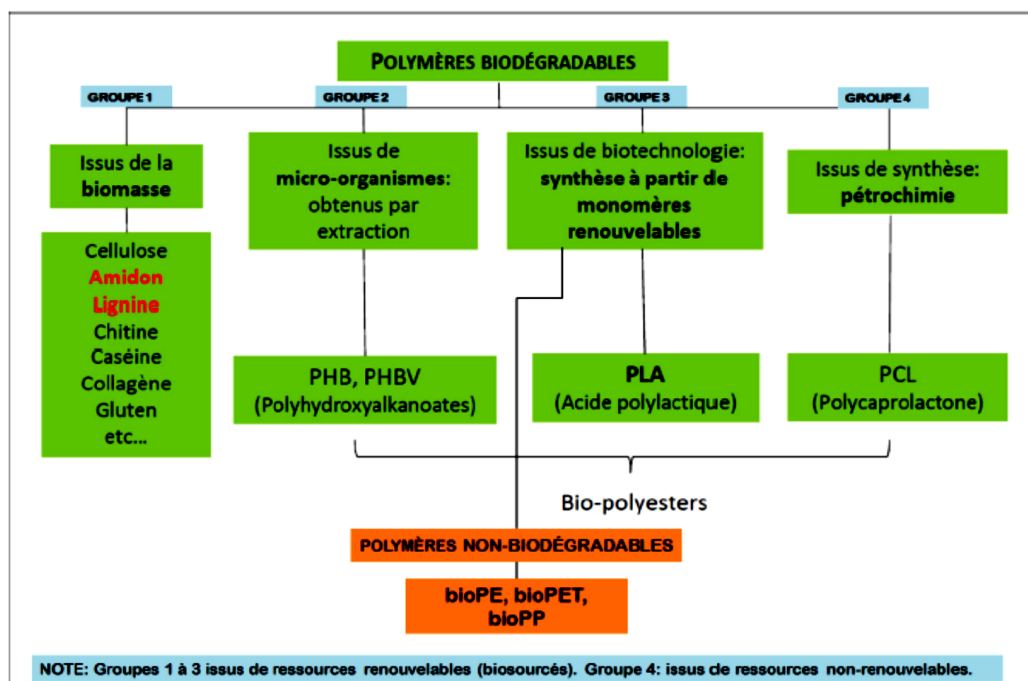


Figure I.4. Classification des bioplastiques [20].

Les bioplastiques obtenus par synthèse à partir de monomères renouvelables peuvent être regroupés en deux sous-groupes. Les bioplastiques biodégradables comme l'acide polylactique (PLA) et les bioplastiques non biodégradables qui comprennent par exemple le polyéthylène biosourcé (BioPE).

### I.9. L'acide polylactique

Le PLA qui fait partie du premier sous-groupe est le bioplastique le plus utilisé pour l'emballage. Le PLA est fabriqué à partir d'acide lactique qui provient de la fermentation du maïs, de la canne à sucre ou de la betterave [21]. Bien que plusieurs sources de biomasse puissent être utilisées, le maïs a l'avantage de procurer le haut niveau de pureté d'acide lactique requis. Le potentiel de substitution du PLA aux plastiques traditionnels d'origine fossile tels que le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le Polystyrène (PS) ou le polyéthylène téréphtalate PET est élevé dû à ses propriétés physiques et chimiques [22]. Sa stabilité au niveau de la température et ses aptitudes de transformation sont similaires au PS tandis que sa résistance aux huiles et graisses ainsi que ses propriétés barrières aux saveurs sont comparables au PET [23]. Le PLA est bien adapté à plusieurs des méthodes conventionnelles de transformation des produits thermoplastiques telles que l'extrusion et l'injection [21]. Le lactide est le monomère qui provient de l'acide lactique qui est utilisé pour produire le matériau. Les monomères s'unissent par polymérisation pour former le PLA. Il y a de nombreuses



applications au niveau de l'emballage alimentaire pour ce bioplastique comme le montre la figure (I.5), dont des bouteilles et des contenants de toutes sortes. Le couchage du PLA sur le carton permet également la fabrication des boîtes pliantes qui sont composables et particulièrement utiles pour des applications où l'emballage est souillé par les aliments. L'ensemble produit / contenant peut ainsi être composté dans des installations industrielles ou municipales sans tri préalable.



**Figure I.5.** Exemple d'application du PLA dans l'emballage alimentaire.

L'acide poly lactique est bien connu pour sa facilité de mise en œuvre, sa biocompatibilité et sa biodégradabilité. Il présente différentes propriétés chimiques et physiques en raison de sa chiralité ainsi en faisant varier sa composition et sa masse molaire, une large gamme de propriétés physiques et mécaniques peut être obtenue.

### **I.9.1. Propriétés thermiques**

La température de transition vitreuse du PLA est située entre 58 et 62 °C ; celle de fusion est aux alentours de 148 et 151 °C. Ces températures sont en fonctions de la composition monomérique initiale (flexibilité et géométrie moléculaires, forces intermoléculaires), du poids moléculaire du PLA ainsi que du pourcentage ou teneur de D-lactique incorporé dans le polymère [24]. En effet les molécules du PLA semi-cristallin présentent un certain arrangement ce qui réduit leur flexibilité et augmente les forces intermoléculaires, ceci a comme conséquence une transition vitreuse et une température de fusion plus élevée, comparés au PLA amorphe, dont la structure moléculaire est relativement faible [25].

Parmi les différents PLA commerciaux existant, le PLA contenant un faible taux d'acide D-lactique présente une température de fusion autour de 150°C et une température de transition vitreuse vers 65 °C. Les PLA homopolymères ont une température de fusion vers 180 °c et une enthalpie de 40 à 50 J / g [26].

### I.9.2. Propriétés physiques

Les propriétés physiques des matériaux polymères sont très importantes car elles reflètent la structure hautement ordonnée du polymère et influencent sur les propriétés mécaniques comme les propriétés élastiques, la résistance à la traction, la contrainte ...

Ces propriétés dépendent des structures ordonnées de ces matériaux polymères telles que l'épaisseur cristalline, la cristallinité, la taille des sphérolites et le degré de l'orientation de la chaîne [27].

Les principales propriétés physiques du PLA sont données dans le tableau I.1.

**Tableau I.1.** Principales propriétés physiques du PLA [28].

Propriétés	Valeur
Masse molaire (g /mol)	100 000 à 300 000
Température de transition vitreuse (°C)	50-70
Température de cristallisation (°C)	110
Point de fusion (°C)	130-215
Cristallinité (%)	10-40
Energie de surface (dynes)	38
Densité	1,25
Paramètre de solubilité ( $J^{0.5} \text{ cm}^{-1.5}$ )	19-20,5
Perméabilité à la vapeur d'eau (g /m <sup>2</sup> /jour)	172
Indice de fluidité à chaud (g/ 10 min)	2-30

### I.9.3. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de l'acide poly lactique(PLA) peuvent aller du plastique élastique aux matériaux rigides. Pour de meilleures propriétés mécaniques, le PLA semi-cristallin est souvent préféré au polymère amorphe. La masse molaire du polymère ainsi que le degré de cristallinité ont une influence significative sur les propriétés mécaniques [27] .

Dans plusieurs types de PLA, les propriétés mécaniques avoisinent celles de certains polymères tels que le polystyrène (PS) et le polyéthylène téréphtalate (PET) (tableau I.2).

Le PLA présente des propriétés mécaniques relativement bonnes avec :

- Un module d'élasticité de l'ordre de 2 à 4 GPa.
- Une résistance à la traction allant de 50 à 70 MPa.
- Contrainte à la rupture 40-60MPa.
- .Résistance à l'élongation.

Cependant son allongement à la rupture faible limite son utilisation [29].

**Tableau I.2.** Propriétés mécaniques de quelques polymères [29].

Polymère	Contrainte à la rupture [MPa]	Allongement à la rupture [%]	Module de Young [GPa]	Température maximale d'utilisation [°C]
<b>PLA</b>	40-60	4-7	2.0-4.0	50-60
<b>PET</b>	69	300	2.8-4.1	204
<b>PS</b>	41-52	3	3.1	78
<b>LDPE</b>	6-17	-	0.1-0.2	65
<b>HDPE</b>	20-37	-	-	121
<b>PA6</b>	62-83	-	1.2-2.8	-
<b>PP</b>	33-38	-	1.1-1.5	121

### I.9.4. Biodégradation de l'acide poly lactique

Le PLA se dégrade facilement dans l'environnement dans une période de six mois voire deux ans au maximum contrairement aux plastiques conventionnels tel que le PE et PS qui prennent une période de 500 voire 1000 ans [30].

La dégradation des polymères se produit principalement par scission des chaînes principales ou des chaînes latérales des macromolécules. Elle est généralement induite par :

- ❖ Activation thermique.
- ❖ Activité biologique (enzymes).
- ❖ Oxydation.
- ❖ Photolyse ou radiolyse.
- ❖ Hydrolyse.

Le PLA dégradé par l'hydrolyse de la liaison ester ne nécessite pas la présence d'enzymes pour catalyser cette hydrolyse. Le taux de dégradation dépend de quelques paramètres tels que : la taille et la forme de l'article, la température d'hydrolyse, l'humidité, la salinité et la présence ou absence d'oxygène [30,31].

**Bibliographie**

- [1] : Birck C. (2014). Conception et caractérisation de films antibactériens à base de poly (alcool vinylique) pour l'emballage à contact alimentaire, Université de Lille 1, France.
- [2] : Mansouri M. (2017). Etude des propriétés thermiques et mécaniques des biopolymères sous faisceau d'électrons, thèse de doctorat. Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen.
- [3]: Khodayri M, Basti AA, Khanjari A, Misaghi A, Kamkar A, Shotorbani PM, Hamedi H. (2018). Effect of poly (lactic acid) films incorporated with different concentrations of Tanacetum balsamita essential oil, propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages. *Food packaging and shelf life*, 19, 200-209.
- [4] : Aboutayeb R. (2011). Emballages alimentaires, sciences et techniques des industries agroalimentaires.
- [5] : Bureau G, Multon JL. (1989). Emballage des denrées alimentaires de grande consommation. Edition Lavoisier, 4.
- [6] : CETIM, 2005. Matériaux au contact des aliments : Réglementation, CETIM 2A32, 3ème édition, France, 131.
- [7] : Chrystelle I, al. (2013). Fin de vie des emballages plastiques alimentaires. Dossier, 2013.
- [8] : Aboutayeb R. (2011). Emballages alimentaires, sciences et techniques des industries agroalimentaires.
- [9] : Prud'homme V, Caont JM. (2012). Guide d'écoconception à l'usage des professionnels de l'emballage et conditionnement.
- [10] : Sax I. (2010). Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 118, 445-448.
- [11]: Simoneau C. (2008). Chapter 21. Food Contact Materials, 733-773.
- [12]: Shipe et al. (1983). Use of pigments in plastic containers to reduce light induced changes of milk nutrients and flavor. *Journal of Dairy science*.
- [13]: Lim L.T, Auras RA, Rubino M. (2008). Processing technologies for poly (lactide). *Progress Polymer Science*, 33, 820-852.
- [14]: Ichikawa T. (1995). Mechanism of radiation-induced degradation of poly (methyl methacrylate)-temperature effect. *Nuclear Instruments and Methods in physics Research Section B*, 105, 150-153.
- [15] : Guiot-Hacquard O. (1998). Réticulation sous faisceau d'électrons de films de polyéthylène Bi-orientés, thèse de doctorat, Université Lille, Lille/France.

- [16] : Lapointe R. (2012). Bioplastiques biodégradable, compostables et biosourcés pour les emballage alimentaire, distinctions subtiles mais significatives, thèse en vue d'obtention du grade de maitre en envirenement, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- [17]: Gontard SGN. (2005). Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials. Physical and mechanical characteristics, in Innovations in Food Packaging. Elsevier Academic Press, 263-27.
- [18]: Petersen K, Vaeggemose NP, Bertelsen G, Lawther M, Olsen MB, Nilsson NH, Mortensen G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. Trends in Food Science Technology, 10, 52–68.
- [19] : Lachance M. (2011). Les bioplastiques : marchés et opportunités d'affaires. Colloque québécois sur les bioplastiques compostables, Sherbrooke.
- [20] : Legros N, Chaplea N, Li H. (2011). La plasturgie et les matériaux biosourcés. Colloque québécois sur les bioplastiques compostables, Sherbrooke.
- [21]: Yu L. (2009). Biodegradable Polymers Blends and Composites from Renewable Ressources. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc, 487.
- [22]: Yezza I. (2012). Biodegradable Plastics – PaperBoard Applications, Innovations and Trends. Présentation à Cascades Sonoco, Kingsey Falls.
- [23]: Kale G, Kijchavengkul T, Auras R, Rubino M, Selke SE, Singh SP. (2007). Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. Macromolecular Journals, 3, 255-277.
- [24]: Fang Q, Hanna MK, Rheological properties of amorphous and semi crystalline poly lactic acid polymers, Industrial Crops and Products, 10, 47-53.
- [25]: Kricheldorf HR, Kreiser I, Polylactones (1987). Transesterification of Poly (Lactide) with poly(Glycolide), Poly ( $\beta$ -Propio-Lactone), and Poly [ $\epsilon$ -Caprolactone) .Journal of Macromolecular Science, Part A, Chemistry, 13, 1345-1356.
- [26]: Lima LT, Auras R, Rubino M. (2008). Processing technologies for poly (lactic acid). Progress in polymer science, 33, 820-852.
- [27]: Maharana T, Mohanty B, Negi YS. (2009). Melt–solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability, Progress in Polymer Science, 34, 99-124.
- [28]: Ronasi S. (2012) .Etude d'élaboration des mélanges de matériaux bio-sourcés à base d'amidon plastifié et de poly(acide lactique) et de leur compatibilisation, these de doctorat, université de lorraine
- [29]: Södergard A. (2000). Lactic acid based polymers for packaging materials for the

Food Industry. The Food Bio-packaging Conference, Copenhagen, Denmark, 27-29.

[30]: Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9, 63-84.

[31]: Muller R. (2008). *Biodegradability of polymers: Regulations and methods of testing, Biopolymers, General Aspects and Special Applications*, Wiley Publishers, 366-388.

## *Chapitre II*

### *Généralités sur la Propolis*



## Chapitre II. Généralités sur la Propolis

### II.1. Généralités sur la propolis

La propolis (figure II.1) est une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques de consistance visqueuse recueillies par les abeilles sur certaines parties des plantes principalement les bourgeons et les écorces de certains arbres [1]. En malaxant ces résines et gommages avec leur propre cire et leur sécrétion, elles produisent de la propolis [2].

La propolis est utilisée par l'abeille comme matériaux de scellement pour fermer les espaces ouverts ou les fissures se produisant dans leurs ruches [3,4]. Les abeilles utilisent la propolis non seulement pour protéger leurs ruches ; en bouchant les fissures, en scellant les espaces et en lissant les parois internes, mais elles s'en servent également comme antiseptique [5,6] pour protéger les larves d'abeilles, les réservoirs de miel et le peigne des infections microbiennes [7,8]. Elle permet aussi de maintenir la température interne de la ruche autour de 35°C [9]. De même la propolis empêche l'entrée de l'eau dans la ruche qui maintient une humidité constante et sert également à contrôler le flux d'air vers la ruche [10].



**Figure II.1** : La propolis brute.

### II.2. Récolte de la propolis

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses. Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie. Leur travail se limite au colmatage à l'intérieur de la ruche [11].



**Figure II.2.** Récolte de la propolis par l'abeille.

La propolis est également récoltée par l'homme selon deux techniques diverses, la première technique consiste à racler et gratter les cadres ou les parois de la ruche, de préférence à température assez basse, la propolis dure et friable se détache alors mieux [12].



**Figure II.3.** Récolte de la propolis par l'homme (grattage des cadres).

La deuxième technique se base sur l'utilisation de différents dispositifs comme les grilles moulées en matière plastique ou en métal, les grilles sont posées au-dessus des ruches comme couvercles, les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis [13].



**Figure II.4.** Récolte de la propolis par l'homme (grilles moulées).

### II.3. Propriétés physiques de la propolis

- **Consistance** : Dure et cassante à froid, mais devient molle, souple, caoutchouteuse et très collante à chaud [14] ;
- **Odeur** : Aromatique caractéristique et agréable ;
- **Couleur** : Variant du jaune-vert, au rouge et au brun foncé en fonction de sa source et de l'âge de l'abeille [15,16] ;
- **Saveur** : Acre, piquante et parfois amère ;
- **Densité** : 1.2 ;
- **Solubilité** : Insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, acétone, benzène et l'éther [17].

### II.4. Composition de la propolis

La composition de la propolis varie quantitativement et qualitativement en fonction de nombreux facteurs, tels que :

- L'origine géographique et botanique ;
- Le moment et la méthode de la récolte ;
- Le solvant utilisé pour l'extraction [18].

La propolis contient plus de 500 composants, dont les composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques et leurs esters), des acides gras, des sucres, des éléments minéraux [19,20].

Leur pourcentage est le suivant :

- Résines et baumes végétaux 50% ;
- Cire d'abeille 30% ;
- Pollen 5 % ;
- Huiles essentielles et aromatiques 10 % ;
- Quelques autres substances contenant également des composés organiques 5% [21, 22,23].

### II.5. Substances bioactives de la propolis

#### II.5.1.Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié [24,25]. Ils sont présents dans les racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, légumes, graines, bois...etc., ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal [26].

Les flavonoïdes sont de très bons agents antimicrobiens [27].

### II.5.2.Acides aromatiques et dérivés

La propolis contient des acides aromatiques tels l'acide benzoïque, l'acide coumarique, l'acide cinnamique et l'acide caféique et surtout leur ester [28].

### II.5.3.Huiles essentielles

Les huiles essentielles aussi appelées huiles volatiles, sont des métabolites secondaires produit habituellement par les plantes aromatiques pour combattre les infections et les parasites, elles sont synthétisées en réponse à des conditions de stress [29], elles sont isolées par hydrodistillation ou par expression mécanique [30]. Elles sont présentes dans différentes parties de la plantes (feuilles, graines, bourgeons, fleurs, écorces, racines, tiges, fruits, et dans les gommés qui s'écoulent du tronc des arbres) [31]. Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes qui contiennent environ 200 composés (le cavacol, le thymol, l'eugénol, etc.) [32].

### II.5.4.Acides organiques

La propolis contient également des acides organiques comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide gallique. Ces composés ont des propriétés conservatrices, antiseptiques et anti-inflammatoires [33].

### II.5.5.Vitamines et oligoéléments

La propolis contient les vitamines B1, B2 (complexe), B6, C et E [34]. Elle contient la majorité des oligoéléments et des minéraux tels que : magnésium, zinc, aluminium, fer, cuivre, silicium, strontium et le nickel [35].

## II.6.Activités biologiques de la propolis

En raison de la présence de composés bioactifs, la propolis présente des activités biologiques importantes, telles que les activités anti oxydantes, antimicrobiennes, anti-tumorales, anti-inflammatoires [36,37], antivirales [38], anti-protazoaire et antifongique [39,40].

### II.6.1. Activité antimicrobienne de la propolis

L'une des premières activités biologiques à être reconnue et probablement l'une des propriétés les plus importantes de la propolis est l'activité antimicrobienne, en particulier l'activité antibactérienne. La propolis a un effet significatif contre plusieurs bactéries telles que *Enterococcus spp*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* [41,42]. L'activité

antibactérienne est due aux composés actifs de la propolis tels que les composés aromatiques (acide caféique) et les flavonoïdes [43].

La propolis agit comme agent bactéricide, elle arrête la division des cellules bactériennes, détruit la paroi cellulaire et le cytoplasme bactérien [43].

### **II.6.2. Activité antioxydante**

De nombreuses maladies dégénératives liées au vieillissement, notamment le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète, résultent de dommages oxydatifs causés par les radicaux libres [44]. Ces substances sont des espèces chimiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés ; espèces hautement réactives et instables pouvant endommager des composants cellulaires, tels que les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Ils peuvent être piégés ou neutralisés dans le corps par des molécules et des substances anti-oxydantes ou enzymes anti-oxydants naturellement présents dans la propolis [45,46]. La propolis joue un rôle primordiale dans la neutralisation de ces radicaux grâce à ces propriétés anti oxydantes et sa richesse en polyphénols tels les acides phénoliques et flavonoïdes ce qui la rend le produit le plus actif des produits de la ruche en ce qui concerne cette propriété [46].

### **II.6.3. Activité anti-tumorale**

Les composants de la propolis possèdent des propriétés anti-tumorales [47]. Ces composés sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de transfert de maladies d'une partie du corps à une autre. D'autres composés tels que la galangine sont impliqués dans la prévention de la division rapide des cellules tumorales [40]. La propolis est capable d'arrêter la synthèse de l'ADN dans les cellules tumorales, et de provoquer le vieillissement de ces dernières [48]. L'effet anti tumoral de la propolis est dû à la fonction combinée de ses constituants poly phénoliques [49].

### **II.6.4. Activité antivirale**

La propolis comprend une complexité de composés qui lui confèrent des propriétés antivirales [50]. Les flavonoïdes et les dérivés d'acides aromatiques sont responsables de l'activité antivirale des extraits de propolis [15], en inhibant l'entrée du virus dans les cellules ou en perturbant la réplication virale [40].

### **II.6.5. Activité anti-protazoaire :**

Une autre propriété biologique importante déjà attribuée à la propolis est l'activité anti protozoaire [51]. Plusieurs publications ont rapporté l'effet et l'activité de la propolis sur les

protozoaires qui provoquent des maladies chez l'homme et les animaux tels que la giardiase [52], la maladie de Chagas, la leishmaniose [53] ainsi que d'autres maladies.

#### **II.6.6. Activité antifongique**

La propolis s'est montrée active contre plusieurs espèces fongiques [54,55]. Elle est active sur les champignons aflatoxigéniques et diminue la germination des conidies d'*Aspargillus flavus* [40]. L'effet fongicide de la propolis est associé à la présence des flavonoïdes et d'autres composés phénoliques [56].

#### **II.7. Applications de la propolis**

La propolis est actuellement utilisée dans de nombreuses applications et cela grâce à ses activités biologiques. Elle est utilisée notamment dans les préparations dermatologiques utiles dans le traitement des plaies, des furoncles et des dermatites [57, 34]. De plus, la propolis fait partie des compléments nutritionnels, des aliments sains ou des produits de médecine douce, tels que des bonbons ou du sirop, des barres de chocolats et des lotions pour la peau [58, 59].

La propolis est également utilisée dans les remèdes de maison [58, 60]. On la trouve ainsi dans le commerce sous formes de dentifrices, de pastilles, de bains de bouche, de crèmes, de gels, de sirops pour la toux, de savon, de gomme à mâcher et de comprimés [61, 43].

**Bibliographie**

- [1] : Harfouch RM, Mohammad R, Suliman H. (2016) .Activité antibactérienne de l'extrait de propolis syrien contre plusieurs souches de bactéries in vitro Mode. Journal of pharmacy & Pharmaceutical sciences, 6, 42 – 46.
- [2]: Marieke Mutsaers, Henkvan Blitter Swijk, Leen van't leven, Jaap Ker kvliet , Jan van de Waerdt (2005). Produits de l'apiculture propriétés, transformation et commercialisation. 1er édition.
- [3]: Ahmed R, Tanvir EM, Hossen MS, Afroz R, Ahmmed I, Rumpa NE, Paul S, Gan SH, Suleiman SA, Khalil MI. (2017). Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-11.
- [4] : Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Zeitschrift für Naturforschung C, 57, 530-533.
- [5]: Akbay E, Özenirler Ç, Çelemlı ÖG, Durukan AB, Onur MA , Sorkun K .(2017). Effects of propolis on warfarin efficacy Kardiochirurgia I Torakochirurgia Polska Polish .Journal of Cardiothoraci Surgery, 14, 43.
- [6]: Alonso-Salces RM, Cugnata NM, Guaspari E, Pellegrini MC, Aubone I, De Piano FG, Antunez K , Fuselli SR. (2017). Natural strategies for the control of Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review Apidologie, 1-14.
- [7]: Drescher N, Klein AM, Neumann P, Yañez O, Leonhard SD. (2017).Inside honeybee hives: impact of natural propolis on the ectoparasitic mite varroa destructor and viruses. Insects, 8, 15.
- [8]: Omar R, Igoli JO , Zhang T, Gray AI, Ebiloma GU , Clements CJ , Fearnley J , Ebel RE , Paget T , Koning HP De.(2017). The chemical characterization of Nigerian propolis samples and their activity against trypanosoma brucei. Scientific Reports, 7, 923.
- [9]: Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits .Oxidative Medecine and cellular Longevity.
- [10]: Afrouzan H, Zakeri S, Mehrizi AA , Molasalehi S , Tahghighi A , Shokrgozar MA , Es-haghi A , Djadid N.D .(2017). Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. Archives of Iranian Medicine, 20, 270-281.
- [11] :Segueni Narimane, (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis, thèse de doctorat, université Mensouri de Constantine.
- [12] : Lavie P. (1975). La propolis. Edition : Apimondia. Bucharest : 63-71 .

- [13]: Krell R. (1996). Value-Added products from beekeeping food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, FOA Agricultural services, Bulletin: 124.
- [14]: Hausen B, Wollenweber ME, Senff H, Post B. (1987). Propolis allergy II. The Sensitizing properties of one, 1-dimethylallyl caffeic acid ester. Contact Dermatitis, 17, 171-177.
- [15]: Marcucci MC. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26, 83-99.
- [16]: Bankova VS, Christov RS, Tejera AD. (1998). Lignans and other constituents of Propolis from the Canary Islands. Phytochemistry, 49, 1411-1415.
- [17]: Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto C, Cury JA, Rosalen P, Ikegaki M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red Propolis. Journal of Ethnopharmacology, 113, 278-283.
- [18]: Ratajczak I, Waskiewicz A, Wozniak M, Mrowczynska L, Rogozinski M. (2019). The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. Revista Brasileira de Farmacognosia.
- [19]: Melliou E, Stratis E et Chinou I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-antimicrobial activity. Food Chemistry, 103, 375-380.
- [20]: Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. Molecules, 19, 19610-19632.
- [21]: Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 2502-2516.
- [22]: Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. (2002). Analytical methods for quality control of Propolis. Fitoterapia, 73, 7-20.
- [23]: Burdock GA. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). Food and Chemical Toxicology, 36, 347-363.
- [24]: Harborne JB. (1989). Recent advances in chemical ecology. Natural Product Reports, 6, 85-109.
- [25]: Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Lavoisier / Tec & Doc, Paris, 300-398.
- [26]: Fritch H, Griesbach H. (1975). Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. Photochemistry, 14, 2437-2442.
- [27]: Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some Bacterial strains. Archives of Microbiology, 184, 271-278.



- [28] : Françoise Sauvager. (2012). Les produits de la ruche et la santé humaine .conférence donnée à la salle de Pétrarque de Montpellier, France, 12.
- [29] :Koroch AR, Juliani HR, Zygadlo JA. (2007). Bioactivity of Essential Oils and Their Components. Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Edition: Springer, Germany, 87-115.
- [3]: Kalembe D, Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10, 813-829.
- [31]: Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food and Microbiology, 94, 223-253.
- [32] :De Castro MDL, Carmona MMJ, Pérez VP. (1999). towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. Trends in analytical chemistry, 18, 708-716.
- [33]: Walker P, Crane E. (1998). Constituents of propolis. Apidologie, 18, 327-334.
- [34]: Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern time. Evidence-Based Complement and Alternative Medicine .
- [35]: Ferhoum F. (2010). Analyses physicochimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeilles locales (*Apis mellifica intermissa et apis mellifica sahariensis*), Mémoire de Magister, université M'hamed Bougara Boumerdes.
- [36] : Tiveron AP, Rosalen PL, Franchin M, Lacerda RCC, Bueno-Silva B, Benso B. (2016). Chemical characterization and antioxidant, anti-inflammatory activities of south brazilian organic propolis. PLOS One, 11 (11).
- [37] : DC Zancanela, RD Herculano, CS Funari, CM Marcos, AMF Almeida, AC Guastaldi. (2017). Physical , chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane .Materials Letters, 209, 39 – 42.
- [38]: Sforcin M, Bankova V , Kuropatnicki AK. (2017). Medical Benefits of Honeybee Products. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2017, 1-2.
- [39] : Rajpara S , Wilkinson MS , King CM , Gawkrödger DJ , anglais JS , Statham BM , Green C , Sansom JE , Chowdhury MM , Horne HL .( 2009). L'importance de la propolis dans les tests de patch - enquête multicentrique Contact Dermatitis, 61, 287 – 290.
- [40] : Sforcin JM.(2016). Biological properties and therapeutic application of propolis. Phytotherapy Research , 30, 894 – 905.

- [41] : AL-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y et Salom K. (2012). Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans isolates in single and polymicrobial cultures. *International Journal of medical sciences*, 9, 793-800.
- [42] : Silici S, Kutluca S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal Ethnopharmacology*, 99, 69 – 73.
- [43] : Parolia A, Thomas MS, Kundabala M, Mohan M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of medicine and medical sciences*, 2, 210 – 215.
- [44] : Aljadi AM, Kamaruddin MY. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513 – 518.
- [45] : Mouhoubi –Tafinine Z, Ouchemoukh S, Tamendjari A. (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial crops and products*, 88, 85-90.
- [46]: Volpi N, Bergonzini G. (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 354 - 361.
- [47] : Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K. (1998). Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detection Prevention*, 22, 506 – 515.
- [48]: Wagh VD. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*.
- [49] : Sforcin J. (2007). Propolis and the immune system : a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 1-14.
- [50] : Fokt H, Pereira A, Ferreira A, Cunha A, Aguiar C. (2010). How do bees prevent hive infections ? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1, 481 – 493.
- [51] : Torres D, Hollands I, Palacios E. (1990). Efecto de un extratoalcoholico de propolis sobre el crecimiento de Giardia lamblia in vitro. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*, 21, 9-15.
- [52] : Freitas SF, Shinohara L, Sforcin, JM, Guimarães S. (2006). In vitro effects of propolis on Giardia duodenalis trophozoites. *Phytomedicine*, 13, 170 -175.
- [53] : Duran G, Duran N, Culha G, Ozcan B, Oztas H, Ozer B. (2008). In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on Leishmania tropica : a preliminary study. *Parasitol Res*, 102, 1217 – 1225.

- [54]:Aghel S, Pouramir M, Moghadamnia AA, Moslemi D, Molania TL, Ghassemi L, Motalebnejad M. (2014). Effect of Iranian propolis on salivary total antioxidant capacity in gamma –irradiated rats. *Journal of Dental Research, Dental clinics, Dental Prospects*, 8, 235-239.
- [55] : Franchin M, Cólón DF, Castanheira FV , da Cunha MG , Bueno-Silva B, Alencar BM , Cunha TM et Le Rosalen PL.(2016). Vestitol isolated from Brazilian red propolis inhibits neutrophils migration in the inflammatory process : elucidation of the mechanism of action. *Journal of Naural Produts* , 79, 954 – 960.
- [56] : Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AEE. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics Molecular Research*. 2009, 8, 635-640.
- [57] : Castaldo S, Capasso F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine .*Fitoterapia*, 73, S1 - S6.
- [58] :Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R , Garibay-Escobar A , Galvez-Ruiz JC , Salas-Reyes M , Jimenez-Estrada M , Velazquez-Contreras E , Hernandez J et Velazquez C .(2012).Seasonal effect on chemical composition and biological activities of sonoran propolis . *Food Chemistry*, 131, 645 – 651.
- [59] : Ferreira JM, Fernandes-Silva CC, Salatino A, Negri G et Message D. (2017). New propolis type from north –east Brazil : chemical composition, antioxidant activity and botanical Origin .*Journal of the science of Food Agriculture*.
- [60]: Wagh VD. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials . *Advances in Pharmacological Sciences*.
- [61] : Chandna P, Adlakha VK, Das S, Singh S. (2014) .Complementary and Alternative Medecine (CAM) : a review of propolis in dentistry .*Technology* 4, 6.

## *Chapitre III*

### *Revue Bibliographique*

### ***Chapitre III. Revue Bibliographique***

Plusieurs études ont été menées dans le but de prolonger la durée de vie des produits alimentaires. C'est pourquoi de nouvelles tendances, telles que les films biodégradables et les emballages actifs, ont été introduites. Elles impliquent les interactions entre les emballages et les aliments emballés par l'incorporation de certains additifs dans un film d'emballage ou dans des récipients d'emballage.

De nombreux auteurs ont étudié l'effet des films d'emballage à base de l'acide poly lactique (PLA) incorporé avec une substance naturelle active tels que la propolis, ces films bioactifs innovants incorporant des agents antimicrobiens ont récemment été développés pour la conservation des aliments.

La présentation de ces travaux sera faite en ayant le souci de regrouper les résultats, selon l'influence que certains facteurs peuvent avoir sur les films d'acide poly lactique et extrait éthalonique de propolis.

**Valérie Guillard et al. (2010) :** Ont étudié la diffusivité de composés de propolis dans un polymère d'acide poly lactique pour le développement de films d'emballage antimicrobiens.

Ce travail avait pour objectif d'étudier le système PLA / propolis et la migration de la propolis dans un liquide simulant un aliment (FSL). Ce système de libération antimicrobien / antioxydant pour les applications d'emballage alimentaire a été réalisé par incorporation de propolis dans un film d'acide poly lactique (PLA). La composition des films a été modifiée en ajoutant du polyéthylène glycol (PEG) et de la bentonite de calcium (CB) à la solution de coulée de PLA initiale.

La cinétique de diffusion de quatre polyphénols différents contenus dans la propolis a ensuite été mesurée expérimentalement dans deux liquides de simulation d'aliments (FSL) différents : l'eau et l'éthanol. L'eau et l'éthanol ont été choisis comme deux liquides présentant des caractéristiques de polarité et de solubilité différentes.

Les résultats de cette étude suggèrent que l'incorporation de propolis dans le PLA pourrait fournir un système de livraison possible pour les applications d'emballage alimentaire.

**Hassan Hamedi et al. (2018)** : ont étudié l'effet de l'huile essentielle de *Tanacetum balsamita*, d'extrait éthanolique de propolis et de nanocristaux de cellulose sur la prolongation de la durée de conservation des saucisses cuites emballés sous vide dans films d'acide poly lactique.

L'addition de la CNC a considérablement augmenté les propriétés mécaniques du composite de PLA et cet effet a été accentué en présence du PEE et le TBE. Les effets inhibiteurs in vitro des films de PLA ont été significativement affectés par l'ajout de TBE ( $p < 0,05$ ), alors que les films de PLA contenant uniquement du PEE et / ou de la CNC ne pouvaient pas empêcher la croissance des bactéries. Il a été constaté que les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles aux films de PLA que les bactéries à Gram négatif et *B. Cereus* est la bactérie la plus sensible aux films contenant du TBE et du PEE. Tous les films contenant du TBE ont montré des effets antibactériens significatifs contre APC, LAB et psychrotrophe par rapport au PLA vierge.

Cette étude a démontré l'efficacité antimicrobienne des films préparés et leur capacité à prolonger la durée de conservation des saucisses cuites pendant 50 jours de stockage réfrigéré.

**Pablo Ulloa et al. (2018)** : ont étudié le développement des films d'acide poly lactique avec la propolis comme une source de principes actifs. La biodégradabilité, propriétés physiques et fonctionnelles ont été étudiées.

Des films actifs (AF) utilisant de l'acide poly lactique (PLA) en tant que matrice polymère contenant diverses concentrations de propolis (5, 8,5 et 13%) en tant qu'agent actif (AA) ont été développées à l'aide d'une méthode de moulage. Le but était de déterminer les effets de l'incorporation d'AA sur les propriétés physiques des films et d'évaluer les activités antioxydantes et antimicrobiennes. La résistance à la traction et le module d'élasticité des AF ont diminué par rapport au témoin (PLA sans AA). L'introduction des substances actives de la propolis dans le PLA a également eu une incidence sur ses propriétés thermiques (transition vitreuse). L'ajout d'AA au polymère a généré plus d'opacité avec une couleur vert-jaunâtre par rapport au témoin. De plus, les AF présentaient une perméabilité à la vapeur d'eau réduite lorsque la concentration en AA augmentait.

L'incorporation de constituants naturels, tels que la propolis est une stratégie utile pour le développement d'emballages actifs ayant des effets antioxydants et antimicrobiens. De plus, cette technique devient une méthode très prometteuse pour étendre la durée de conservation des produits alimentaires conforme aux préférences des consommateurs pour des produits alimentaires plus naturels avec peu ou pas de conservateurs et emballage durable.

**Alireza Ashori et al. (2017)** : ont étudié l'évaluation de l'activité antibactérienne de composites de nanofibres de cellulose et d'acide poly lactique enrobés d'extrait éthanolique de propolis.

En premier lieu, la composition chimique de l'EEP a été étudiée afin de déterminer les principaux composés. Les composites ont ensuite été préparés à l'aide de la méthode de coulée au solvant. L'efficacité de l'EEP a été évaluée pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques, en utilisant le protocole standard de la méthode de diffusion discale (DDM). L'analyse chimique de l'EEP a montré que les échantillons de propolis présentaient des concentrations élevées en acides aromatiques, composés phénoliques, esters et autres dérivés, responsables des propriétés antibactériennes et antifongiques de la propolis. Les résultats expérimentaux ont indiqué que l'EEP avait une activité antibactérienne considérable contre la plupart des souches pathogènes testées. En général, la surface des films de FNC / PLA modifiés a montré une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram - positif, même à de très faibles concentrations d'EEP. L'ajout d'EEP aux films testés a considérablement augmenté l'effet antibactérien contre les Gram positifs, tels que *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella entérique*, alors qu'il n'y avait aucun effet sur les bactéries à Gram négatif. De plus, les résultats ont mis en évidence l'action inhibitrice de l'EEP sur *Candida albicans*.

**A.Akhondzadeh Basti et al. (2017)** : ont étudié l'effet de l'incorporation de l'extrait de propolis éthanolique et de l'huile essentielle de *Ziziphora clinopodioides* sur l'activité antibactérienne d'un film à base d'acide polylactique. Les composés chimiques volatils de ZEO ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse analytique. Différents groupes de films de PLA ont été préparés en utilisant ZEO (1% et 2%) et EPE (1% et 2%), séparément et en combinaison. La méthode de diffusion sur disque a été utilisée afin d'évaluer l'activité antibactérienne de groupes expérimentaux. L'analyse a été réalisée à l'aide de SPSS 16.0. Les films de PLA enrichis en ZEO possèdent une meilleure activité antibactérienne par rapport aux films incorporés en EPE ( $p < 0,05$ ). Les effets antibactériens par ordre descendant étaient les suivants : *Staphylococcus aureus* > *Listeria monocytogenes* > *Bacillus subtilis* > *B. cereus* > *Salmonella enteritidis* > *Salmonella typhimurium* > *Escherichia coli*. En conclusion les films de PLA incorporés avec du ZEO et de l'EPE avaient une activité antibactérienne considérable, ce qui indique le potentiel de ces films pour une application en tant que conditionnement actif dans l'industrie alimentaire.

**Ali Misaghi et al., (2017)** : ont étudié l'évaluation antimicrobienne de nouveaux nanocomposites à base d'acide poly-lactique en présence de composés bioactifs dans des saucisses cuites et conditionnées sous vide.

Dans cette étude, différentes concentrations de l'huile essentielle *Zataria multiflora* Bioss (ZME), d'extrait éthanoloque de propolis (PEE) et de la nanofibre de cellulose (CNF) ont été incorporés au polymère par un procédé de coulée en solution. Les films obtenus ont été ensuite caractérisés. L'examen mécanique a révélé que l'incorporation de CNF améliorait presque tous les paramètres mécaniques testés. En effet, la présence de l'huile essentielle ZME et l'extrait éthanoloque PEE rendait les films plus flexibles. De plus, selon l'analyse physique, des effets antibactériens maximaux ont été enregistrés pour les films contenant à la fois du ZME et du PEE. La durée de vie de conservation de tous les composites PLA /1 % ZME / PEE est prolongé à plus de 40 jours.

**Malgorzata Gniewosz et al. (2019)** : ont étudiés l'application de la propolis à la protection antimicrobienne et antioxydante de la qualité des aliments.

Dans cette étude, la propolis est utilisé en tant que conservateur naturel et agent de protection antimicrobien et antioxydant dans les aliments et cela grâce à sa richesse en bioactifs d'une part et d'autre part son ajout aux aliments procure de nouveaux avantages pour la santé du consommateur et assure une grande stabilité microbienne et une qualité des aliments pendant le stockage.

Les extraits de propolis (EEP) sont ajoutés directement aux aliments ou appliqués superficiellement. Les résultats de cette étude ont montré que l'ajout de faible concentration d'extraits de propolis (EEP) aux produits à base de viande inhibe à la fois la croissance de la microflore protéolytique ainsi que les moisissures et les levures dans les saucisses orientales fraîches et les saucisses de bœuf égyptiennes fraîches. Ainsi de meilleurs résultats ont été obtenus après l'addition de 2 % d'EEP aux galettes de bœuf et aux saucisses de toscane. Il a été ainsi démontré d'une part que l'ajout de 3 à 7% de EEP à la viande hachée de *Cyprinus carpio* étaient efficaces contre la détérioration des microorganismes y compris les bactéries psychrotrophes et lactiques.



**Bibliographie**

- [1] : Guillard V, Maschioni E, Mora L, Piergiovanni L, Nalin Federico (2010). Diffusivity of propolis compounds in polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, 98, 294-301.
- [2] :Hamedi H, Khodayari M, Khanjari A, Misaghi A, Afshin Akhondzadeh B, Kamkar A , Peyman Mahasti S. (2019). Effect of poly (lactic acid) films incorporated with different concentrations of Tanacetum balsamita essential oil, propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages. *Food packaging and shelf Life*, 19, 200 - 209.
- [3] :Ulloa P, Vidal J, Lopéz de Dicastillo C, Rodriguez F, Guarda A, Cruz RMS, Galotto MJ (2018). Development of poly (lactic acid) films with propolis as a source of active compounds : Biodegradability , physical , and functional properties . *Journal of applied polymer science*, 136, 1-11.
- [4] :Ashori A, Abdulkhani A, Hosseinzadeh J, Esmaeeli H. (2017). Evaluation of the Antibacterial Activity of Cellulose Nanofibers / Polylactic Acid Composites Coated With Ethanolic Extract of Propolis. *Polymer composites*, 38, 13-19.
- [5] :Akhondzadeh Basti A, Shavisi N, Khanjari A, Misaghi A, Shahbazi Y, Hajjar Bargh A, Vanaki E (2017). In vitro Antibacterial Activity of polylactic Acid Film Incorporated With Ethanolic Propolis Extract and Ziziphora clinopodioides Essential Oil. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4, 3- 8.
- [6] : Misaghi A, Khanjari A, Akhondzadeh B, Rezaeigolestani M, Fayazfar S, Abdulkhani A. (2017). Antimicrobial evolution of novel poly-lactic acid based nanocomposites incorporated with bioactive compounds in-vitro and in refrigerated vaccum-packed cooked sausages .*International Journal of Food Microbiology* , 260 , 1-10 .
- [7]: Malgorzata G, Katarzyna P, Krasniewska K. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 53-62.

*Chapitre IV*  
*Matériels et Méthodes*

## Chapitre IV. Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de génie de l'environnement et le laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (Equipe Biomasse et Environnement). Les expériences ont été menées durant une période de 3 mois (Mars-Juin 2019).

Ce chapitre est consacré à la présentation des matériaux et des techniques expérimentales utilisés au cours de ce travail. Il est divisé en trois grandes parties :

- ✓ La première partie présente les principales caractéristiques et propriétés des différents matériaux utilisés ;
- ✓ La seconde partie comporte les procédés employés pour la réalisation des films ;
- ✓ La dernière partie est consacrée aux techniques de caractérisations utilisées au cours de cette étude.

### IV.1. Présentation des produits utilisés

#### IV.1.1. Acide poly lactique (PLA)

La matrice poly (Acide lactique) utilisée est sous forme de granulés (figure IV.1). La référence PLE 005 est une résine thermoplastique de PLA (polylactide) issue de ressources végétales annuellement renouvelables certifiées d'origine non génétiquement modifiées. Le PLE 005 est recyclable, compostable industriellement selon la norme NF EN 13432:2000. Il est spécifiquement élaboré pour les applications d'extrusion (film, thermoformage).



Figure IV.1. PLA sous forme de granulés

Les principales propriétés du PLA prises sur la fiche technique sont notées dans le tableau suivant :

**Tableau IV.1.** Les principales propriétés physiques du PLA.

Propriétés générales	Unité	Valeur
Densité	/	1.26
MFI (190 °C, 2.16 Kg)	g / 10 min	5 – 9
Dureté (15s)	Shore D	80
Propriétés optiques	/	Transparent
Température de fusion	°C	170 – 180
Contrainte de traction au seuil élastique	MPa	20
Contrainte de traction à rupture	MPa	62.3
Module de Young	MPa	3820

#### IV.1.2. Propolis

C'est le principe actif ajouté au biopolymère (PLA) pour lui conférer des activités biologiques. La propolis récoltée dans la région de Merdj Ouamene à partir d'une ruche en provenance du sud.

Les principales propriétés de la propolis sont :

Propriétés physiques :

- ✓ Consistance variable selon la T° : dure et cassante à froid, mais devient molle, caoutchouteuse et très collante à chaud ;
- ✓ Densité : 1,2 ;
- ✓ Solubilité : insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, acétone, benzène ...

Caractères organoleptiques :

- ✓ Couleur : brune ;
- ✓ Odeur : aromatique ;
- ✓ Saveur : acre, piquante, parfois amère.

#### IV.1.3. Chloroforme

C'est un produit chimique fourni par BIOCHEM Chemopharma.

Il est utilisé comme solvant pour la préparation des solutions du PLA et de propolis dont les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ Formule chimique :  $\text{CHCl}_3$  ;
- ✓ Masse moléculaire :  $M = 119.38 \text{ g/mol}$  ;
- ✓ Température de l'ébullition :  $62 \text{ °C}$  ;

- ✓ Température de fusion : -64 °C ;
- ✓ Densité : 1,478 g / cm<sup>3</sup> ;
- ✓ Pureté : 99 %.

#### IV.1.4. Alcool éthanolique

C'est le solvant utilisé pour extraire les composés bioactifs de la propolis dont les propriétés physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ Formule chimique : C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O ;
- ✓ Masse moléculaire : M = 46.07g/mol ;
- ✓ Pureté : 96 %.

#### IV.1.5. Glycérol

C'est un produit chimique fourni par BIOCHEM Chemopharma dont les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ Formule chimique : C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> ;
- ✓ Masse molaire : 92.09 g/mol.

### IV.2. Matériel biologique

Pour étudier l'activité antimicrobienne de la propolis et des films préparés, quatre souches bactérienne (dont trois à Gram positif et quatre à Gram négatif) : *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ; *Bacillus Cereus* ATCC14579 ; *Enterococcus faecalis* wdcM 00009 ; *Klebsiella Pneumoniae* 2042 ; *Pseudomonas areoginosa* ; *Salmonella enterica* ; *Escherichia coli*, et quatre souches fongique : *Botrytis cinerea* ; *Aspergillus niger* ; *Fusarium* sp. et *Penicillium* SP sont utilisées. Les souches sont fournies par le laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables de l'Université de Bejaia.

#### IV.2.1. Souches bactériennes

##### - *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries de forme sphériques (coques) aéro-anaérobies facultatifs à Gram positif, résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture [1]. *Staphylococcus aureus* communément appelé staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre staphylococcus. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisés et dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. L'homme est le principal réservoir, mais ces bactéries sont également retrouvées dans l'environnement (eau, air, surfaces et aliments) et chez l'animal notamment l'élevage [2].

### - **Bacillus Cereus**

Les *Bacillus* sont des bacilles à Gram +, à spore terminale, subterminale ou centrale. Ils sont aéro-anaérobies facultatifs et parfois aérobies stricts. *Bacillus cereus* est un germe ubiquiste, anaérobie facultatif, vivant dans les sols et dans les eaux, et peut survivre dans l'environnement sous forme de spores. Il peut contaminer surtout les aliments d'origine végétale telle que : le riz et les épices ainsi que de nombreux plats cuisinés. *Bacillus cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste, il est également responsable de toxi-infections alimentaires [3].

### - **Enterococcus faecalis**

*Enterococcus faecalis* fait partie de la famille des entérocoques, c'est une bactérie commensale à Gram positif, non sporulée qui se présente sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes. Les entérocoques sont des bactéries ubiquistes, on les retrouve dans les eaux usées, l'eau douce, l'eau de mer et le sol [4]. La présence d'entérocoques peut être détectée dans de nombreux produits alimentaires comme les fromages ou les produits fermentés. Ils sont retrouvés à la fois dans les produits crus mais aussi dans les produits finis issus de l'industrie agro-alimentaire [5].

### - **Klebsiella Pneumoniae**

Le genre *Klebsiella* de la famille des entérobactéries comporte cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella Pneumoniae*. Les *klebsiella* sont des *Enterobacteriaceae*, bacilles gram négatif, immobiles et capsulés. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire des animaux et de l'homme en tant que bactéries commensales. Elles sont abondantes dans le sol et les eaux [6].

### - **Pseudomonas areoginosa**

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, dépourvue de capsule. Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. La température optimale de croissance de ce genre de bactérie est comprise entre 30 et 37°C. L'espèce *P. aeruginosa* est ubiquitaire dans l'environnement et peut être commensale du tube digestif. Dans l'environnement, elle est trouvée dans le sol, dans les eaux douces et marines, à la surface des plantes et des animaux [7]. *Pseudomonas aeruginosa* peut contaminer certains produits alimentaires tels que le lait cru et le fromage [8].

#### - *Salmonella enterica*

Les *Salmonella* sont des entérobactéries mésophiles mobiles et Gram négatif, des parasites de l'homme, des mammifères (rongeurs), des oiseaux (volailles) et des animaux à sang froid (reptiles). Elles sont responsables, après pénétration par voie orale, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïde et paratyphoïdes, des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) [9]. Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion à partir de l'eau, des aliments (ex. produits laitiers, œufs, viande) ou d'animaux familiers porteurs (tortues).

#### - *Escherichia coli*

*Escherichia coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte commun de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. *E. coli* reste la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux [10, 11].

### IV.2.2. Souches fongiques

#### - *Botrytis Cinerea*

*Botrytis Cinerea* est un champignon pathogène ubiquiste et polyphage, capable d'infecter plus de 200 espèces de plantes, causant des pertes économiques importantes sur les cultures avant et après la récolte [12]. *Botrytis Cinerea*, plus souvent appelé agent de la pourriture grise, attaque à travers le monde un nombre étendu de cultures fruitières, légumières et ornementales [13] aussi bien en plein champ et sous serre qu'après récolte, durant le stockage et le transport des produits [14].

#### - *Fusarium sp.*

Les champignons du genre *Fusarium* sont ubiquistes, ils s'adaptent facilement aux conditions environnementaux et sont très répandus sous tous les climats. Ils sont abondants dans les sols, sur les débris végétaux et sur les parties souterraines mais aussi aériennes des plantes. Ces espèces sont à l'origine d'infections opportunistes chez l'homme et l'animal. De nombreuses espèces produisent des mycotoxines telles que l'acide fusarique qui contaminent les aliments [15, 16]. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), les légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

### - **Aspergillus niger**

*Aspergillus niger*, est un champignon filamenteux qui se développe sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol et la litière, dans le compost et sur le matériel végétal en décomposition. *Aspergillus niger* est capable de se développer sur une large gamme de températures allant de 6 à 47 ° C, avec une température optimale relativement élevée entre 35 et 37 ° C. Cette espèce se développe dans les céréales et les denrées alimentaires et elle est présente dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air [17].

### - **Penicillium Sp**

Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, polyphages, ils peuvent être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les matières organiques en décomposition, le compost, les denrées alimentaires et les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus* [18].

## **IV.3. Méthodes expérimentales**

### **IV.3.1. Nettoyage de la propolis**

A l'aide d'un mortier la propolis brut est transformée en poudre fine puis filtrée pour éliminer toutes les impuretés (morceaux d'abeille, cire, bois). Après, un lavage est effectué jusqu'à l'obtention d'une propolis propre. Ensuite, la poudre lavée est étalée sur un papier absorbant pour un séchage optimal.

### **IV.3.2. Extraction de la propolis**

30 g d'échantillon de poudre de propolis sont broyés et dissous dans 100 ml d'éthanol à 96% sous agitation continue à 50 ° C pendant 30 min. La suspension est filtrée avec un papier Wattman N°1 et centrifugé à 600 g/20 min. Le surnageant obtenu est évaporé dans un rotât-vapeur à 40°C pendant 30 min (fig. IV.2). Enfin, l'extrait est versé dans une boîte à pétri et laissé pendant une journée pour bien sécher [19].





**Figure IV.2.** Evaporateur rotatif (rotavapor).

### IV.3.3. Techniques de caractérisation

- Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF) ;
- Ultra-violet UV ;
- Evaluation de l'activité antioxydante ;
- Test d'activité antibactérienne ;
- Test d'activité antifongique.

#### IV.3.3.1. Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels qui apparaissent sous forme de bande d'absorption.

Le spectre infrarouge IR est étudié dans une gamme de fréquence allant de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$  les bandes les plus caractéristiques se distinguent dans trois régions différentes :

- ❖ 4000  $\text{cm}^{-1}$  à 1500  $\text{cm}^{-1}$  : contient les bandes d'allongement correspondant au principal groupement OH, CO, NH<sub>2</sub> etc.
- ❖ 1500  $\text{cm}^{-1}$  à 600  $\text{cm}^{-1}$  : c'est une région complexe appelé empreinte digital du composé dans laquelle se situe de nombreuses vibrations de déformation ainsi que des bandes d'allongement des liaisons CO tel que les esters, les éthers et alcools.
- ❖ 1000  $\text{cm}^{-1}$  à 600  $\text{cm}^{-1}$  : c'est une zone très utilisée pour la détermination des structures éthylique et aromatique.

Dans cette présente étude les spectres IR de la poudre de propolis, d'extrait éthanolique de propolis et les films PLA /EEP ont été enregistré sur un spectrophotomètre de type **SHIMADZU FTIR -8400 S**, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel de traitement avec une résolution de 4cm dans la région  $400\text{ cm}^{-1}$  à  $4000\text{cm}^{-1}$ . L'analyse de la poudre de propolis est réalisée sur des mélanges de cette dernière et de KBr sous forme de pastilles de proportion 0,02 et 0,08 mg respectivement, préparées sous une pression de l'ordre de 90 KN.

#### **IV.3.3.2. Spectroscopie ultra-violet-visible**

L'analyse par spectroscopie ultraviolet visible s'avère nécessaire et utile pour la caractérisation des produits initiaux et finaux.

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont :

- Dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm – 400 nm) ;
- Du visible (400 nm – 750 nm) ;
- Du proche infrarouge (750 nm – 1400 nm).

Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide.

Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde. Le spectre est le plus souvent présenté comme une fonction de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

- **Mode opératoire**

Le spectre ultraviolet visible de l'échantillon d'extrait de propolis a été enregistré en diluant une proportion de 1 ml d'extrait de propolis dans 200 ml d'éthanol. Le mélange obtenu a subit ensuite un balayage de 200 nm jusqu'à 500nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible [20].

#### **IV.3.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de propolis**

##### **IV.3.3.3.1. Dosage des composés phénoliques**

###### **a) Dosage des polyphénols**

- **Principe**

Les polyphénols sont dosés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu [21].

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydoréduction, le réactif de Folin Ciocalteu, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué d'un mélange d'acides phosphotungsténique et phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène qui absorbent à 760nm. Une mesure colorimétrique effectuée à cette longueur d'onde permet ainsi d'apprécier le taux de polyphénols totaux (PT) présents dans l'échantillon. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composé phénoliques oxydés.

- **Mode opératoire**

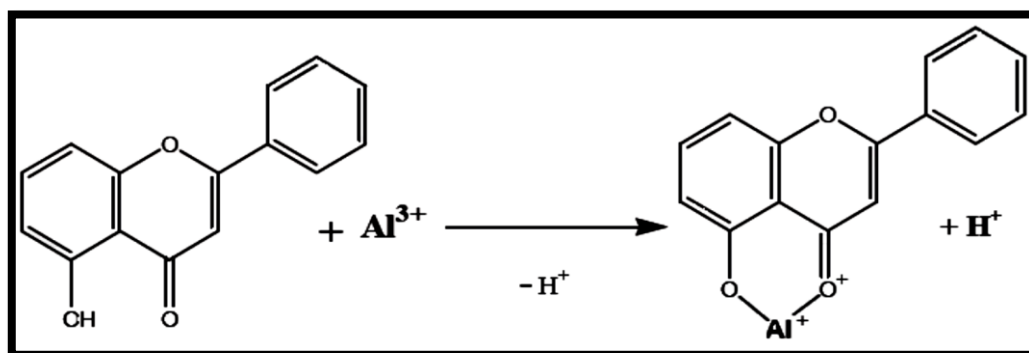
Un volume de 100  $\mu\text{l}$  d'extrait est introduit dans des tubes à essai contenant 750  $\mu\text{l}$  du réactif de Folin-Ciocalteu (10%) et 750  $\mu\text{l}$  de carbonate de sodium (6%). Les tubes sont agités et incubés à l'obscurité durant 30 min à température ambiante. L'absorbance est ensuite mesurée à 765 nm.

Les résultats sont exprimés en mg Equivalent en acide gallique par gramme de matière sèche de propolis (mg EAG/g MS). La courbe d'étalonnage est obtenue, dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant comme étalon l'acide gallique (Annexe I).

**b) Dosage des flavonoïdes**

- **Principe**

Le principe repose sur la formation d'un complexe jaunâtre, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'Aluminium et les flavonoïdes, qui est le résultat de la fixation des ions ( $\text{Al}_3^+$ ) sur les atomes d'oxygène présents sur les atomes de carbone 4 et 5 des flavonoïdes agissant comme donneurs d'électrons (fig. IV.3 ) [22]. La formule du complexe entre le chlorure d'Aluminium et un composé phénolique O-hydroxy carbonylé se présentant comme suit :



**Figure IV.3.** Réaction de chlorure d'aluminium et des flavonoïdes [22].

- **Mode opératoire**

Un volume de 1 ml de la solution d'extrait éthanolique de propolis (0.01 mg/ml dans le méthanol) est ajouté à 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 2% préparé dans le méthanol. Le mélange est rigoureusement agité, puis incubé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 430 nm. La teneur en flavonoïdes de l'extrait est obtenue en se référant à une courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de Quercétine par gramme de matière sèche de propolis (mg EQ/gMS) [23].

La courbe d'étalonnage est obtenue, dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant comme étalon la Quercétine (Annexe II).

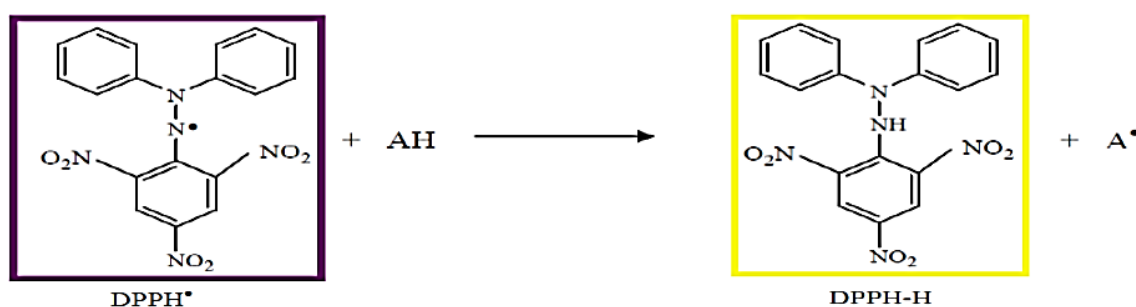
#### IV.3.3.3.2. Mesure de l'activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante de l'extrait de propolis est évaluée en utilisant deux tests différents : le test de piégeage du radical diphényle picrylhydrazyle (DPPH<sup>•</sup>) et le test de mesure de pouvoir réducteur.

##### a) Test de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>

- **Principe**

La réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) par un antioxydant peut être suivit par spectromètre UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm ; provoqué par les antioxydants. En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH<sup>•</sup> De couleur violette se réduit en 2,2-Diphényle picrylhydrazone de couleur jaune (fig. IV.4) [24].



**Figure IV.4.** Réduction du radical DPPH par un antioxydant [25].

- **Mode opératoire**

L'activité est mesurée selon le protocole décrit par **Lopes-Lutz et al ., (2008)**. Dans des tubes à essai, un volume de 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.3 mM) est ajouté à chaque

2.5 ml d'extrait (2.5 mg / ml dans MeOH). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et de 2.5 ml de méthanol.

- **Expression des résultats**

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I (\%) = \frac{(\text{Abs Témoin} - \text{Abs teste})}{\text{Abs Témoin}} \times 100$$

Où :

- **I %** : Inhibition des radicaux libres en pourcentage ;
- **Abs Témoin** : Absorbance du témoin (absorbance du radical DPPH + méthanol) ;
- **Abs teste** : Absorbance de l'échantillon.

a) **Pouvoir réducteur**

- **Principe**

Le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques de propolis est mesuré par la réduction directe des électrons de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$  en  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ .

La formation du complexe  $[(\text{Fe}^{3+})_4 [\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6]_3]$  coloré en bleu, est obtenu par l'addition des ions  $\text{Fe}^{3+}$  libres après la réaction de réduction. Ce complexe est quantifié par la mesure de l'absorbance à 700nm [27].

- **Mode opératoire**

Le dosage du pouvoir réducteur est effectué selon la méthode décrite par **Gülçin et al. (2002)**. 500 µl d'extrait de propolis (2.5 mg / ml) sont additionnés de 1.25 ml du tampon phosphate à (pH 6.6 ; 0.2 M) et 1.25ml de ferricyanure de potassium  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  à (1 %). Le mélange est ensuite mis dans un bain marie à 50 °C pendant 20 min, puis 1.25 ml d'acide trichloracétique à 10 % sont additionnés au mélange et le tout est centrifugé à 3000 g / 10 min. Un volume de 1.25 ml du surnageant sont prélevés puis additionnés à 1.25 ml d'eau distillée et 0.25 ml de

chlorure ferrique (Fe Cl<sub>3</sub>) à (0.1 %). La détermination de l'absorbance est effectuée à 700 nm. Les résultats sont exprimés en mg Equivalent en acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg Eq AA / g MS). La courbe d'étalonnage (Annexe III) est obtenue, en utilisant comme étalon l'acide ascorbique.

#### IV.3.3.4. Test d'activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide. Cette méthode consiste à déposer à la surface d'un milieu géloséensemencé par les microorganismes à tester, des disques chargés de l'extrait, puis les boîtes sont portées à l'incubation [29]. Les souches microbiennes utilisées dans ce test sont présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV.2.** Les souches microbiennes testées

Microorganismes	Souches testées
<b>Bactéries</b>	- <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Bacillus cereus</i> . - <i>Enterococcus faecalis</i> . - <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
<b>Champignons</b>	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.

##### IV.3.3.4.1. Activité antibactérienne

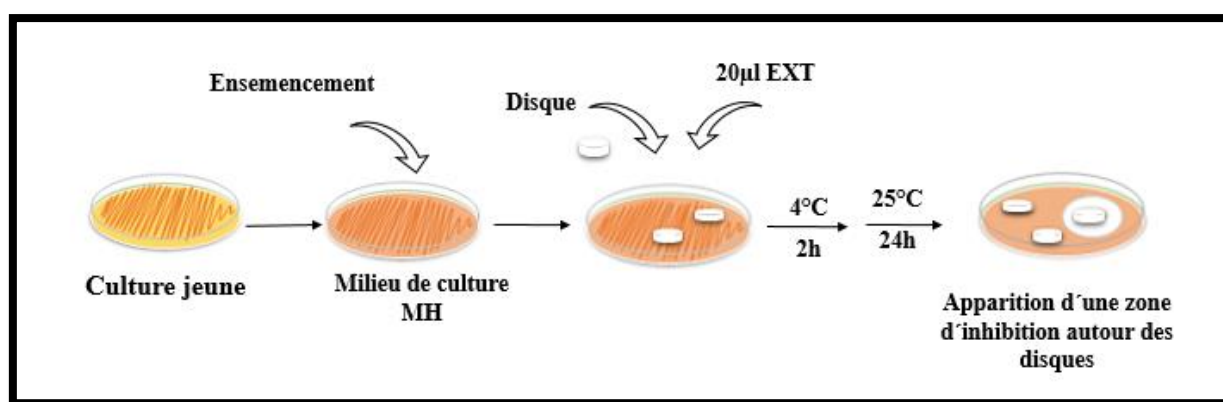
###### a) Préparation des suspensions bactériennes

À partir d'une culture bactérienne jeune de 24 heures, 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées dans 10ml de bouillon nutritif pour préparer une suspension bactérienne de 10<sup>8</sup> UFC / ml suivis d'une agitation à l'aide d'un vortex.

###### b) Ensemencement

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage. Le milieu de Mueller-Hinton auquel est additionnée 5 % de tween 80 est coulé dans des boîtes de pétri. Les boîtes sont refroidies et séchées à température ambiante puis sontensemencées par des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles. L'écouvillon est imbibé de la suspension bactérienne puis essoré

contre la paroi interne du tube à essai. L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose. Les disques préparés de papier wattman N°3 de 6 mm de diamètre stérilisés à 180°C pendant 30 minutes ont été déposés sur le milieu ensemencé à l'aide d'une pince stérile (3 disques dans chaque boîte). 20µl d'extrait éthanolique de propolis (0.85g/ml dans le DMSO) ont été injectés sur les disques déposés et les disques témoins ont reçu 20µl de DMSO (fig. IV.5). Les boîtes sont ensuite mises dans le réfrigérateur à 4°C /2h puis incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions autour des disques [30].



**Figure IV.5.** Mise en évidence de l'effet antibactérien de l'extrait de propolis

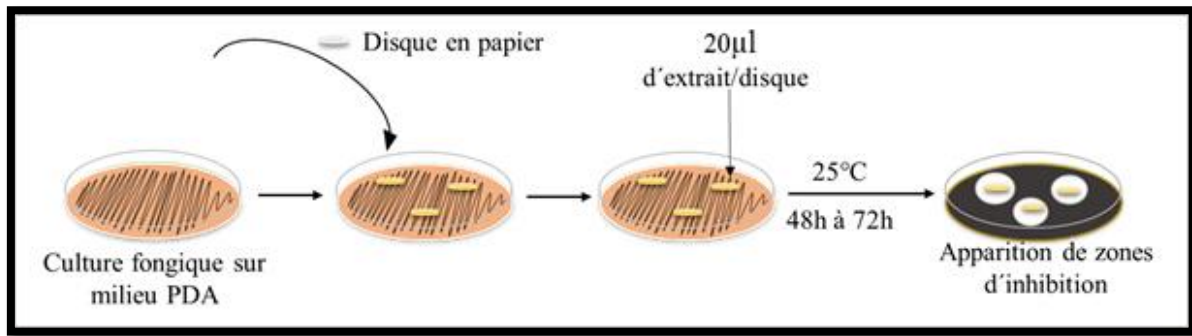
#### IV.3.3.5. Activité antifongique

##### a) Préparation des cultures fongiques

Les cultures fongiques sont préparées par ensemencement d'une suspension sporale sur milieu PDA, puis incubée à 25 °C pendant 3 à 7 jours.

##### b) Ensemencement

Le protocole d'ensemencement est similaire à celui cité dans la section (IV.III.3.4.1.b), le milieu de culture utilisé est le milieu PDA additionné de 5 % de tween 80. Dans ce tests, l'inoculum est prélevé par un écouvillon à partir d'une boîte contenant l'espèce fongique à tester, puis le frotter à trois reprises sur toute la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boîte à environ 60 ° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Une fois les boîtes sont ensemencées et les extraits sont déposés, les boîtes sont incubées à 25 °C pendant 48 h jusqu'à 72 h (fig. IV.6). Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.



**Figure IV.6.** Mise en évidence de l'effet antifongique de l'extrait de propolis

#### IV.3.4. Elaboration des films PLA / Propolis

Afin d'avoir une démarche scientifique et organisée, un plan d'expérience fut réalisé à l'aide d'un logiciel d'optimisation le MODDE 6.

##### IV.3.4.1. Choix des facteurs et réponses

L'étape la plus essentielle dans ce cas est le choix des facteurs et des réponses du plan d'expérience ainsi que le choix des domaines d'études.

Les facteurs choisis sont :

- Facteur 1 : quantité de l'extrait de propolis.
- Facteur 2 : quantité du glycérol.

Suite aux études et aux recherches réalisées dans les chapitres précédents deux réponses ont été retenues :

- Réponse 1 : Module d'Young (module d'élasticité).
- Réponse 2 : Test d'absorption d'eau.

##### IV.3.4.2. Choix du plan d'expérience

Comme le but de cette étude est d'optimiser, le choix s'est porté sur un plan factoriel à 3 niveaux, le plan retenu nous permettra en premier lieu d'évaluer l'influence des facteurs sur les réponses choisies et au final aboutir à la détermination des valeurs optimales de ces facteurs.

##### IV.3.4.3. Plan d'expérience retenu

Après avoir introduit les facteurs et les réponses cités précédemment et choisi le modèle, le logiciel MODDE 06 a proposé la matrice suivante (tableau IV.3) :



**Tableau IV.3.** La matrice des essais proposés par MODDE 6.

Essai	Extrait de propolis (g)	Glycérol (g)	Module de Young (N/ mm <sup>2</sup> )	Test d'absorption (%)
01	0	0		
02	0.07	0		
03	0.14	0		
04	0	0.15		
05	0.07	0.15		
06	0.14	0.15		
07	0	0.3		
08	0.07	0.3		
09	0.14	0.3		
10	0.07	0.15		
11	0.07	0.15		
12	0.07	0.15		

Cette matrice d'expérience propose 12 essais, dont deux sont des points du centre du domaine d'étude et 03 essais de répétition.

#### IV.3.4.4. Réalisation des essais de la matrice d'expérience

A partir de la matrice d'expérience, 12 essais de formulation ont été réalisés selon le protocole décrit ci-dessous.

##### ➤ Préparation des essais (films de PLA / Propolis)

Les films de PLA ont été produits par la méthode casting.

1 g de granulés de PLA a été ajouté à 50 ml de chloroforme. Sous agitation constante pendant environ 8 h jusqu'à la dissolution complète des granulés de PLA. Les différentes masses d'EEP (0,07g et 0.14g) et de glycérol (0.15g et 0.3g), seules et en combinaison, ont été ajoutées au mélange et homogénéisé à 8000 tr / min pendant 2 min. Les solutions résultantes ont été versées dans des boîtes de Pétri en verre (diamètre: 100 mm, profondeur: 15 mm) [19].



**Figure IV.7.** Ultra-Turax.

#### **IV.3.4.5. Evaluation du Module d' Young**

La mesure du Module d' Young des films est effectuée au niveau de laboratoire de matériaux minérales et composites de l'université de Boumerdes à l'aide d'une machine de traction de marque Zwick / Z010 de capacité 10 KN piloté par un ordinateur. Le test consiste à mettre un film découpé selon la norme ISO 527-1, d'une largeur de 2 cm et d'une longueur de 7.5 cm et d'une épaisseur de 0.05 mm entre deux pinces et de l'étirer ensuite jusqu'à la rupture.

Les tests ont été effectués sur 3 répétitions pour chaque type de film avec la séparation initiale des poignées et la vitesse de déformation été fixée à 40 mm et 5 mm / min, respectivement.



**Figure IV.8.** Machine d'attraction.

#### IV.3.4.6. Test d'absorption d'eau

L'absorption d'eau a été déterminée par ASTM D 570. Pour chaque test, trois échantillons d'essai sous forme de pastilles de 6 mm de diamètre ont été réalisés. Les échantillons ont ensuite été séchés dans un étuve à 80 °C pendant 24 h, refroidis dans un dessiccateur et immédiatement pesés (poids conditionné w1) à 0.0001 g près. Les échantillons ont été ensuite plongés dans un récipient d'eau distillée à température ambiante. Après la sortie de l'eau, les pastilles ont été soigneusement séchées avec du papier absorbant puis pesés (poids humide w2) à 0.0001 g [31]. Le taux d'absorption a été déterminée par :

$$WA (\%) = \frac{(W2-W1)}{w2} * 100$$

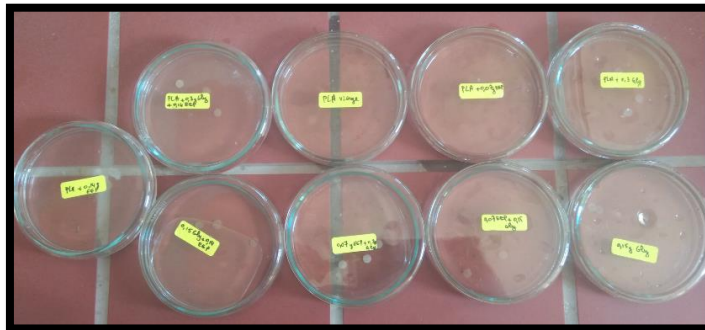


Figure IV.9. Taux d'absorption d'eau des films

#### IV.3.4.7. Test d'activité antibactérienne

##### ➤ Méthode d'ensemencement en surface et en masse

Quatre souches bactériennes dont deux à gram + (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus Cereus*) et deux à gram négatifs (*Pseudomonas areoginosa*, *EscherichiaColi*) sont utilisés pour évaluer l'activité antibactérienne des films. Le test de diffusion sur agar, selon la méthode de **Kirby-Bauer**, permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des films par la formation d'une zone d'inhibition de la croissance des microorganismes. Les films sont testés sous forme de pastilles de 6mm de diamètre découpées à l'emporte-pièce. Trois pastilles sont testées pour chaque échantillon. Elle sont préalablement stérilisées par immersion dans l'éthanol pendant 5 min, puis séchées à température ambiante.

Deux méthodes ont été envisagés afin d'optimiser les tests antibactériens : la gélose est ensemencée soit en surface soit en masse.

La première méthode est celle utilisée classiquement par dépôt de la pastille sur la gélose ensemencée, méthode appelée en surface (Méthode utilisé précédemment pour extrait

éthanolique de propolis). Pour la méthode de la gélose ensemencée en masse les géloses servant au test de diffusion (dans notre cas la gélose Muller-Hinton) sont ensemencées en masse en ajoutant une suspension bactérienne de  $10^4$  UFC/ ml à la gélose MH liquide et tiède. Les films sont déposés sur le fond de la boîte de pétri vide, 18 ml de la solution du milieu MH liquide ensemencée sont versés sur les pastilles de films [32].

**Bibliographie**

- [1] : Licitra G. (2013) .Etymologia : Staphylococcus .Emerging Infections Diseases ,19 ,1553.
- [2] : Wertheim Hf, Melles DC, Vos MC, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. (2005) .The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. Lancet Infect Dis, 5, 62-751.
- [3] : Larpent JP. (1997). Microbiologie Alimentaire : techniques de laboratoire .Lavoisier - Techniques & Documentation, 1074.
- [4] : Schloissing S, Arumuganm M , Sunagawa S , Mitreva M , Tap J , Zhu A , Waller A , Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K , Sunyaev SR, Weinstock GM , Bork P .( 2013) .Genomic variation landscape of the human gut microbiome . Nature, 493,45-50.
- [5] :Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. (2006) .The role and application of enterococci in food and health .International journal of Food Microbiology, 106, 1-24.
- [6] : Miller VL, Lawlor MS, Hsu J, Rick PD. ( 2005) .Identification of Klebsiella Pneumoniae virulence determinants using an intranasal infection model .Molecular Microbiology , 58, 1054-1073.
- [7] : Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 100, 8484-8489.
- [8] : Gennari M, Dragotto F. (1992). A study of the incidence of different fluorescent Pseudomonas species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water. Journal of Applied Bacteriology, 72, 281-288.
- [9] : Korsak N, Clinquart A, Daube G. (2004) .Salmonella SPP.dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique ?. Annales de Médecine vétérinaire , 148,174-193.
- [10] : Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE. (1983) .Survival and implantation of Escherichia Coli in the intestinal tract .Infection and Immunity, 39, 686-703.
- [11] : Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. (2004) .Pathogenic Escherichia Coli. Nature Reviews Microbiology, 2 ,123-140.
- [12] : Mouria B, Ouazzani-Touhami A, Mouria A, Douira A. (2013). Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez Botrytis cinerea et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost. Journal of Applied Biosciences, 64, 4797 – 4812.

- [13] : Shtienberg D, Elad Y, Niv A, Nitzani Y, Kirshner B, (1998). Significance of leaf Infection by *Botrytis cinerea* in stem rotting of tomatoes grown in non-heated greenhouses. European Journal of Plant Pathology, 104,753 - 763.
- [14] : Fukumori Y, Nakajima M, Akutsu K. (2004). Microconidia act the role as spermatia in the sexual reproduction of *Botrytis cinerea*. Journal of General Plant Pathology, 70, 256- 260.
- [15] :Abramson D, Clear RM, Smith DM. (1993).Trichothecene production by *Fusarium* spp Isolated from Manitoba grain .Canadian Journal of plant pathology, 15, 147-152.
- [16] :Nelson PE , Desjardins AE , Plattner RD. ( 1993 ) .Fumonisin , mycotoxins produced by *Fusarium* species : biology , chemistry and significance . Annual Review of phytopathology , 31, 233-252 .
- [17] : Morin O. (1994). *Aspergillus* et aspergillose : biologie. Edition techniques Encyclopédie Médico-chirurgicale (Elsevier Paris), Maladies infectieuses, 8-600-A-10.
- [18] :Pitt, JI. (1988). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycology ,65, 1135-1157.
- [19]: Khodayri M, Basti AA, Khanjari A , Misaghi A, Kamkar A, Shotorbani PM, Hamed H .(2018). Effect of poly (lactic acid) films incorporated with different concentrations of *Tanacetum balsamita* essential oil, propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages .Food packaging and shelf life, 19,200-209.
- [20]: Lima GG, Souza RO, Bozzi AD, Poplawska MA, Devine DM, Nugent MJD. (2016). Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis Loaded Hydrogels .Journal of Pharmaceutical sciences, 105, 1248-1257.
- [21] : Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic photungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16,144-158.
- [22] :Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris, 254.
- [23]: Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006).Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry, 97, 654–660.
- [24]: Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity .Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26, 211-219.
- [25]: Endo T, Fukunaga T, Yoshimura T, Esumi K. (2006). Scavenging DPPH radicals catalysed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. Journal of colloid and interface Science ,302 ,516-521.

- [26] : Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. (2008) .Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils .Phytochemistry, 69, 1732 – 1738.
- [27] : Ribeiro SMR, Barbosa LCA, Queiroz JH, Knodler M, Schieber A. (2008). Phenolics compound and antioxidant capacity of Brazilian mango varieties (*Mangifera indica* L.). Food Chemistry, 110, 620–626.
- [28] : Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu OI, Aslan A. (2002) .Determination of antioxidant activity of lichens *Cetria islandica* L. journal of Ethnopharmacology, 79, 325 – 329.
- [29] :Belaiche P (1979). Les techniques de laboratoire et l'aromatogramme. In : traité de la phytothérapie et l'aromathérapie, 121-132.
- [30] : Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G, Horzum Z. (2007). Antimicrobial Activity of volatile components and various extracts of the red agla *Jania rubens*. Phytotherapie research, 21 ,153-156.
- [31]: Chibani N, Djidjelli H, Dufresne A, Boukerrou A, Samira N.( 2014) .Study of Effect of Old Corrugated Cardboard in Properties of Polypropylene Composites : Study of Mechanical Properties , Thermal Behavior ,and Morphological Properties .Journal of Vinyl and Additive Technology , 1,1-8.
- [32] : -Birck .C (2014) .Conception et caractérisation des films antibactériens à base de poly (alcool vinylique) pour l'emballage à contact alimentaire, these de doctorat, Université de Lille 1.

# *Chapitre V*

## *Résultats et Discussion*

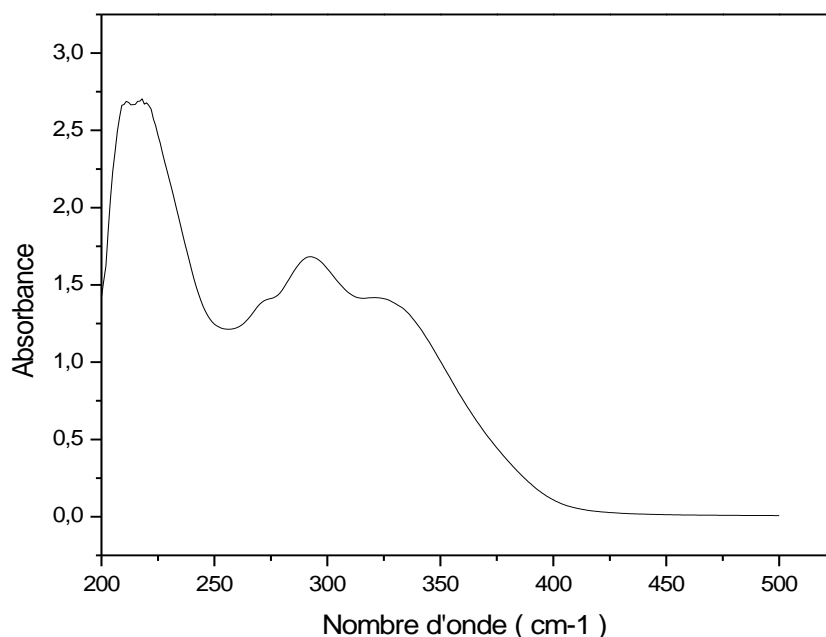


## Chapitre V. Résultats et Discussion

### V.1. Extrait éthanolique de la propolis

#### V.1.1. Analyse spectrophotométrie UV-visible de l'extrait de propolis

Le spectre UV-visible de l'extrait de propolis obtenu est illustré dans la figure ci-dessous :



**Figure V.1.** Spectre UV-visible de l'extrait de propolis.

Comme le montre la figure, le spectre UV-visible de la propolis présente 2 pics d'absorption qui correspondent aux bandes I (entre 200 nm-240 nm) et II (entre 250 nm-350 nm). Cette bande d'absorption correspond aux composés phénoliques qui présentent généralement un pic d'absorption dans la plage de la lumière ultraviolette de 250 nm à 350 nm pour l'analyse spectrophotométrique. L'analyse du spectre a montré ainsi que la longueur d'onde maximale d'absorption de l'extrait de propolis se trouve plus exactement à 295nm qui est due principalement aux flavonoïdes [1].

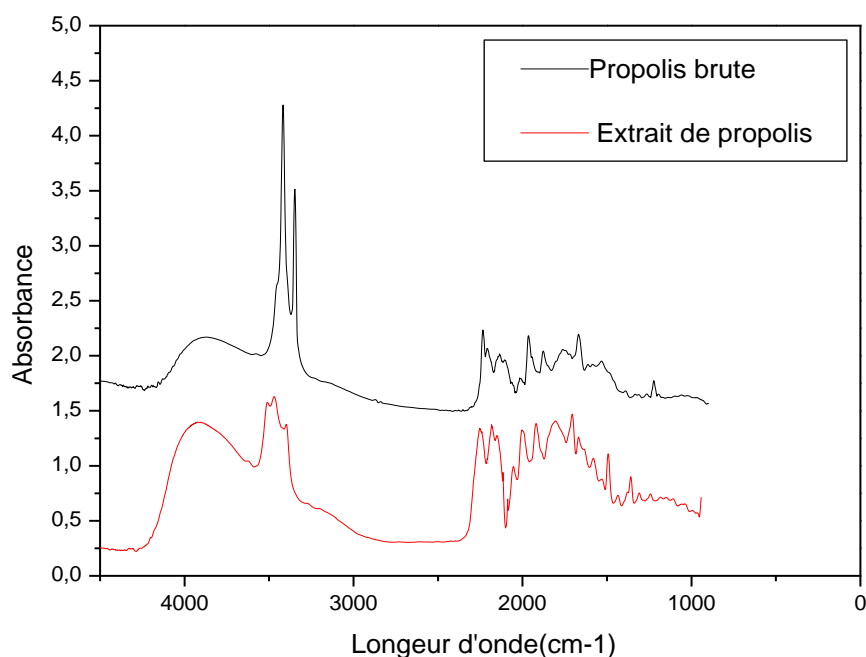
Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats des travaux réalisés par **Segueni (2011)** sur la propolis d'EL – malha et ceux de **Lima et al. (2016)** pour la propolis du Sud de Brésil.

### V.1.2. Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR

La figure (V.2.) représente les spectres IR-FT de la propolis brute et d'extrait éthanolique de la propolis à température ambiante.

Nous pouvons voir clairement que la propolis brute et l'extrait ont une même structure. Par ailleurs nous pouvons remarquer l'augmentation de l'intensité des différentes bandes d'absorptions d'extrait par rapport à celle de la propolis brute. Cependant dans la région spectrales  $2960-2840\text{cm}^{-1}$  on remarque une diminution de l'intensité :

- Une large bande d'absorption située aux alentours de  $3400\text{cm}^{-1}$  et qui est attribuée aux vibrations d'élongations des groupements OH d'alcool (phénol).
- Deux pics situés à  $2920\text{cm}^{-1}$  et à  $2840\text{cm}^{-1}$  attribués respectivement aux vibrations d'élongations de la liaison C-H.
- Une bande située aux alentours de  $1700\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée aux vibrations d'élongations des groupements C=O des acides carboxyliques et des acétones aromatiques.
- Un pic situé à  $1645\text{cm}^{-1}$  qui correspond aux vibrations d'élongations de la liaison C=C des alcènes.
- Deux pics situés à  $1600\text{cm}^{-1}$  et à  $1460\text{cm}^{-1}$  qui correspondent aux vibrations d'élongations de la liaison C=C des aromatiques.
- Deux pics situés aux alentours de  $1500\text{cm}^{-1}$  attribués aux groupements nitro-aromatiques C-NO<sub>2</sub>.
- Une bande d'absorption située aux alentours de  $1240\text{cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des groupements amines C-N.
- Deux bandes d'absorptions situées aux alentours de  $1160$  et de  $1260\text{cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des groupements C-O des acides et des esters présent dans la propolis.
- Un pic situé à  $1040\text{cm}^{-1}$  qui correspond aux vibrations d'élongations de la liaison C-O (éther).
- Un pic intense à  $720\text{cm}^{-1}$  correspondants aux vibrations de déformations des groupements C-H. [4].



**Figure V.2 :** Spectres IR-TF de la propolis brute et de l'extrait EEP.

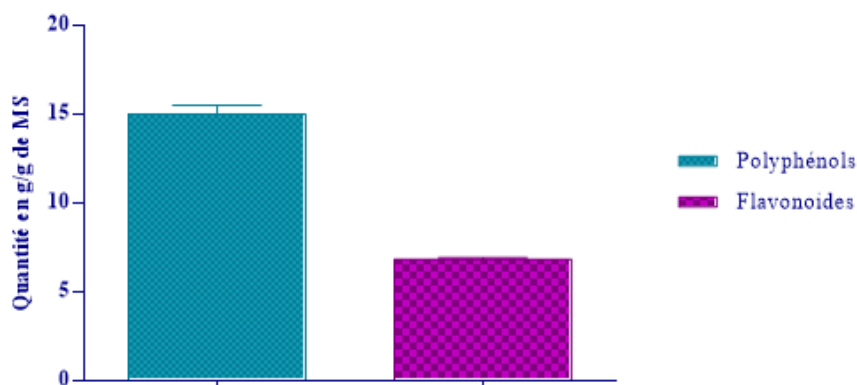
### V.1.3. La teneur en composés phénoliques

#### V.1.3.1. La teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux d'EPP a été effectuée par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en g équivalent d'acide gallique par gramme de propolis (g EAG/g de propolis), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ( $y = 0.963 x$ ,  $R^2 = 0.997$ ) (Annexe I). Les constituants phénoliques totaux de l'extrait ont été trouvés avec une valeur de l'ordre de 15g EAG/g de propolis (figure.V.3).

#### V.1.3.2. La teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux a été effectuée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Les résultats obtenus sont exprimés en g équivalent de quercétine par gramme de propolis (g EQ/g de propolis) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la quercétine ( $y = 12.731 x$ ,  $R^2 = 0.992$ ) (Annexe II). La teneur a été estimée à 6,833g EQ/g de propolis (figure.V.3).



**Figure V.3.** Histogramme de teneurs en polyphénols, en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de propolis

Les résultats de cette étude ont démontré que l'extrait éthanolique de propolis est très riche en polyphénols et en flavonoïdes.

Les investigations faites sur la détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes de la propolis d'abeille sont nombreuses, et les résultats sont différents d'une étude à l'autre. L'extrait éthanolique de la propolis algérienne de Babor présente une teneur en polyphénols totaux de 600 mg EAG/g de propolis et une teneur en flavonoïdes de 132 mg EQ/g de propolis, de même pour la propolis de Sétif, elle présente une valeur de 510 mg EAG/g de propolis en polyphénols et une valeur de 111 mg EQ/g de propolis en flavonoïdes [2].

L'étude menée par **Moreira et al. (2008)** sur la propolis du Portugal, a montré qu'elle présente une teneur en polyphénols totaux de 151.00 mg EAG/g de propolis pour la région de Fundao et une teneur de 329,00 mg EAG/g de propolis pour la région de Borne. La teneur en polyphénols totaux de la propolis Kourienne varie de 49 à 239 mg EAG/g de propolis et celle des flavonoïdes varie de 21 à 50 mgEQ/g de propolis [6]. **Touzani et al.(2018)** ont rapporté que, la propolis récolté dans la République Tchèque, présente une teneur en polyphénols de 129.83mgEAG/g, les mêmes auteurs ont rapporté également qu'une propolis récoltée en Irlande a présenté 2.86 mg EQ/g de propolis en flavonoïdes.

**Righi et al. (2013)** ont rapporté que la propolis brésilienne présente des teneurs en polyphénols de l'ordre de 25.867%, 12.892% et 5.620% respectivement pour CaboVerde, Ponta Grossa et Picos et des teneurs en flavonoïdes de 3.148% ,0.859% et 1.243%. Les échantillons de propolis provenant de Mexico, indique des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de 218 mg EQ/g de propolis 243 mg EQ/g de propolis respectivement pour la région de Cerro Blanco et La Regadera. [9].

Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les travaux précédents sont inférieures à celle trouvés dans la présente étude (15gEAG/g de propolis (polyphénols) et 6,833gEQ/g de propolis (flavonoïdes)). La teneur en polyphénols et en flavonoïdes se différencie d'un échantillon à un autre selon l'origine botanique de la propolis c'est-à-dire la région de sa provenance [5].

Pour comprendre les facteurs influençant la composition chimique, il est nécessaire de garder à l'esprit l'origine végétale de la propolis. Pour la production de propolis, les abeilles utilisent des matériaux résultant de divers processus botaniques dans les différentes parties des plantes. L'origine végétale de la propolis détermine sa diversité chimique et la composition chimique dépend de la spécificité de la flore locale sur le site de collecte et donc des caractéristiques géographiques et climatiques de ce site. Cela se traduit par la diversité saisissante de la composition chimique de la propolis [10]. En plus de l'origine de la propolis, l'extraction des composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologiques [11].

On peut conclure que l'extrait de la propolis constitue une source prometteuse en composés phénoliques. La quantité de ces derniers dépend d'un nombre de facteurs tels que : l'origine géographique et botanique, le moment et la méthode de la récolte, le solvant et la méthode utilisés pour l'extraction [12].

#### **V.1.4. Activité antioxydante**

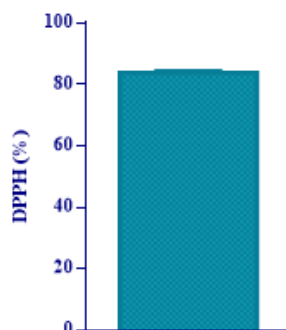
Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante. Dans la présente étude, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) étudiée a été déterminée en utilisant deux méthodes :

- Evaluation du pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation du radical DPPH par les antioxydants présents dans l'extrait éthanolique de propolis étudiée.
- Estimation du pouvoir réducteur, qui mesure la capacité de l'extrait à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux).

##### **V.1.4.1. Effet de piégeage du radical DPPH**

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) choisi dans cette étude est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne la décoloration de ce dernier. Ce test consiste à mettre le radical DPPH en présence d'une

molécule dite <antioxydant > afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. Le résultat du test au DPPH de l'extrait de propolis est présenté dans le graphe suivant :



**Figure V.4.** Histogramme de DPPH de l'extrait éthanolique de propolis

Les résultats du test au DPPH de l'extrait de propolis ont révélé que l'extrait éthanolique présente une activité anti radicalaire assez importante avec une capacité remarquable à piéger les radicaux libres. Le pourcentage de réduction est de 83.81 % (c'est-à-dire que l'échantillon analysé a éliminé presque la totalité des radicaux libres).

L'étude réalisée par **Ferhoum (2010)** a révélé que les extraits éthanoliques de propolis Algérienne de la région de montagne ( **Dellys et bouzgen** ) ainsi que de la région plaine (**Mtija et Chaabet** ) présentaient une bonne activité antiradicalaire qui atteint les 96% par contre l'extrait de propolis Saharienne Abeille Noir a présenté une faible activité antiradicalaire avec un pourcentage de 40 %.

En comparant nos résultats à ceux de **Ferhoum 2010**, on constate que notre propolis a montré moins d'activité antiradicalaire par rapport à celles de Dellys, bouzgen, Mtija ainsi que Chaabet par contre elle a présenté la meilleure activité antiradicalaire par rapport à la propolis Saharienne Abeille Noir.

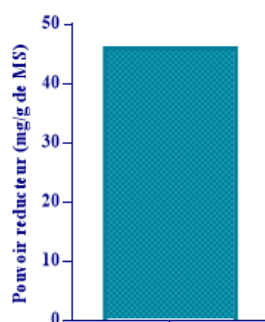
La différence entre les pourcentages d'activités antiradicalaires de ces extraits est due à de nombreux facteurs tels que : l'origine géographique et botanique, le moment et la méthode de la récolte, et le solvant utilisé pour l'extraction [14].

#### **V.I.4.2. Pouvoir réducteur**

Le test du pouvoir réducteur mis en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de l'échantillon testé. Cette activité antioxydante est basée sur la réduction du Fer (III) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en Fe (II) [15].

Les résultats de pouvoir réducteur obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par gramme de propolis (mg Eq AA /g de propolis), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ( $y = 7.276 x + 0.067$ ,  $R^2 = 0,9885$ ) (Annexe III).

L'analyse des résultats présentés dans la figure ci-dessous dévoile que l'extrait de propolis présente une réduction de l'ordre de 46 mg EAA /g de la propolis.



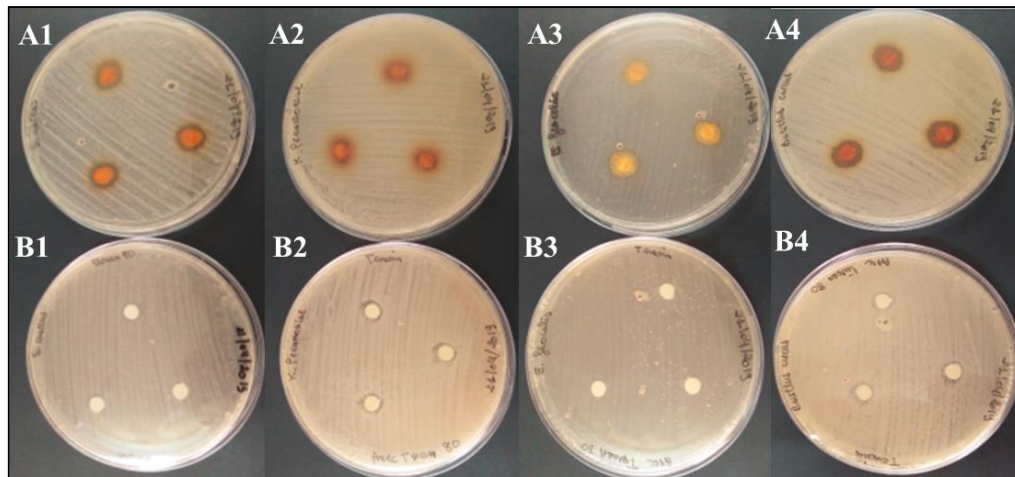
**Figure V.5.** Histogramme du pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de propolis

Une étude similaire à cette présente étude réalisée par **Tifinine et al. (2016)** sur la propolis d'Oued Ghir a révélé que cette dernière présentait une activité réductrice de l'ordre de 17 mg EAA / g de propolis. En comparant nos résultats, on constate que l'activité réductrice de la propolis étudiée est supérieur à celle obtenue par **Tifinine et al. (2016)**.

#### **V.1.5. Evaluation de l'activité antibactérienne**

La méthode de diffusion des disques nous a permis de vérifier le pouvoir antibactérien d'EEP *vis-à-vis* les souches bactériennes choisies. Après incubation à 37°C pendant 24h.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis sont représentés dans les figures et le tableau suivants :



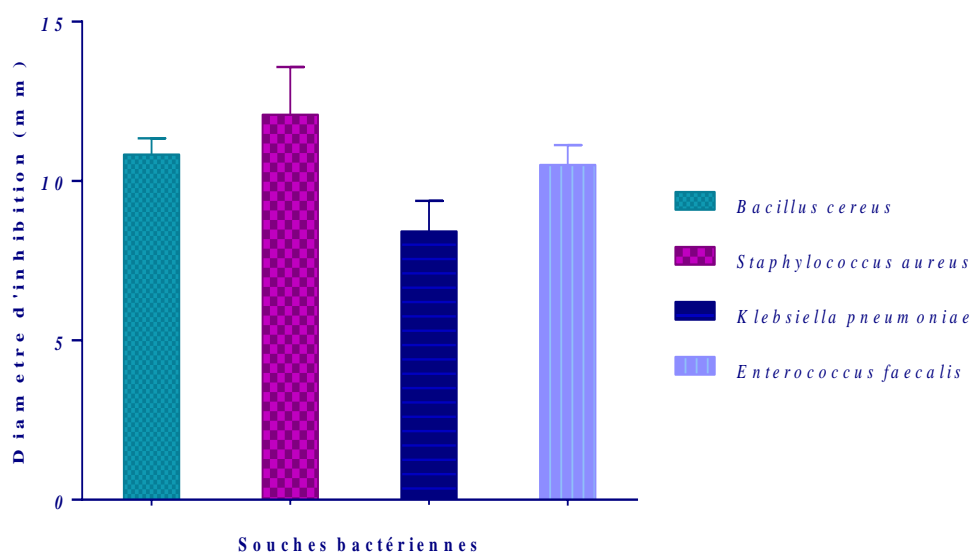
**Figure V.6.** Images de l'inhibition de la croissance bactérienne par l'EEP.

A: Effet de propolis: A1 : *Staphylococcus aureus* ; A2 : *Klebsiella Pneumoniae* ; A3 : *Enterococcus faecalis* ; A4 : *Bacillus Cereus*. B : Témoins : B1 : *Staphylococcus aureus* ; B2 : *Klebsiella Pneumoniae* ; B3 : *Enterococcus faecalis* ; B4 : *Bacillus Cereus*

**Tableau V.1 :** Diamètres d'inhibitions de la croissance bactérienne par l'EEP.

Souches bactériennes	Boîte 1 (diamètre en mm)			Boîte 2 (diamètre en mm)		
	<i>Bacillus Cereus</i>	10	11	11	10,5	11,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	11.5	15	11	11	12
<i>K.Prenomiae</i>	7.5	7.5	8	10	8.5	9
<i>E.Feocelis</i>	11	9,5	10,5	11	11	10





**Figure V.7.** Histogramme des diamètres d'inhibition de la croissance bactérienne par l'EEP

Les résultats de l'activité antibactérienne d'EEP (Tableau V.1 ; fig. V.6 et fig. V.7) testée *vis-à-vis* les quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*), montrent que l'extrait éthanolique de la propolis présente une activité antimicrobienne sur toutes les souches à Gram négatif à savoir : *Klebsiella pneumoniae* et les souches à Gram positif à savoir : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Entérocooccus faecalis*.

L'extrait de propolis s'est montré plus actif sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) avec des zones d'inhibitions qui varient de 11mm à 15mm, de 10mm à 11.5mm et de 9.5mm à 11mm, respectivement. Sur la bactérie à Gram négatif, notamment *Klebsiella pneumoniae* les valeurs sont moins importantes (7.5 à 10 mm). Ces résultats se concordent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs qui ont montré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram négatif aux extraits de propolis. **Marcucci et al. (2001)** ont rapporté que *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus fecalis* (souches à Gram positif) étaient sensibles aux extraits de propolis contrairement aux bâtonnets à Gram négatif, comme *E. coli*.

Le test d'activité antibactérienne réalisé par **Velazquez et al. (2007)** sur la propolis contre les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Entérocooccus faecalis*, a rapporté que les constituants de la propolis inhibent la croissance de ces deux souches à Gram positif (ce qui est en accord avec nos résultats) et ne présente aucun effet sur la souche *E.coli* (bactérie à Gram négatif) par contre

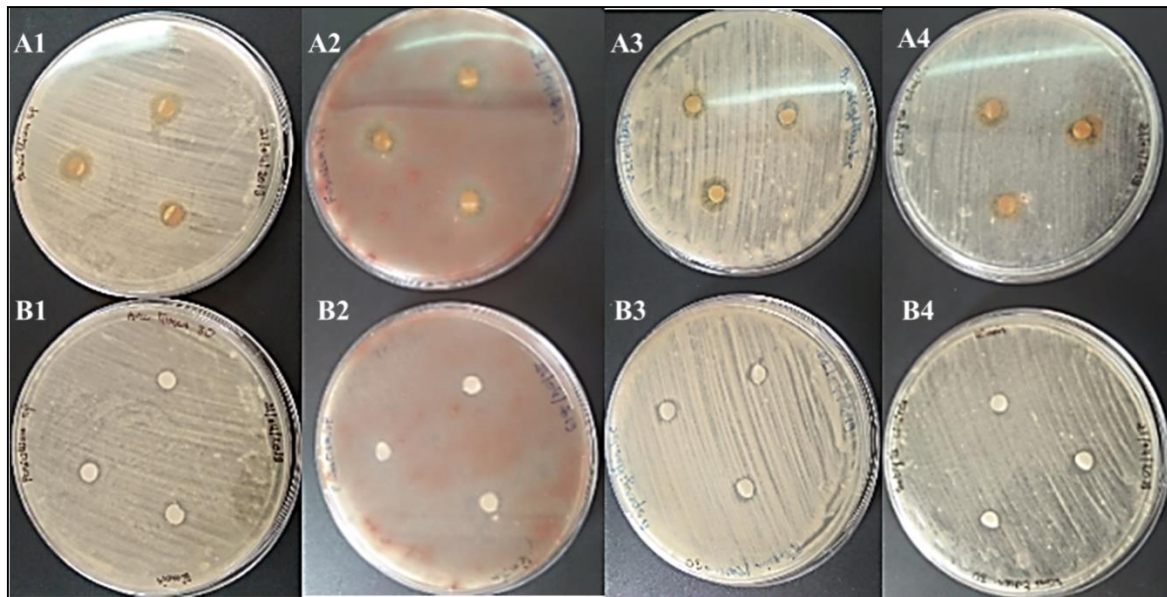
dans notre étude la propolis a inhibé la croissance de la souche à Gram négatif *Klebsiella pneumoniae*.

Nos résultats, sont également en accord avec ceux de **Seguin (2011)** qui ont montré que la propolis algérienne possède un effet inhibiteur important sur *Staphylococcus aureus* (souche à Gram+), alors que sur la souche *Klebsiella pneumoniae* (souche à Gram-) l'effet est moins important. D'autre part, **Drago et al. (2000)** ; **Keskin et al. (2001)** ; **Koo et al. (2000)**, ont rapporté que l'extrait de leur propolis n'as aucun effet sur la souche *Klebsiella pneumoniae* [19]. **Kim et Chung (2011)** ont évalué l'effet antimicrobien de la propolis Koréenne sur des agents pathogènes d'origine alimentaire, y compris les bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) et les bactéries à Gram négatif (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas fluorescense*), par méthode de diffusion sur agar, les résultats ont montré que les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles que les bactéries à Gram négatif. Avec la propolis brésilienne, l'activité est plus importante sur les bactéries à Gram positif, telles que *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis* [23].

La propolis possède une activité antibactérienne en particulier contre les bactéries à Gram positif, cette activité est due aux flavonoïdes et acides aromatiques et aux esters présents dans la résine [24]. La faible sensibilité des bactéries Gram négatif à l'égard de l'extrait éthanolique de la propolis serait due à leur membrane externe qui empêche le passage de la propolis [25]. Ces différences dans l'activité antimicrobienne de la propolis peuvent être liées à son origine botanique, au solvant d'extraction ou aux microorganismes testés [26].

#### **V.1.6. Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait éthanolique de propolis**

Les résultats de test d'activité antifongique sont présentés dans les figures et le tableau ci-dessous :

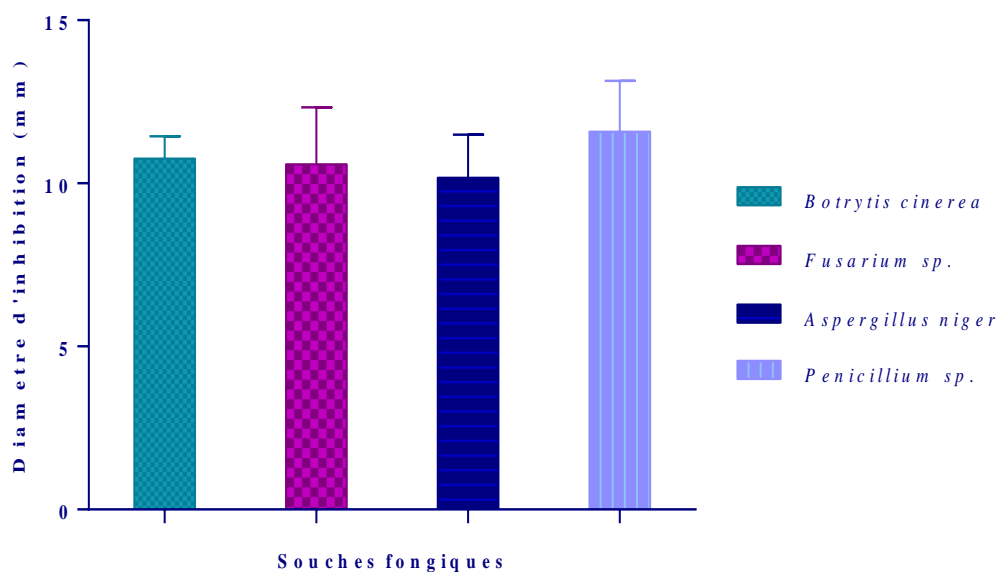


**Figure V.9.** Images du test d'inhibition de la croissance antifongique par EEP.

A : Effet de propolis: A1 : *Penicillium* sp. ; A2 : *Fusarium* sp. ; A3 : *Aspergillus niger* ;  
 A4 : *Botrytis cinerea*. B : Témoins : B1 : *Penicillium* sp. ; B2 : *Fusarium* sp. ; B3 : *Aspergillus niger* ; B4 : *Botrytis cinerea*

**Tableau V.2 :** Diamètres d'inhibitions de la croissance fongique par l'extrait éthanolique de propolis (EEP)

Souches fongiques	Boite 1 (diamètre en mm)			Boite 2 (diamètre en mm)		
	<i>Botrytis Cinerea</i>	10,5	11	11	11,5	11
<i>Fusarium SP</i>	10	9	14	10,5	10	10
<i>Aspergillus Niger</i>	9,5	10	8,5	12,5	10,5	10
<i>Penicillium Sp</i>	11,5	12,5	9,5	13,5	12,5	10



**Figure V.10.** Histogramme de diamètre d'inhibition de la croissance fongique par l'EEP.

Afin d'étudier et d'évaluer l'activité antifongique de l'extrait éthanolique de propolis, quatre souches fongiques dont *Botrytis Cinerea*, *Fusarium sp.*, *Aspergillus niger* et *penicillium sp.* sont utilisés.

Les résultats du test d'activité antifongique illustrés dans le tableau et les figures ci-dessus ont révélé que l'extrait éthanolique de propolis présente une activité antifongique *vis-à-vis* des quatre souches fongiques testées. Les résultats ont montré également que l'EEP était plus actif sur la souche *penicilliumsp.* et *Fusarium sp.* avec des diamètres d'inhibition allant de 9.5 mm jusqu'à 13.5 mm et de 9 mm jusqu'à 14 mm respectivement. Ces extraits se sont montrés moyennement actif sur *Botrytis Cinerea* et *Aspergillus niger* avec des zones d'inhibitions allant de 9.5 mm jusqu'à 11 mm, et 9.5 mm jusqu'à 12.5 mm respectivement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs qui ont montré que l'extrait éthanolique de propolis possède une activité antifongique *vis-à-vis* les champignons testés.

Cela a été confirmé dans une étude similaire à cette présente étude, réalisée par **Paviani et al. (2010)** ainsi que **Bankova (2005)**, ces auteurs ont montré que l'extrait éthanolique de propolis est efficace contre les champignons filamenteux comme les espèces d'*Aspergillus*. Une autre étude menée par **Lima et al. (1998)** a montré l'activité antifongique de propolis *vis-à-vis* *Botrytis cinerea*, ces auteurs ont utilisé la propolis pour inhiber la croissance mycélienne de ce champignon après la récolte des fruits et des légumes. **Castro (2001)** a également rapporté l'effet de la propolis européennes sur *Fusarium*. Cependant, nos résultats sont en désaccord

avec ceux obtenus dans une étude menée par **Ceron et al. (2014)** pour évaluer l'activité antifongique de la propolis colombienne sur la croissance des champignons phytopathogènes (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Botrytis Cinerea*), ces auteurs ont rapporté qu'*Aspergillus niger* était le champignon le plus sensible suivi de *Penicillium* sp. et de *Botrytis cinerea*.

Les différences d'activité antifongique d'extrait de propolis peuvent être attribuées aux différences de composition chimique et à la concentration de l'extrait utilisé [31] d'une part, et d'autre part à la région botanique et aux conditions climatiques de la région de la propolis utilisée, mais aussi à la méthode de la récolte et à la race de l'abeille. L'effet fongique de l'extrait éthanolique de propolis a été associé à la présence des flavonoïdes et d'autres composés phénoliques [32].

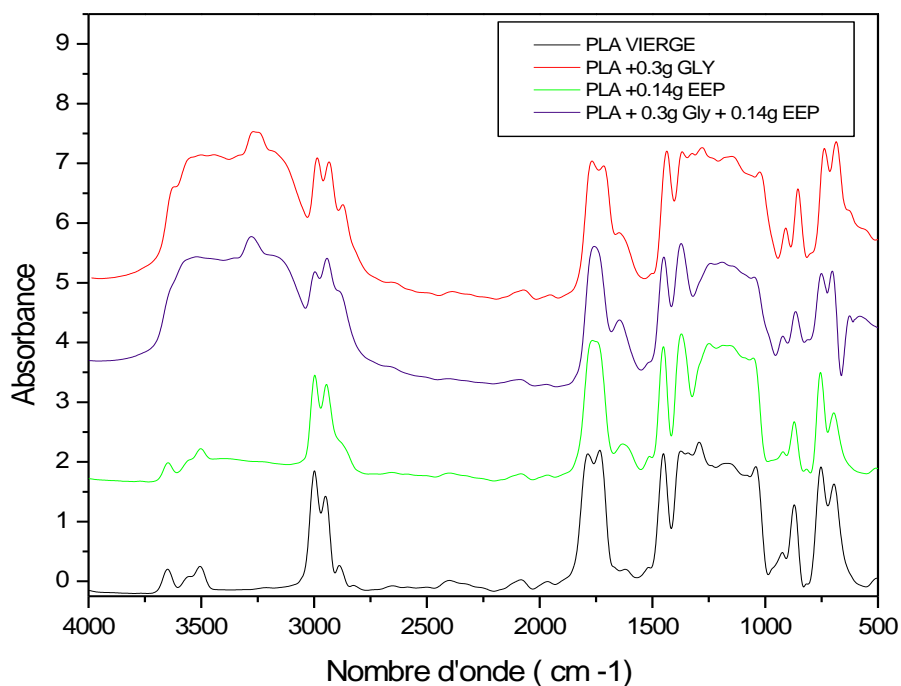
## V.2. Films PLA / EEP

### V.2.1. Analyse spectrométrique à transformation de Fourier IR

La figure (V.12) représente les spectres IR-FT des films à base de PLA et d'extrait de propolis en présence et en absence de glycérol. Les spectres des films à base de PLA ont révélé la présence de plusieurs pics ainsi que des bandes d'absorption, on cite notamment :

- Deux pics centrés situés à 3000  $\text{cm}^{-1}$  et 2960  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongations de la liaison -CH ;
- Deux pics situés à 1700  $\text{cm}^{-1}$  et 1760  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongations des groupements carbonyles -C=O ;
- Un pic centré est situé à 1450  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'élongations des liaisons -C-H ;
- Une bande d'absorption centrée à 1280  $\text{cm}^{-1}$  attribués aux vibrations d'élongation des liaisons-C-O ;
- Un pic situé à 1040  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des liaisons -C-O ;
- Un pic centré situé 867  $\text{cm}^{-1}$  est attribué aux vibrations des liaisons -C-C ;
- Apparition de deux bandes d'absorptions centrées à 3650  $\text{cm}^{-1}$  et 3500  $\text{cm}^{-1}$  qui sont attribués aux vibrations d'élongations des groupements alcools et phénols de l'extrait éthanolique de propolis.
- Apparition d'une bande d'absorption centrée à 3280  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des liaisons O-H alcool du glycérol ainsi de l'extrait éthanolique de propolis ;

- Apparition d'une large bande d'absorption située aux alentours 1660 -1580  $\text{cm}^{-1}$  attribuée aux vibrations d'élongations des groupements C=C aromatiques de l'extrait éthanolique de propolis ;
- Apparition d'un pic centré à 1370  $\text{cm}^{-1}$  attribué aux vibrations d'élongations des groupements nitro C-NO<sub>2</sub> aromatiques à l'extrait éthanolique de propolis [33] .



**Figure V.12.** Spectres IR-TF de quatre types de films.

### V.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion sur agar (en surface et en masse) nous a permis de vérifier le pouvoir antibactérien des films PLA/EEP/GLY vis-à-vis les souches bactériennes choisies (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* et *Staphylococcus aureus*).

Les résultats de l'activité antibactérienne des films PLA/EEP/GLY à des différentes quantités d'EEP et de GLY sont représentés dans les figures ci-dessous :



**Figure V.13.** Résultats d'inhibition de la croissance bactérienne par les films PLA/EEP

Dans cette étude, les films PLA/EEP/GLY aux différentes quantités d'EEP et de GLY, n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Rezaeigolestani et al., (2017)**, malgré que l'EEP est actif contre les souches testées mais les films PLA/EEP n'ont présenté aucun effet antibactérien. Selon les précédents ouvrages publiés, des combinaisons de PLA avec des substances antibactériennes hydrophiles étaient moins efficaces contre les bactéries testées. **Khodayari et al. (2018)** ont également rapporté l'absence de l'activité antibactérienne des films par la méthode de diffusion. Les films de PLA contenant uniquement l'EEP ne présentent aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches bactériennes, malgré les divers rapports sur l'activité antibactérienne de la propolis. Cela est peut être associé à une mauvaise adhésion interfaciale entre la propolis qui contient des molécules hydrophiles et le PLA hydrophobe, conduisant à des propriétés antimicrobiennes faibles. De même, **Jin et al (2009)** ont rapporté que l'association de PLA avec la nisine n'avait pas d'effet antibactérien significatif, en raison de la nature hydrophobe du PLA et d'une liaison limitée à la nisine hydrophile.

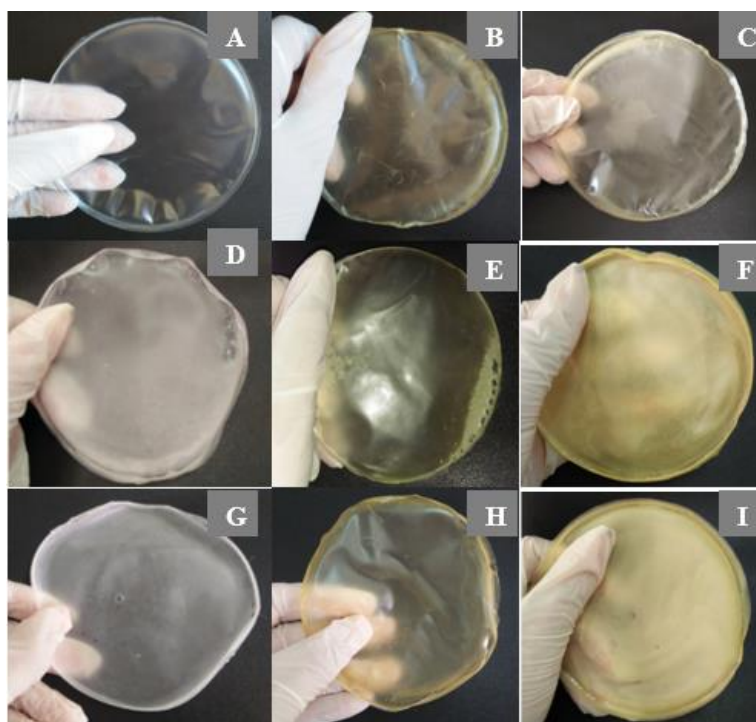
L'absence de l'activité peut être expliqué également par la nature de l'extrait, la variété des plantes, les protocoles d'extraction ou la région de la récolte qui influence de manière significative sur les activités biologiques des extraits. En plus la nature chimique du PLA peut être à l'origine de l'inactivation de notre extrait qui s'est avéré très actif vis-à-vis toutes les souches bactériennes testées.

### V.2.3. Réalisation des essais de la matrice d'expériences

A partir de la matrice d'expérience obtenue, 12 essais (films) ont été réalisés selon le protocole décrit en amont. Par suite, deux tests ont été effectués sur ces derniers ; Module de Young et test d'absorption d'eau. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.3.

**Tableau V.3.** La matrice d'étude complète.

Essai	Extrait de propolis (g)	Glycérol (g)	Module de Young (N/ mm <sup>2</sup> )	Test d'absorption (%)
01	0	0	3303.82	0
02	0.07	0	2588.13	0
03	0.14	0	1606.88	3.7
04	0	0.15	2208.46	12.5
05	0.07	0.15	1642.09	6.89
06	0.14	0.15	1839.69	3.57
07	0	0.3	1631.08	13.63
08	0.07	0.3	1447.74	13.63
09	0.14	0.3	1669.45	3.22
10	0.07	0.15	1642.08	6.89
11	0.07	0.15	1642.08	6.89
12	0.07	0.15	1642.08	6.89

**Figure V.14.** Photographie des films obtenus PLA / EEP obtenue par casting .

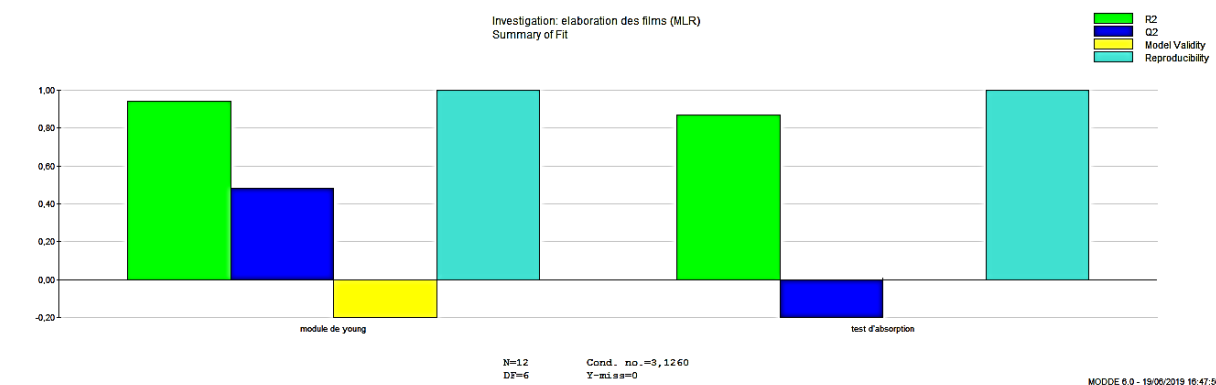
**A :** PLA vierge ; **B :** PLA + 0.07 g EEP ; **C :** PLA +0.14 g EEP ; **D :** PLA + 0.15 g Gly ;  
**E:** PLA + 0.07 EEP + 0.15 Gly;**F:** PLA + 0.15 g Gly + 0.14 g EEP;**G:** PLA + 0.3g Gly; **H :**  
 PLA +0.07 g EEP+0.3 g Gly ; **I :** PLA +0.3 g Gly +0.14 EEP.



## V.2.4. Analyses globales des résultats

### V.2.4.1. Analyses statistiques

La figure V.15 représente en résumé les facteurs statistiques obtenus



**Figure V.15.**facteurs statistiques obtenus.

Afin de mieux exploiter ces résultats, les valeurs numériques des caractéristiques statistiques sont résumées dans le tableau (V.4).

**Tableau V.4.** Valeurs numériques des caractéristiques statistiques.

Réponses	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Reproductibilité
<b>Module de Young</b>	0.893	0.484	0.942
<b>Test d'absorption d'eau</b>	0.763	-0.259	0.871

### V.2.4.2. Exploitation des résultats

Les paramètres statistiques R<sup>2</sup> et Q<sup>2</sup> traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus. Lorsque ces deux derniers tendent vers l'unité, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse totalement. En revanche lorsque R<sup>2</sup> ou Q<sup>2</sup> tendent vers 0, alors le modèle ne peut être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses.

D'après le tableau (V.4) on déduit :

Pour le module d'Young les deux paramètres R<sup>2</sup>=0.893 et Q<sup>2</sup>= 0.484 sont acceptables, cela veut dire que le modèle obtenu explique et prédit les pourcentages des facteurs (quantité d'extrait de propolis et quantité de glycérol).

Pour le test d'absorption d'eau les deux paramètres ont des valeurs R<sup>2</sup> = 0.763 et Q<sup>2</sup> = -0.259, cela veut dire que le model obtenu explique mais ne prédit pas avec certitude les valeurs optimisés.

Reproductibilité : pour les réponses nous avons des valeurs élevées, cela indique une maîtrise lors de la préparation des films, étant donné que les paramètres figés, autres que ceux qui font l'objet du plan d'expérience, n'ont aucune influence sur les résultats obtenus.

➤ **Modèle mathématique proposé**

Après modélisation le logiciel MODDE 6, nous a proposé deux équations qui prédisent l'influence des facteurs utilisés sur les deux réponses choisies ;

Pour le module de Young :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2 X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2.$$

$$Y = 1699.94 - 337.89 x_1 - 458.426 x_2 + 433.827x_1x_2 + 208.432x_1^2 + 202.292x_2^2.$$

1- Pour le test d'absorption d'eau :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12} X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2.$$

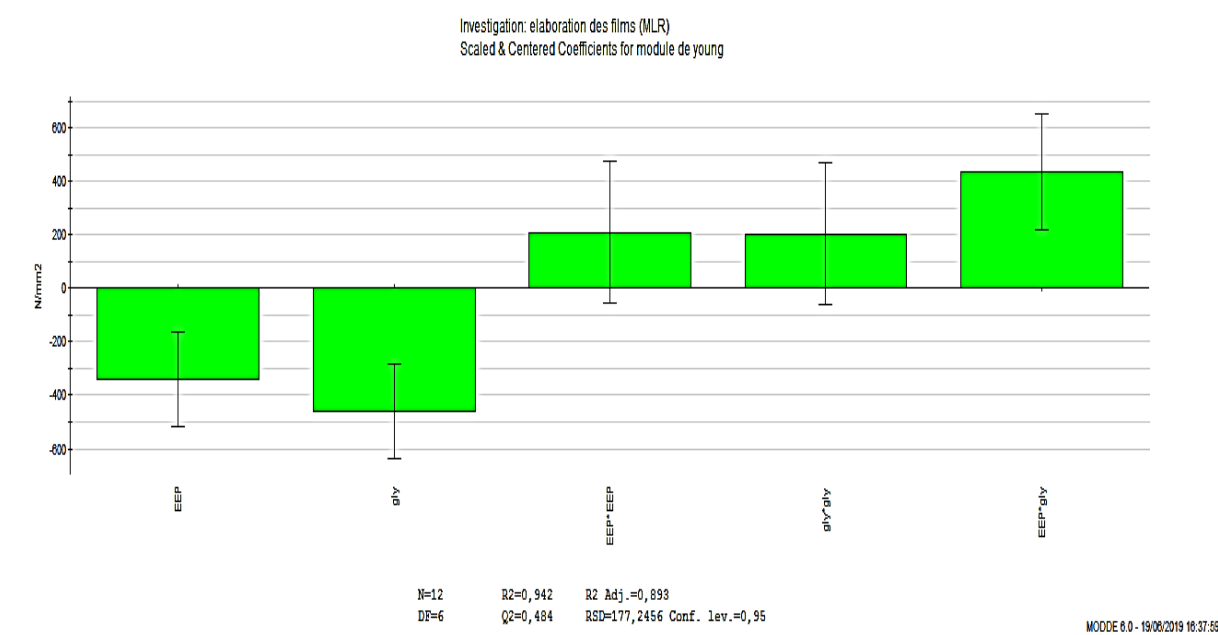
$$Y = 7.36042 - 2.60667 x_1 + 4.46333x_2 - 3.5275x_1x_2 - 0.26625x_1^2 - 1.48625 x_2^2.$$

Avec :  $x_1$  = quantité de l'extrait de polipolis ;  $x_2$  = quantité de glycérol.

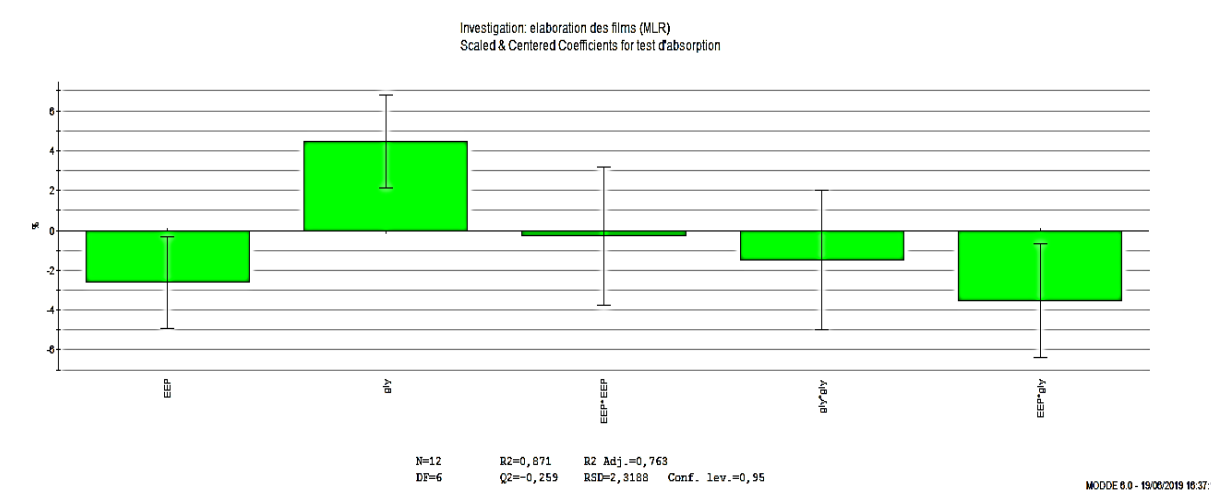
**V.2.4.3. Analyses des effets propres des facteurs sur les réponses**

➤ **Etude des effets propres**

Les figures (V.16) et (V.17) représentent respectivement les effets propres des facteurs sur les deux réponses ; Module de Young et Test d'absorption d'eau.



**Figure V.16.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le module de Young



**Figure V.17.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le Test d'absorption d'eau.

#### V.2.4.4. Interprétation des histogrammes

La figure (V.16) montre que :

L'EEP influence positivement sur la réponse, car il présente une décroissance significative de module d'Young des films. Autrement dit une diminution significative de module d'élasticité a été observée chez les films contenant d'EEP. Cela peut être expliqué par l'incorporation d'EEP qui joue le rôle d'un plastifiant cela a été confirmé par de nombreux travaux [33]. L'incorporation des huiles essentielle à base de plante ou leurs constituants majeurs aux matériaux d'emballage a été étudiée par **Javidi et al. (2016)** ; **Tawakkal et al. (2014)**, ces études ont indiquées que l'addition des composants de plantes tel que les huiles essentielles ont entraîné une réduction de module d'élasticité ,la présence de ces constituants dans la matrice de film facilite le mouvement des chaînes polymères adjacentes et améliore la flexibilité du composite [49] .Ce phénomène, qui est connu sous le nom d'effet plastifiant, rend les polymères rigides (comme le PLA) plus flexible [34].

Le glycérol influence positivement sur la réponse, car il présente une décroissance significative de module d'Young des films. Cette diminution de module d'élasticité est due au phénomène de plastification (le glycérol est un plastifiant).

L'effet d'interaction « EEP - GLY » est négatif sur la réponse, car il présente une croissance de module d'Young. Cela peut être expliqué par la saturation au niveau des films (molécules de PLA, GLY et EEP qui se lient entre eux).

L'effet d'interaction « EEP - EEP » est négatif sur le module d'Young, de même l'effet de l'interaction« GLY - GLY » est négatif, car ils présentent une croissance de module d'élasticité,

ce qui est en contradiction avec les 1<sup>er</sup> résultats mais comme on le constate sur la figure (V.16) les erreurs de ces deux interactions sont très importantes donc ces résultats peuvent être considérés comme non significatifs.

La figure (V.17) montre que :

L'EEP influence positivement sur la réponse car il présente une décroissance significative de taux d'absorption d'eau des films.

L'absorption d'eau est l'un des paramètres les plus importants dans la sélection des emballages alimentaires, de nombreuses réactions de détérioration chimiques, physiques et biologiques pendant le stockage des aliments sont directement liées à l'eau. Donc plus le taux d'absorption est décroissant mieux c'est. Plusieurs auteurs [35,34] ont montré que la propolis est une barrière à l'eau [40] et ont signalé que le revêtement de PLA avec différentes couches de la cire d'abeille (partie principale de la propolis) a amélioré les propriétés de barrière à l'eau.

Le glycérol influence négativement sur la réponse car il présente une croissance significative de taux d'absorption d'eau des films. Cela peut être expliqué par la nature hydrophile du glycérol (les groupements hydroxydes OH).

L'effet d'interaction « EEP - GLY » influence positivement sur la réponse car il présente une décroissance significative de taux d'absorption d'eau. Cela peut être expliqué par les interactions entre la matrice PLA et le GLY et les composés phénoliques de la propolis qui peuvent réduire les espaces libres dans le polymère ce qui a pour effet de restreindre le passage de l'eau et d'inhiber la sorption d'eau [33].

L'effet d'interaction « EEP - EEP » est positif sur le taux d'absorption, de même l'effet de l'interaction « GLY - GLY » est positif, car ils présentent une décroissance de taux d'absorption d'eau.

Comme on le constate sur la figure (V.17) les erreurs de ces deux interactions sont très importantes donc ces résultats peuvent être considérés comme non significatifs.

D'après les résultats obtenus, le modèle devient alors :

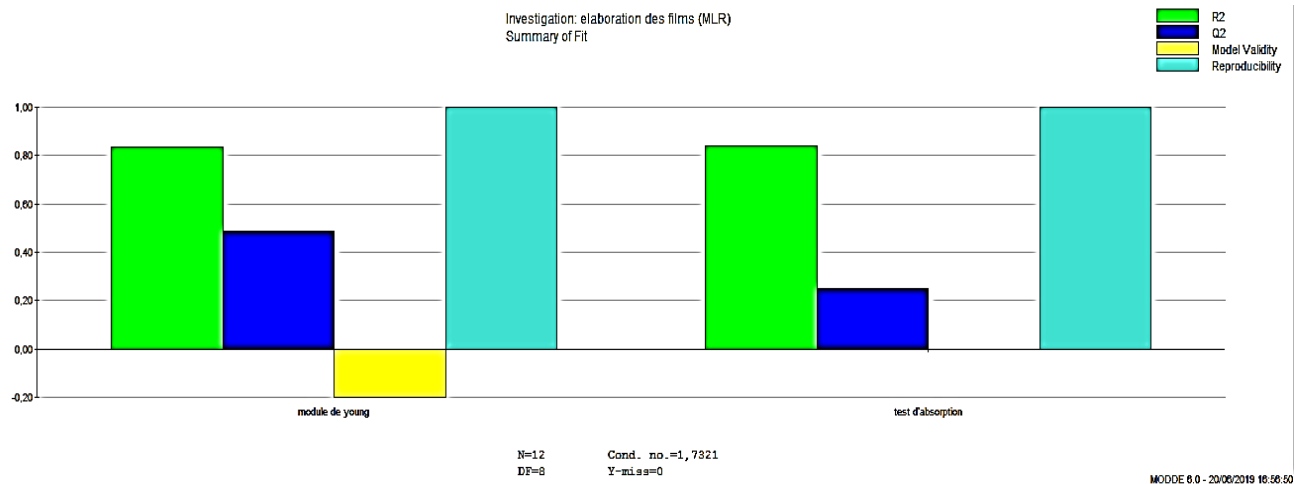


Figure V.18. Facteurs statistiques obtenus.

Tableau V.5. Valeurs numériques des caractéristiques statistiques.

Réponses	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Reproductibilité
Module de Young	0.776	0.485	0.837
Taux d'absorption d'eau	0.781	0.249	0.840

D'après le tableau V.5 on déduit :

Pour le module d'Young les deux paramètres  $R^2 = 0.779$  et  $Q^2 = 0.485$  sont acceptables, cela veut dire que le modèle obtenu explique et prédit les pourcentages des facteurs (quantité d'extrait de propolis et quantité de glycérol).

Pour le test d'absorption d'eau les deux paramètres ont des valeurs  $R^2 = 0.781$  et  $Q^2 = 0.249$ , cela veut dire que le modèle obtenu explique mais ne prédit pas les valeurs optimisées.

#### V.2.4.5. Modèle mathématique proposé

Les deux équations qui prédisent l'influence des facteurs utilisés sur les deux réponses choisies ;

Pour le module de Young :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

$$Y = 1699.94 - 337.89x_1 - 458.426x_2 + 433.827x_1x_2.$$

Pour le test d'absorption d'eau :

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12} x_1x_2$$

$$Y = 7.36042 - 2.60667 x_1 + 4.46333x_2 - 3.5275x_1x_2.$$

Avec :  $x_1$  = quantité de l'extrait de propolis ;  $x_2$  = quantité de glycérol.

L'influence d'extrait de propolis et de glycérol sur le module d'Young et du taux d'absorption d'eau est représentée sur les figures ci-dessous :

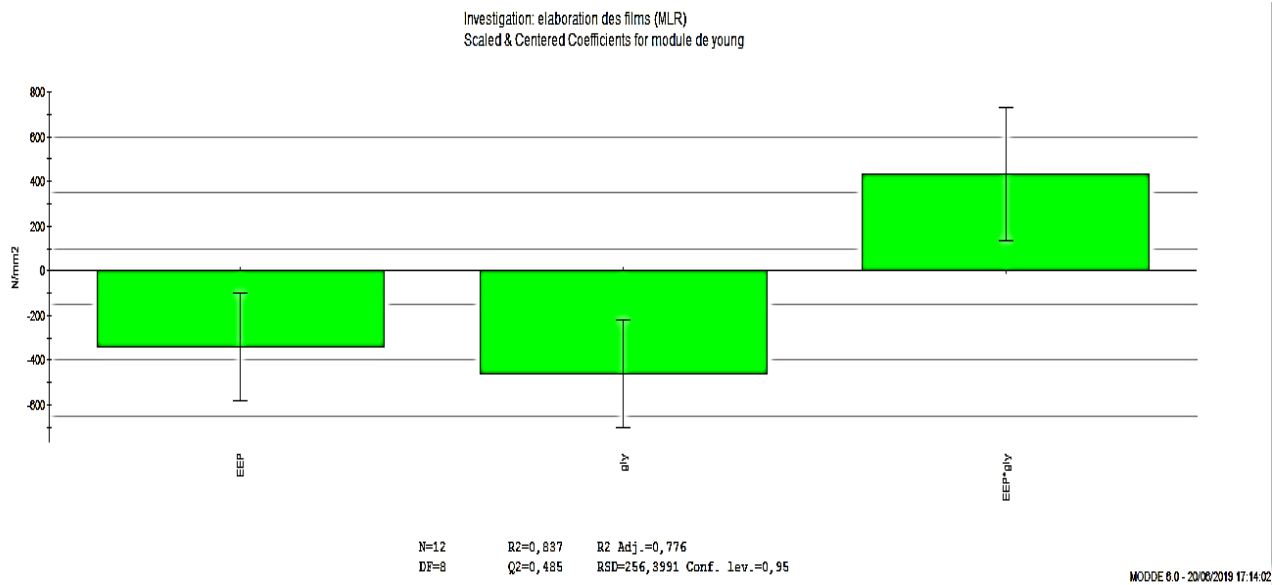


Figure V.19. Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le module de Young

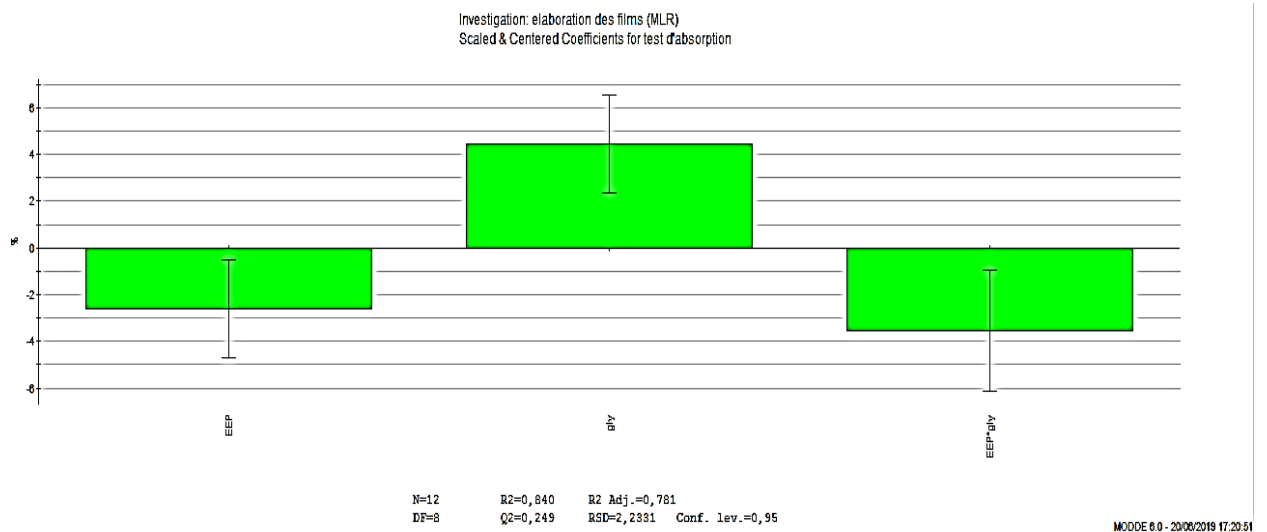


Figure V.20. Histogramme représentant l'influence des facteurs sur le Test d'absorption d'eau

### V.2.4.6. Détermination et validation de l'optimum

En utilisant les équations de modélisation, le logiciel nous propose un optimum et un domaine d'optimalité (tableau V.6).

#### V.2.4.6.1. Détermination de l'optimum

**Tableau V.6.** Valeurs cibles de module d'Young et de test d'absorption d'eau.

	Response	Criteria	Weight	Min	Target	Max
1	module de young	Minimize	1		1261,71	1440,16
2	test d'absorption	Minimize	1		0,300917	1,89908

**Tableau V.7.** Détermination de l'optimum.

extrait de propolis	glycérol	module de young	test d'absorption	iter	log(D)
0,0525	0	2556,65	1,7906	94	1,4275
0,06	0,3	1433,19	11,8225	97	1,4224
0,14	0	1592,01	2,9417	128	0,4883
0,14	0,1395	1569,14	3,8118	98	0,5907
0,14	0	1592	2,942	161	0,4883
0,0525	0	2556,65	1,7906	94	1,4275
0,06	0,3	1433,19	11,8225	97	1,4224
0,07	0,3	1446,87	10,9475	125	1,3566

-Les résultats montrent que pour avoir l'optimum, il est préférable d'utiliser l'extrait de propolis sans glycérol avec une quantité de 0.14 g d'extrait de propolis, qui représente une meilleure élasticité et un taux d'absorption d'eau minimisé pour les films.

#### V.2.4.6.2. Validation et caractérisation du film optimal

Nous avons préparé un film optimal suivant le protocole cité précédemment en utilisant les conditions suivantes :

Matières	Chloroforme	PLA	EEP
Quantité	50 ml	1g	0.14g

Par la suite nous avons déterminé l'allongement et la contrainte à la rupture, le module d'Young ainsi que le taux d'absorption d'eau.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau .V.8.** Caractéristiques du film optimal.

<b>Paramètres</b>	<b>l'allongement à la rupture (%)</b>	<b>Contrainte à la rupture (%)</b>	<b>Module d'Young (N/ mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Taux d'absorption d'eau (%)</b>
<b>Valeurs</b>	39.27	29.45	1594.16	3



**Bibliographie**

- [1] : Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. (1970) .The Ultraviolet spectra of Flavones and Flavonols. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [2] : Segueni N. (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis, thèse de doctorat, université Mensouri de Constantine.
- [3] : De Lima GG, De Souza RO, Bozzi AD, Poplawska MA, Devine DM, Nugent MJD. (2016). Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-Loaded Hydrogels. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 ,1248-1257.
- [4] : Bankova VS, Castro SL et Marcucci MC. (2000).Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- [5] : Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. (2008). Antioxidant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, 46, 3482-3485.
- [6]: Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Kwon H. W, Perumalsamy H , Ahn Y.J. (2016).Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 65.
- [7]: Tousani S, Al-Waili N, El Menyiy N, Filipic B ,Pereyra A, El Arabi I, Al-Waili W et Lyoussi B.(2018).Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Medecine*, 1,634.
- [8]: Righi A. A, Negri G, Salatino A. (2013).Comparative chemistry of propolis from Eight Brazilian localities. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.1-14.
- [9]: Hernandez Zazate M, Abraham Juarez M, Ceron Garcia A, Ozuna Lopez C, Gutierrez Chavez AJ, Segoviano Garfias JJN , Avla Raos F.(2018).Flavonoids ,phenolic contents and antioxidant activity of propolis from various area of Guanajuato,Mexico.*Food science and technologie*.Vol.38 no.2.
- [10] : Bankova V. (2005) .Chemical Diversity of propolis and the problem of Srtandardization .*Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117.

- [11] :Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N.( 2013) .Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut ( *Cynara Scolymus L*) .Nature & Technologie
- [12] : Ratajczak I, Waskiewicz A, Wozniak M, Mrowczynska L, Rogozinski M. (2019) .The role of seasonality on the chemical composition, antioxydant activity and cytotoxicity of polish propolis in human erythrocytes .Revista Brasileira de Farmacognosia.
- [13] : Ferhoum F. (2010).Analyses physicochimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeilles locales (*Apis mellifica intermissa* et *apis mellifica sahariensis*), Mémoire de Magister, université M'hamed Bougara Boumerdes.
- [14] : castroML,Nascimento AM, Ikegari M, Costa-Neto CM, Alencar SM , Rosalen PL .(2001) .Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type6.Biorganic and medical chemistry ,17, 5332-5335.
- [15] :Mohammdi Z. (2004) .Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen .Thèse de magister, option produit naturel, activités biologiques et synthèse.
- [16] : Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S, Tamendjari A. (2016) .Antioxydant activity of some algerian honey and propolis .Industrial Crops and Products, 88, 85-90.
- [17] : Marcucci M.C , Ferreres F ,García-Viguera C, Bankova V.S ,De Castro S.L, Dantas A.P, Valente P.H.M , Paulino N .(2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.Journal of Ethnopharmacology, 74,105-112.
- [18]: Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, Robles-Zepeda R, Lugo E, Goycoolea F.M ,Velazquez E.F, Astiazaran H et Hernandez J.(2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. Journal of Applied Microbiology, 103, 1747–1756.
- [19]: Drago L, Mombelli B.D.E, Vacchi E, Fassina M.C, Tocalli L et Gismondo M.R.(2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. Journal of Chemotherapy ,12 (5), 390-5.
- [20]: Keskin N, Selc U.K.H , Husnucan Baser K et Mine Kurkc U.(2001). Antibacterial and chemical composition of Turkish propolis, Zeitschrift für Naturforschung 56C, 1112-1115.
- [21]: Koo H, Gomes B.F.A , Rosalen P.L, Amberasano G.M.B , Park Y.K et Cury J.A (2000). In vitro antimicrobiol activity on propolis and *Arnica-montana* against oral pathogens.

Archives of Oral Biology, 45 (2), 141-148.

[22]: Kim Y.H, Chung H.J. (2011). The effect of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New biotechnology*, 28,713-718.

[23]: Syed Ishtiaq Anjum , Amjad Ullah , Khalid Ali Khan , Mohammad Attaullah, Hikmatullah Khan ,Hussain Ali , Muhammad Amjad Bashir, Muhammad Tahir , Mohammad Javed Ansari, Hamed A. Ghramh , Nuru Adgaba , Chandra Kanta Dash.(2018).Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

[24] : Marcucci MC , Ferreres F ,Garcia-Viguera C, Bankova VS ,De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM , Paulino N .(2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.*Journal of Ethnopharmacology*, 74,105-112.

[25]: Tegos G, Stermitz F.R, Lomovskaya O, Lewis K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (10), 3133-3141.

[26]: Ugur A, Arslan T. (2004). An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7, 90-4.

[27] :Paviani LC, Dariva C, Marcucci MC, Cabral FA. (2010) .Supercritical Carbon Dioxide Selectivity to Fractionate Phenolic Compounds from the Dry Ethanolic Extract of propolis .*Journal of Food Process Engineering*, 33, 15-27.

[28] : Lima G, De Curtis F, Castoria R, Pacifica S, De Cicco V. (1998) .Additives and natural products against post harvest pathogen compatibility with antagonistic yeasts .*Journal of Plant Pathology*, 80, 259.

[29] : Castro ML, Nas scimento AM do, Ikegaki M, Costa-Nito CM, Alencar SM,Rosalen PL .(2001) .Identification of a bioactive compound isolated from brazilian propolis type 6. *Bio organic and medicinal chemistry* , 17, 5332-5335.

[30] : Quintero-Ceron JP, Vaquiro HA, Solanilla JF, Murillo E, Mendez JJ. (2014).In vitro fungistatic activity of ethanolic extract of propolis against postharvest phytopathogenic fungi : preliminary assessment . *Actividad Fungistatica in vitro del extracto Etanolico del propoleo en el control de hongos fitopatogenos en poscosecha : Estudio preliminar* .*Acta Horticulturae*, 1016,157-162.

- [31] : Silici S , Kutluca S.( 2005) .Chemical Composition and Antibacterial Activity of Propolis Collected by Three Different Races of Honeybees in the Same Region .Journal of Ethnopharmacology , 99, 69-73
- [32] : Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AEE. (2009). Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. Genetics Molecular Research, 8, 635-640.
- [33] : Ulloa P, Vidal J, Lopéz de Dicastillo C, Rodriguez F, Guarda A, Cruz RMS, Galotto MJ (2018). Development of poly (lactic acid) films with propolis as a source of active compounds : Biodegradability, physical, and functional properties. Journal of applied polymer science, 136, 1-11.
- [34]: Rezaeigolestania M, Misaghia A, Khanjaria A, Akhondzadeh Bastia A, Abdulkhanib A , Fayazfara S.(2017). International Journal of Food Microbiology, 260, 1-10.
- [35]: Khodayri M, Basti AA, Khanjari A,Misaghi A, Kamkar A, Shotorbani PM , Hamedi H.(2018).Effect of poly(lactic acid) films incorporated with different concentrations of Tanacetum balsamita essential oil,propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages. Food packaging and shelf life, 19,200-209.
- [36]: Jin T, Liu L, Zhang H, Hicks K. (2009). Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Science & Technology, 44, 322–329.
- [37] : Javidi Z, Hosseini S.F et Rezaei M. (2016). Development of flexible bactericidal films based on poly (lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. LWT Food Science and Technology, 72, 251–260.
- [38]: Tawakkal ISMA, Cran, M.J., Bigger, S.W., 2014. Effect of kenaf fibre loading and thymol concentration on the mechanical and thermal properties of PLA/kenaf/ thymol composites. Ind. Crop. Prod. 61, 74–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.032>.
- [39]: Rhim, J.W., Mohanty, A.K., Singh, S.P., Ng, P.K.W., 2006. Effect of the processing Methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent Casting. Journal of Applied Polymer Science, 101, 3736–3742.
- [40]: Martínez-Abad A, Lagarón JM, Ocio MJ. (2014). Antimicrobial beeswax coated polylactide films with silver control release capacity. International Journal of Food Microbiology, 174, 39–46.

# *Conclusion Générale*

## ***Conclusion Générale***

Ce travail de recherche s'est concentré sur la production de matériaux à base d'extrait éthanolique de propolis en vue d'une potentielle utilisation comme matériaux d'emballage alimentaire à caractère antibactérien. Pour ce faire, l'évaluation des propriétés antibactériennes de l'extrait éthanolique a d'abord été effectuée.

D'après les résultats obtenus, on a montré que l'extrait éthanolique de propolis possède un effet antibactérien et antifongique vis-à-vis les souches bactériennes et fongiques testés.

Dans un second lieu, l'optimisation des conditions de préparation d'un emballage alimentaire ayant les propriétés désirée à savoir : les propriétés mécaniques et l'absorption d'eau a été étudiée. Ce plan a permis d'optimiser ces paramètres et de réduire le nombre d'expériences à réaliser.

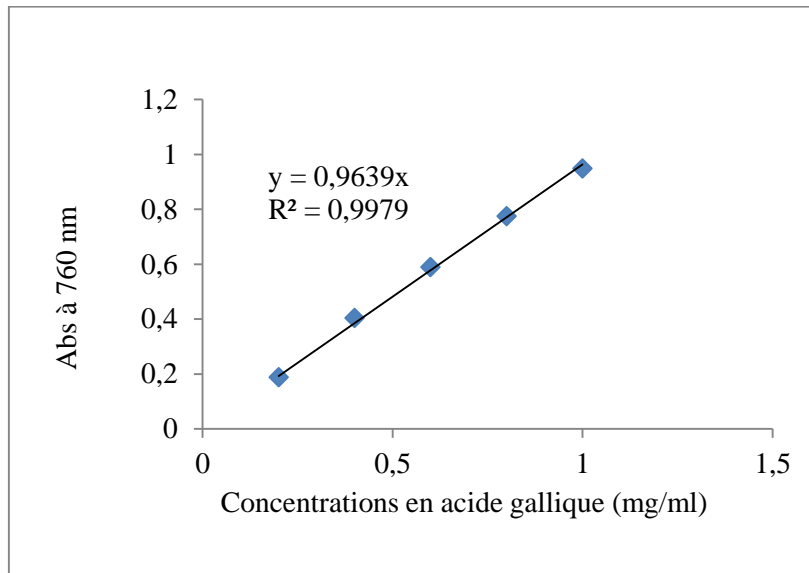
Les résultats de l'optimisation affirment que le modèle est significatif avec des valeurs réelles qui sont très proches de celles prédites, avec un coefficient de corrélation  $R^2$  égale à 0.776 pour le module d'Young et 0.781 pour le taux d'absorption d'eau.

L'étude montre que la production des films d'emballage à base de PLA et extrait de propolis est très influencée par les facteurs étudiés à savoir quantité de glycérol ainsi que quantité de l'extrait de propolis. L'optimum de ces facteurs établis par le plan est de 0.14 g EEP. Cependant l'activité antibactérienne reste à améliorer dans les prochaines études.

# Annexes

## Annexe I : Courbes d'étalonnage

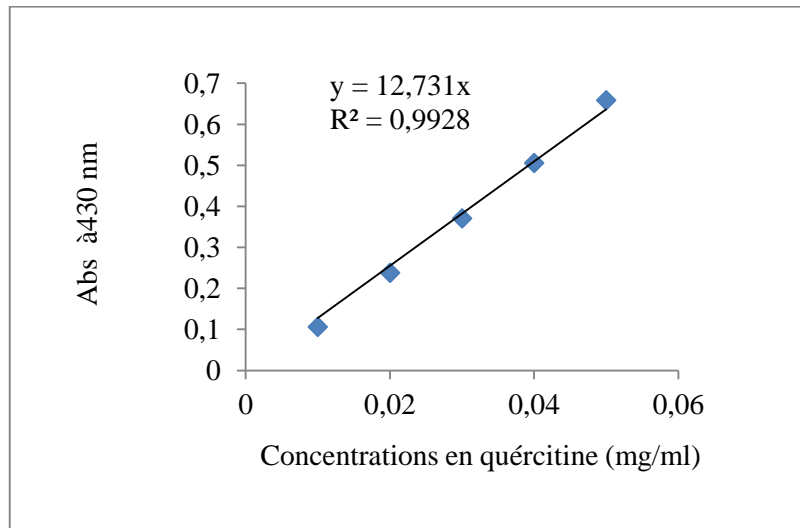
- courbe d'étalonnage des composés phénoliques





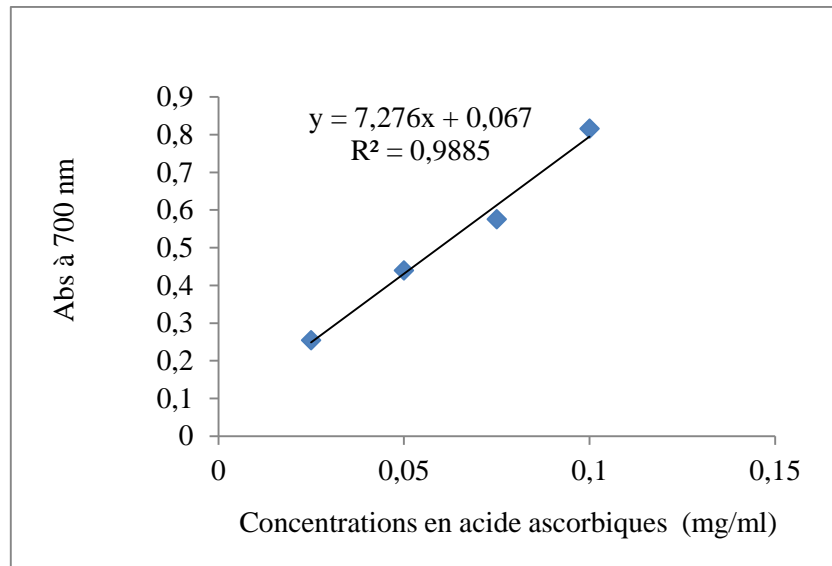
## Annexe II: Courbe d'étalonnage

- Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



### Annexe III: courbe d'étalonnage

- Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur



## ***Résumé***

L'objectif de ce travail est d'élaborer un matériau d'emballage alimentaire à base de PLA et d'extrait éthanolique de la propolis. Tout d'abord, l'extrait éthanolique de propolis utilisé comme principe actif dans les films est soumis à différentes analyses : spectroscopie UV-visible, caractérisation structurale par IRTF, évaluation de l'activité antioxydante ; antibactérienne et antifongique. Ensuite, Les films de PLA / EEP ont été préparés par voie casting en utilisant un plan d'expérience factoriel complet à trois niveaux qui nous a permis d'étudier les paramètres influant sur le module d'Young et le taux d'absorption d'eau. Les films sont soumis à plusieurs analyses : caractérisation structurale par IR-TF, Module d'Young et la variation du taux d'absorption d'eau. Ces films ont été également testés pour leur effet antibactérien en utilisant deux méthodes : méthode d'ensemencement en surface et en masse à l'égard de *staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Eshrichia coli*, *Pseudomonas aeuroginosa* et *Salmonella retrica*. Les résultats obtenus ont montrés que les films élaborés n'ont aucun effet inhibiteur contre les souches testés. Au final, nous avons obtenu un film optimal qui peut constituer un emballage alimentaire aux conditions suivantes : Quantité de l'extrait de propolis : 0.14 g, Module de Young : 1594.16 N/mm<sup>2</sup>. Taux d'absorption d'eau : 3 %, Contrainte à la rupture : 29.45 % et Allongement à la rupture : 39.27 %.

## ***Abstract***

The objective of this work is to develop a food packaging material based on PLA and ethanol propolis extract. First, the ethanolic extract of propolis used as active principale in the films is subjected to various analyzes : UV-visible spectroscopy, structural characterization by FTIR, evaluation of the antioxidant activity. PLA /EEP films were prepared by casting using a three level full factorial design that allowed us to study the parameters influencing Young's modulus and water absorption. The films are subjected to several analyzes : structural characterization by FTIR, Young's modulus and the variation of the rate of absorption of water. These films were also tested for their antibacterial effect by using two methods : Seeding method in surface and mass with respect to *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Eschrichia Coli*, *Pseudomonas aeroginosa* and *Salmonella retrica*. The results obtained have shown that the films produced have no inhibitory effect against the strains tested. In the end, we have obtained an optimal film which can constitute a food packaging with the folowing conditions : Amount of propolis extract : 0.14g, Young's modulus : 1594.16 N/mm<sup>2</sup>, Water absorption rate : 3%, Breaking stress : 29.45%, Elongation at break : 39.27%.