



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb - Blida
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Biotechnologies
Laboratoire de recherche de plantes médicinales et aromatiques



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

Master

Option : Biotechnologies et valorisation des plantes

Thème

**Etude phytochimique de la propolis
algérienne et sa valorisation dans les
domaines phyto-thérapeutique et cosmétique**

Présenté par :

Bandaoui wafa Belhachemi Hiba

Soutenu devant le jury composé de :

Mme Faidi H.	MAB	Présidente
MME Belguendouz R.	MCB	Promotrice
Mme Chebata N.	MAA	Examinatrice

Année universitaire 2018-2019

REMERCIEMENTS

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant pour nous avoir donné le savoir, la force et la patience, pour poursuivre nos études et achever ce mémoire.

De prime abord nous tenons à remercier très chaleureusement Mme Belguendouz Maitre de conférences pour son encadrement, ses conseils et ses encouragements. Grâce à elle que nous avons progressé et acquis la rigueur nécessaire pour appréhender ce projet. Tout en étant toujours présent et disponible, elle a toujours su nous laisser une grande liberté dans notre travail ce qui nous a permis de développer une réelle autonomie. Encore merci !

Nous tenons à remercier, Mme. Elizaar F. notre Co-promotrice, pour sa fourniture d'échantillon de propolis de Naâma, ses conseils, ses discussions enrichissantes, ses orientations et ses encouragements.

C'est un grand merci que nous adressons à Mr Ghriebi Youcef responsable de l'association des apiculteurs à l'Université Saad Dahleb Blida-1 pour sa fourniture d'échantillon de propolis de Blida, son effort moral qui nous a donné la force d'atteindre la fin de cet humble travail.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Brahim Tirichine et le laboratoire d'hygiène à Blida ainsi que le laboratoire de recherche de plantes médicinales et aromatiques, département de biotechnologie qui ont contribués chacun pour sa part à la réalisation de cette thèse.

Nous remercions énormément Mr Ben Maalem Abd El Rahmane qui nous a permis d'effectuer toutes les analyses spectrophotométriques au niveau du Laboratoire Biotechnologie végétale et amélioration, Université Saad Dahleb Blida-1.

Nous voudrions exprimer toute nos reconnaissances aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail :

Nous tenons également à adresser nos vifs remerciements à Mme Faidi .H, Maitre-assistante à l'Université Saad Dahleb Blida-1, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Qu'elle soit assurée de nos gratitude et de notre profond respect.

Nous tenons également à remercier Mme Chebata. N, Maitre-assistante à l'Université Saad Dahleb Blida-1, d'avoir honoré ce travail en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par ses propositions.

Nous profitons de cette dernière occasion pour exprimer notre gratitude à tout le corps enseignant et tout membre de notre université, côtoyés au court de ces cinq années.

Merci à tous ceux qui de prêt ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, rien de tout cela n'aurait été possible sans vous.

DEDICACES

Je dédie affectueusement cette thèse à tous ceux que j'aime et que j'estime en particulier :

A mes Parents ; toute ma gratitude pour leurs patiences, leurs soutiens, leurs prières et leurs encouragements tout en long de mes études.

A mon cher frère Taki Eldine.

A mes chères sœurs Fedwa et Assma.

A toute ma famille.

A celle que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de notre projet ma sosie et mon binôme Hiba et toute la famille Belhachemi.

A tous mes amis et à toute la promo de biotechnologies et valorisation des plantes.

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Merci d'être toujours là pour moi.

Wafa

DEDICACES

*Je dédie ce travail à ma chère mère ; qu'elle trouve ici toute ma gratitude pour son soutien
tout le long de mes études.*

À mon cher mari Farid qui m'a tant soutenu.

À mes frères.

À mes neveux.

À mes amis.

À toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette.

Hiba

Résumé

L'objectif de la présente étude était d'étudier les caractéristiques physicochimiques de la propolis, particulièrement les polyphénols et les flavonoïdes et d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne, à partir d'extraits éthanoliques de propolis Algérienne propre à deux régions différentes en climat et en patrimoine floral, Blida et Naâma. La propolis extraite à l'aide d'éthanol 70% a donné des rendements variants entre 30.9% pour la propolis de Naâma et 38.8% pour celle de Blida. Les résultats d'étude de deux échantillons révèlent : un taux d'humidité relative + Matières volatiles varie entre (3 - 4.5%) ; le taux de cendre (2,86 - 3.01%) ; la masse volumique (1.1 - 0.8 g/cm³) pour l'échantillon de Blida et de Naâma respectivement. La valeur de pH et de l'acidité titrable (≥ 8) montre que la propolis est de nature acide. L'étude de la composition montre la richesse de propolis en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) et sa pauvreté en sucres. L'activité antioxydante réalisée par la méthode de DPPH/ Acide Ascorbique varie entre ($IC_{50} = 0.38$) pour la propolis de Blida et ($IC_{50} = 0.66$) pour celle de Naâma, alors que le témoin positif acide ascorbique présente une valeur de l'ordre 0.11. Les résultats indiquent que la propolis de la région de Blida possède un pouvoir antioxydant relativement fort, qui est en relation avec ses fortes teneurs en composés phénoliques et qui est lié aussi à la flore de la région caractérisée par la dominance des agrumes et des pinacées. Des différences ont été observées à l'égard de la sensibilité suscitée chez les diverses souches testées au niveau de l'activité antimicrobienne des deux extraits par la méthode de diffusion sur gélose montrant une importance à l'encontre des bactéries Gram⁺ comparativement aux bactéries Gram⁻. Elle augmente avec les teneurs en composés phénoliques et elle est plus importante sur les *Staphylococcus aureus* (25mm) et aussi sur les *Staphylococcus epidermidis* (21mm). Se basant sur les résultats précédents, des savons sont préparés avec différentes propolis (extrait éthanolique de propolis, propolis brute broyée et le culot issu de l'étape de filtration). Les résultats de test de l'état microbiologique montrent l'efficacité du savon à base de l'extrait éthanolique de propolis par rapport aux autres préparations. En comparant les résultats de nos analyses selon les régions, on constate que l'extrait de Blida s'est montré le plus efficace comme antioxydant et antimicrobienne, cela signifie l'impact de la région d'étude sur la qualité des extraits.

Mots clés :

Propolis algérienne, Polyphénols, Propriétés physico-chimiques, Activités antioxydantes, Activité antimicrobienne, Blida, Naâma, Formulation des savons.

Abstract

The objective of this study was to learn the physicochemical characteristics of propolis, particularly phenolics and flavonoids compounds and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity, from ethanolic extract of propolis specific of two divergent regions in climate and floral heritage, Blida and Naâma. Propolis extracted with ethanol 70% gave variants yields between 30.9% for Naâma propolis and 38.8% for Blida propolis. The study results of two samples reveal: a relative humidity + volatile matter varies between (3 - 4.5%); the ash rate (2.86 - 3.01%); the density (1.1 - 0.8 g / cm³) for the sample of Blida and Naâma respectively. The pH value and titratable acidity (≥ 8) shows that propolis is acidic in nature. The study of the composition shows the richness of propolis in phenolic compounds (polyphenols and flavonoids) and its poverty in sugars. The antioxidant activity measured by DPPH radical scavenging / ascorbic acid varies between ($IC_{50} = 0.38$) for Blida sample and ($IC_{50} = 0.66$) for Naâma sample, while the positive control of ascorbic acid presents a value of the order 0.11. The results show that propolis of Blida has a relatively strong antioxidant activity which is related to its high levels of phenolic compounds and which is also related to the flora of the region characterized by the dominance of citrus and Pinaceae. Differences were observed in the susceptibility of the various strains tested for the antimicrobial activity of both extracts by the agar diffusion method showing a significance against Gram + bacteria compared to Gram-positive bacteria. The antimicrobial activity increases with the contents of phenolic compounds and is more important on *the Staphylococcus aureus* (25mm) and on the *Staphylococcus epidermidis* (21mm). Based on the previous results, soaps are prepared with different propolis (ethanol propolis extract, crushed ground propolis and the pellet from the filtration stage). Microbiological status test results show the effectiveness of the ethanol based propolis extract soap compared to other preparations. By comparing the results of our analyzes according to the regions, Blida extract was found to be the most effective antioxidant and antimicrobial, which means the impact of the study area on the quality of the extracts.

Keywords :

Algerian Propolis, Polyphenols, Physicochemical Properties, Antioxidant Activities, Antimicrobial Activity, Blida, Naâma , Soap Formulation.

الملخص

كان الهدف من هذه الدراسة هو معرفة الخصائص الفيزيائية والكيميائية للعكبر ، خاصة مركبات الفينولات والفلافونويدات وتقييم نشاط مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ، انطلاقا من المستخلص الإيثانولي لمادة العكبر الجزائرية الخاصة بمنطقتين مختلفتين في المناخ والغطاء النباتي، البليلة والنعامة. أعطى العكبر المستخلص بمادة الإيثانول 70 ٪ مردودا يتراوح بين 30.9 ٪ للعكبر الخاص بالنعامة و 38.8 ٪ للعكبر الخاص بالبليلة. تكشف نتائج دراسة العينتين: الرطوبة النسبية + المواد الطيارة (3 - 4.5 ٪) ; نسبة الرماد (2,86 - 3.01 ٪) ; الكتلة الحجمية (0.8 - 1.1 غ /سم³) لكل من عينة البليلة والنعامة على التوالي . تنص قيمة الرقم الهيدروجيني وحموضة المعايير (8 ≤) على أن العكبر حمضي بطبيعته. توضح دراسة التركيب ثراء البروبوليس في المركبات الفينولية (البوليفينولات والفلافونويدات) وفقرها في السكريات. النشاط المضاد للأكسدة المجرى على طريقة DPPH / حمض الاسكوربيك يختلف من (IC₅₀=0.38) للعكبر الخاص بالبليلة و (IC₅₀=0.66) للخاص بالنعامة اما فيما يخص الشاهد الإيجابي حمص الاسكوربيك يظهر قيمة 0.11. تعرض النتائج ان مادة العكبر الخاصة بالبليلة تتمتع بقدرة مضادة للأكسدة قوية نسبيا والتي ترتبط باحتوائها على نسبة مرتفعة من العناصر الفينولية و بالنباتات في المنطقة التي تتميز بهيمنة الحمضيات والصنوبريات. وقد لوحظت فروق فيما يخص حساسية السلالات المختلفة التي تم اختبارها على مستوى النشاط المضاد للميكروبات في المستخلصين بواسطة طريقة نشر الأجار التي تظهر أهمية ضد بكتيريا غرام + مقارنة مع بكتيريا غرام - . يزداد نشاط مضادات الميكروبات مع محتويات المركبات الفينولية وهو أكثر أهمية في المكورات العنقودية الذهبية (25 مم) والمكورات العنقودية الجلدية (21 مم). بناءً على النتائج السابقة ، يتم تحضير الصابون باستخدام انواع مختلفة من العكبر (مستخلص العكبر الإيثانولي ، العكبر الخام المطحون والراشح الناتجة من مرحلة الترشيح). تُظهر نتائج اختبار الحالة الميكروبيولوجية فعالية الصابون المصنوع من مستخلص البروبوليس الإيثانولي مقارنةً بالمستحضرات الأخرى. بمقارنة نتائج تحاليلنا مع المناطق ، تم استنتاج ان مستخلص البليلة الأكثر فعالية في مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ، مما يعني تأثير منطقة الدراسة على جودة المستخلصات.

الكلمات المفتاحية :

العكبر الجزائري، بولي فينولات، الخصائص الفيزيوكيميائية، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، البليلة، النعامة، صياغة الصابون.

Liste des tableaux

Table 1 : Composition chimique de la propolis pure	9
Table 2 : La composition des différentes propolis en polyphénols	10
Table 3 : La composition des différentes propolis en flavonoïdes	11
Table 4 : Caractéristiques de provenance des échantillons de propolis	21
Table 5 : Les souches microbiennes utilisées dans l'antibiogramme	22
Table 6 : Les rendements de propolis en extrait éthanolique	39
Table 7 : Les taux de pertes et la matière sèche des échantillons de propolis.....	39
Table 8 : Taux des cendres et de la matière organique de la propolis.....	40
Table 9 : La masse volumique de la propolis	41
Table 10 : Acidité titrable des échantillons de la propolis	42
Table 11 : Valeur d'IC50 des différents échantillons de propolis analysés.....	43
Table 12 : Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis.....	43
Table 13 : Teneurs en flavonoïdes des différents échantillons de propolis.....	44
Table 14 : Teneurs en sucres totaux des différents échantillons de propolis	45
Table 15 : Mesure des diamètres des zones d'inhibitions.....	46
Table 16 : Mesure des diamètres des zones d'inhibition des savons.....	47

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes castes de la colonie et l'anatomie de l'ouvrière	4
Figure 2 : Propolis à l'état brute	7
Figure 3 : Composition moyenne de la propolis brute	8
Figure 4 : Récolte de la propolis	12
Figure 5 : Corbeilles d'abeille remplies de propolis.....	12
Figure 6 : Raclage de la propolis sur les cadres de la ruche	13
Figure 7 : Grille en plastique souple où sera récolté la propolis	13
Figure 8 : Les extraits éthanoliques de la propolis.....	23
Figure 9 : Traitements de la propolis	24
Figure 10 : Réduction du radical libre DPPH en DPPHH	28
Figure 11 : Etapes de test DPPH	29
Figure 12 : Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux.....	30
Figure 13 : Réaction du chlorure d'aluminium et des flavonoïdes.....	31
Figure 14 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes totaux	31

Figure 15 : Organigramme représentant le dosage des sucres totaux	33
Figure 16 : Etapes de la préparation du savon formulé à froid	36
Figure 17 : Valeur de ph des différents échantillons de propolis.....	41
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition des radicaux libres.....	42

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association française de normalisation

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

C : Concentration

CAPE : Ester phényléthylique de l'acide caféique

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

EAG : Equivalent Acide Gallique

EEP : Extrait éthanolique de propolis

EG : Equivalent glucose

EQ : Equivalent Quercétine

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice médiane

IL : Interleukine

MH : Muller-Hinton (milieu de culture)

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Na₂CO₃ : carbonate de sodium

Nm : nanomètre.

PH : Potentiel Hydrogène.

R² : coefficient de corrélation.

TNF : Facteur de nécrose tumorale

UFC : Unité formant colonie

Table des matières

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique

1. Abeille et produits de la ruche	3
1.1. Abeille.....	3
1.2. Classification	3
1.3. Les différentes castes de la colonie	3
1.4. Les produits de la ruche.....	4
2. Propolis	5
2.1. Origine	5
2.2. Historique	5
2.3. Définition.....	6
2.4. Composition.....	7
a) Composition de la propolis brute.....	7
b) Composition de la propolis purifiée	8
❖ Polyphénols	9
❖ Flavonoïdes.....	10
2.5. Récolte	11
a) Par l'abeille.....	11
b) Par l'homme	13
2.6. Extraction.....	14
2.7. Conservation	14
2.8. Propriétés physico-chimiques.....	15
a) Propriétés physiques.....	15
b) Propriétés chimiques	15
2.9. Propriétés thérapeutiques.....	16
a) Action antibactérienne	16
b) Action antivirale	16
c) Action antifongique et antimycosique	17
d) Action antiparasitaire	17
e) Action antioxydante	17
f) Action anti-inflammatoire	18

g) Action immunomodulatrice.....	18
h) Action anticancéreuse	19
i) Action cicatrisante et régénératrice	19
j) Action analgésique-anesthésiante.....	19
2.10. Utilisation.....	20
a) Par l'abeille.....	20
b) Par l'homme	20

Matériels et Méthodes

1. Matériel.....	21
1.1. Matériel non biologique	21
1.2. Matériel biologique	21
2. Méthodes	22
2.1. Traitement de l'échantillon	22
a) Traitement préliminaire de la propolis.....	22
b) Traitement technologique de la propolis	23
c) Préparation des extraits éthanoliques de la propolis	23
2.2. Méthodes d'analyses physiques	25
a) Détermination de taux des pertes pendants le séchage.....	25
b) Détermination de la teneur en cendre	25
c) La masse volumique.....	26
2.3. Méthodes d'analyses chimiques.....	26
a) Détermination du pH.....	26
b) Détermination de l'acidité titrable.....	26
2.4. Etude de l'activité antioxydante	27
2.5. Dosage des polyphénols totaux	29
2.6. Dosage des flavonoïdes totaux	30
2.7. Dosage des sucres totaux.....	32
2.8. Etude de l'activité antimicrobienne.....	33
3. Essai de valorisation de la propolis dans le domaine cosmétique et thérapeutique	35
3.1. Essai de formulation d'un savon naturel à base de propolis	35
a) Formulation d'un savon pure	35
b) Test d'efficacité microbiologique du savon formulé	36
c) Formulation d'un savon amélioré à base de propolis.....	37

Résultats et discussion

1. Rendements des deux échantillons.....	39
2.1. Résultats d'analyses physiques	39
a) Pertes pendant le séchage.....	39
b) Teneur en cendre	40
c) Masse volumique.....	40
2.2. Résultats d'analyses chimiques	41
a) Ph.....	41
b) Acidité titrable	42
3. L'activité antioxydante.....	42
4. Teneur en polyphénols totaux	43
5. Teneur en flavonoïdes totaux	44
6. Teneur en sucres totaux.....	45
7. L'activité antimicrobienne	45
8. Formulation de propolis dans le domaine cosmétique et thérapeutique	47
a) Fabrication d'un savon naturel	47
Conclusion	49



Les produits de la ruche sont depuis des millénaires exploités par l'homme. Ils sont issus de substances naturelles et produits par les abeilles. Leurs utilisations assurent un bon marché et représentent un revenu d'appoint pour l'apiculteur. Parmi ces produits on cite la propolis qui est une résine végétale et aussi un remède naturel utilisé depuis l'antiquité. Elle est collectée par les abeilles, possède une odeur balsamique et une couleur variable selon ses origines végétales (**Bogdanov, 2016**).

Tout au long des siècles passé on trouve la trace de l'utilisation de la propolis qui est fut délaissée durant un moment laissant place aux antibiotiques et réapparu dans les années 60 avec le développement de la science moderne qui a permis de comprendre sa complexité chimique et d'identifier les principes actifs qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques (**Bensalah et Belhadj, 2018**).

L'idée d'utiliser la propolis à des fins thérapeutiques modernes est assez récente (une trentaine d'années) et vient étoffer encore le cadre de l'apithérapie. Ce terme associé exclusivement au traitement naturel à base de produits de la ruche tel que : le miel, la gelée royale, la propolis, le venin et le pollen qui sont utilisés contre certaines maladies (**El housseini, 2013**).

Ces dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés à la composition chimique et aux effets biologiques de la propolis. Ces travaux ont montré que ces propriétés thérapeutiques de la propolis ont généralement été attribuées aux flavonoïdes, bien que d'autres composants puissants présents dans les propolis des différentes régions (**Burdock, 1998**). On lui reconnaît de nombreuses propriétés : antibactérienne (**Velikova et al., 2000**), antivirale (**Murad et al., 2002**), anti-inflammatoire (**Miyataka et al., 1997**), antioxydante, anticancéreuse (**Burdock, 1998**) ...etc. Concernant les caractères physiques aucune recherche n'a été publiée.

Son efficacité une fois prouvée lui a valu un intérêt particulier par l'ensemble des chimistes, biochimistes et pharmacologues qui essaient d'identifier de nouveaux principes actifs susceptibles d'être utilisés en thérapeutique.

Vu que l'Algérie occupe une superficie de 2.381.741 km² qui renferme une grande diversité florale et climatique qui pourra nous offrir plusieurs chémotypes de propolis, et également la masse faible d'explorations scientifiques de la qualité et d'utilisation de ces propolis dans les domaines cosmétique et thérapeutique, le présent travail vise la valorisation d'un sous-produit de la ruche : la propolis algérienne provenant de deux régions différentes dans la phytothérapie et la formulation d'un produit naturel possédant un intérêt thérapeutique.



Introduction

Dans ce mémoire, pour la réalisation de cet objectif, trois parties seront développées : dans le premier chapitre nous présentons une synthèse bibliographique qui réunit un aperçu sur l'abeille et des connaissances sur la propolis et ces propriétés médicinales ; Le deuxième chapitre est consacré pour la présentation de matériel utilisé et les méthodes d'extraction et d'analyses chimiques et biochimiques et l'étude des activités antimicrobienne et antioxydante. Enfin, le derniers chapitre présentera les résultats obtenus et leurs discussions qui seront couronnées par une conclusion et des perspectives pour l'avenir.



1. Abeille et produits de la ruche

1.1. Abeille :

C'est un insecte social vivant dans une ruche et produisant le miel et la cire et autres produits. L'abeille est, avec le ver à soie, le seul insecte domestiqué par l'homme (**Lambrechts et al., 2006**).

Le terme abeille est un terme vernaculaire qui regroupe plus de 20 000 espèces. Le genre *Apis* en regroupe 9 qui sont réparties en 4 groupes (**Apimondia, 2001**).

1.2. Classification :

Ordre : Hyménoptères

Sous-ordre : Apocrites

Superfamille : Apoidea (apoïdes)

Famille : Apidae (apidés supérieurs)

Sous-famille : Apinae

Genre : *Apis*

Espèce : *Apis mellifera* (**Clément, 2011**).

1.3. Les différentes castes de la colonie :

La reine

C'est la mère et l'individu le plus important et le plus grand de la colonie (**Tarpy et al., 2011 ; Hatjina et al., 2014 ; Moore et al., 2015 ;**), munie d'un appareil génital fonctionnel (**Collins et Pettis 2013**), son espérance de vie varie de 3 à 5 ans (**Page et Peng, 2001**) avec une alimentation exclusive de gelée royale pendant toute sa vie (**Apimondia, 2001**).

Le male

Les males (faux bourdons) sont quelques milliers dans la ruche (**Allen, 1958**), Ils possèdent 2 rôles principaux. Tout d'abord, ils sont responsables de la fécondation de la reine vierge (**Hrassnigg et Crailsheim, 2005**). Ensuite, ils participent à la thermorégulation de la ruche en brassant l'air avec leurs ailes (**Harrison, 1987**).

L'ouvrière

Femelles stériles (**Apimondia, 2001**). Elles sont les plus nombreuses et ce sont elles qui travaillent dans la ruche. D'une taille inférieure à celles de la reine et des faux bourdons, leur durée de vie dépend de la saison. Pendant l'été, elles ne dépassent pas les 40 jours alors qu'elles peuvent vivre plusieurs mois à l'hiver (**Maurizio, 1953**).

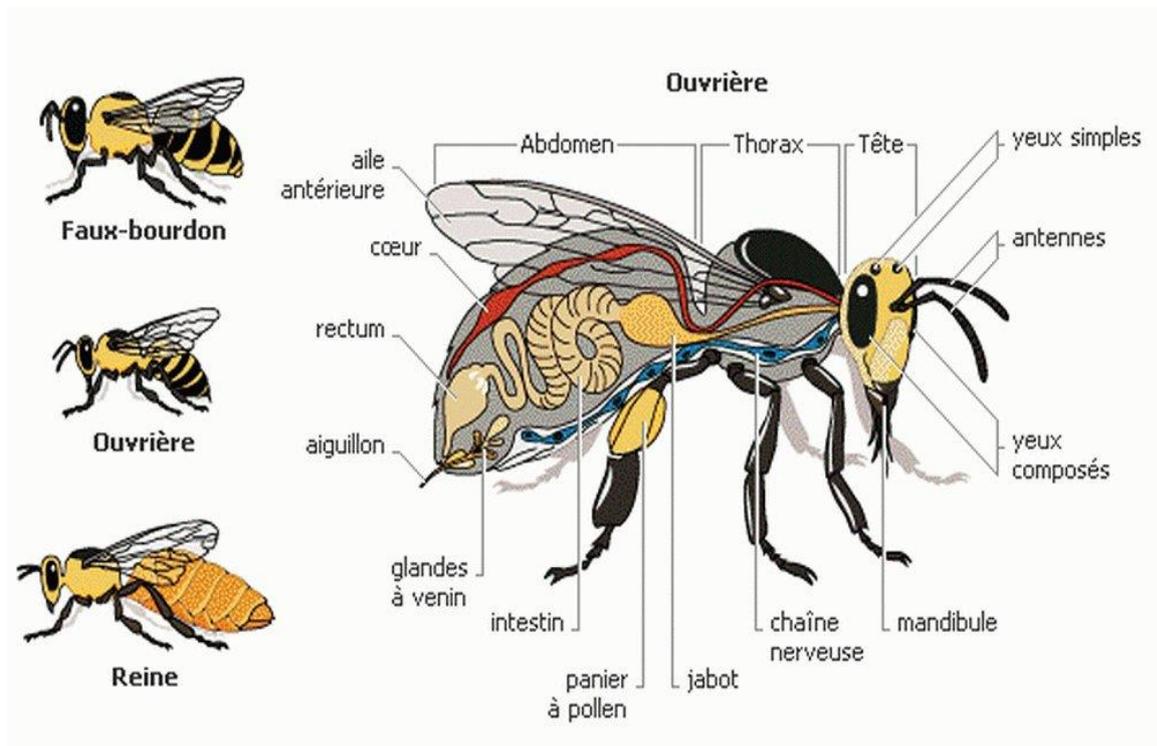


Figure n°1 : Les différentes castes de la colonie et l'anatomie de l'ouvrière.

<http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/evolution/dossiers-thematiques/epigenetique/epigenetique-de-labeille/les-castes-dune-societe-dabeilles-melliferes> consulté le 11/12/2018

1.4. Les produits de la ruche :

Les abeilles possèdent un rôle primordial dans l'écosystème et la survie de l'espèce. Les produits issus du travail de ce petit insecte (produits de la ruche) sont depuis des millénaires exploités par l'homme. Ils sont issus de substances naturelles, produits par les abeilles. Leurs utilisations assurent un bon marché et représentent un revenu d'appoint pour l'apiculteur. Ces derniers sont : la gelée royale, le pollen, la cire, le venin, le miel et la propolis (**Bogdanov, 2016**).



2. Propolis

2.1. Origine :

Deux théories avaient été énoncées quant à l'origine précise de la propolis.

Théorie de l'origine interne : la propolis est un résidu issu de la première phase de digestion du pollen (figure n°1) dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen appelé le gésier à pollen. La propolis serait ensuite régurgitée par l'abeille. Cependant des grandes divergences de composition chimique entre le pollen et la propolis rendent cette hypothèse peu vraisemblable (**Hegazi, 1997**).

Théorie de l'origine externe : la véritable propolis est collectée par les abeilles de différentes plantes. Ces dernières la rapportent à la ruche, et la modifient en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement). La propolis provenant des arbres est utilisée à des fins moins importantes telles que le rétrécissement du trou de vol ou l'embaumement de prédateurs (**Valcic et al., 1999**).

2.2. Historique :

La propolis est anciennement beaucoup moins connue que le miel, ses propriétés étaient déjà mises à profil plusieurs millénaires avant notre ère. En effet les Égyptiens, les Grecs, les Romains, et même les Mayas utilisaient la propolis à des fins préventives, curatives et alimentaires (**Donadieu, 1981**).

De -3200 à -1100 ans av JC, la propolis avait un rôle religieux dans l'Égypte ancienne. Les Égyptiens utilisaient cette résine pour embaumer les morts, elle était réputée pour ses propriétés conservatrices et son arôme. On l'employait aisément lors de la momification (**Crane, 1999**).

De -700 à -600 ans av JC, les Grecs ont observé que cette substance résineuse se situait à l'entrée de la ruche comme barrière de protection contre les prédateurs. Ils ont alors donné le nom de « propolis » qui signifie (pro=devant et polis=la cité) (**Golder, 2004**). Les anciens Grecs l'ont utilisé pour les "suppurations" comme on a découvert dans les anciens livres (**Aristote**).

En Rome Antique, les soldats romains, eux, partaient au combat avec un morceau de propolis pour cicatriser leurs futures plaies. La propolis était réputée pour réduire les œdèmes, apaiser les douleurs nerveuses et guérissait les plaies cutanées ou encore les abcès (**Pline l'ancien**). Durant la même période, en Amérique du Sud, les Incas utilisaient la propolis comme antiseptique (**Lavie, 1975 ; Hegazi, 1997**).



Aux cours de 1^{er} siècle av JC le savon latin varron a mentionné la propolis dans ces travaux ainsi que le poète Virgil dans ces écrits. Puis au 2^{ème} siècle av JC le médecin Galien l'a mentionné dans ces traités (**Debuyet, 1984**).

Au 11^{ème} siècle le philosophe médecin iranien Avicenne a parlé de deux sortes de cire : la cire propre et la cire noire, cette dernière étant probablement la propolis. Il a dit : « par sa forte odeur, elle fait éternuer... » et « Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement » (**Crane, 1999 ; Fearnley, 2001**).

Au 12^{ème} siècle, la propolis est mentionnée dans des ouvrages de médecine en Géorgie où elle entre dans la composition de nombreux remèdes (**Donadieu, 2008**). Au 16^{ème} siècle, la propolis servait à cicatrifier les blessures de flèches (**Ransome, 1937 ; Fearnley, 2001**) et elle est listée comme médicament officiel dans la pharmacopée londonienne pendant le 17^{ème} siècle (**Castaldo et Capasso, 2002**).

En France ce n'est qu'au début de 18^{ème} siècle que le médecin Ambroise Paré (chirurgien d'Henri II, de François I, de Charles XI ainsi que d'Henri III) qui en fait mention pour la première fois dans ses écrits. A la fin du 19^{ème} siècle elle était très répandue sur les champs de batailles notamment lors de la guerre des Boers en Afrique du Sud pour soigner les soldats et accélérer le processus de cicatrisation. Elle était reconnue pour son action antiseptique, anesthésique et cicatrisante (**Caillas, 1947 ; Debuyet, 1984**).

Sans avoir été permanent, l'emploi médical de la propolis s'est tout de même maintenu au fil des siècles pour être à nouveau redécouvert dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle, époque où l'intérêt porté aux propriétés médicinales de la propolis s'est accru, principalement en Europe. Le professeur **Rémy Chauvin** a publié avec ses collaborateurs le Traité de biologie de l'abeille en 1968, dans lequel la propolis tient une place importante. A peu près à la même période le Danois **K. Lund Aagaard** a créé un produit breveté, très riche en flavonoïdes : la Propoline, aujourd'hui commercialisé dans le monde entier.

2.3. Définition :

« La propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles sur certaines parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres), substances qu'elles rapportent à la ruche et qu'elles modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement) » (**Donadieu, 2008**).



Figure n°2 : Propolis à l'état brute.

<https://www.apropolis-phytonorm.boutique/blog/la-propolis-brute-la-propolis-pure-n8> consulté le 11/12/2018

2.4. Composition

a) Composition de la propolis brute :

L'origine géobotanique dont sera issue la propolis, la flore locale près du site de collecte, la race d'abeille ainsi les modifications générées à travers les sécrétions hypopharyngiennes de l'abeille influent d'une façon principale sur la composition (Apimondia, 2001).

La composition de la propolis brute diffère de celle de la propolis pure. Toutefois, un échantillon de propolis est généralement composé de :

- 50 à 55% de résine, de baume composé de flavonoïdes et d'acides phénoliques ou de leurs esters (Bankova et al., 1987).
- 25 à 35% de cire (mélange de cire verte d'origine végétale et de cire d'abeille) (Papay, 1987).
- 10% d'huiles essentielles (Tosi et al., 2006).
- 5% de pollen (Gabrys, 1986).
- 5% de matières diverses (organiques et minérales) (Bankova et al., 1987).

La figure ci-dessous résume le pourcentage des différents composés chimiques de la propolis brute :

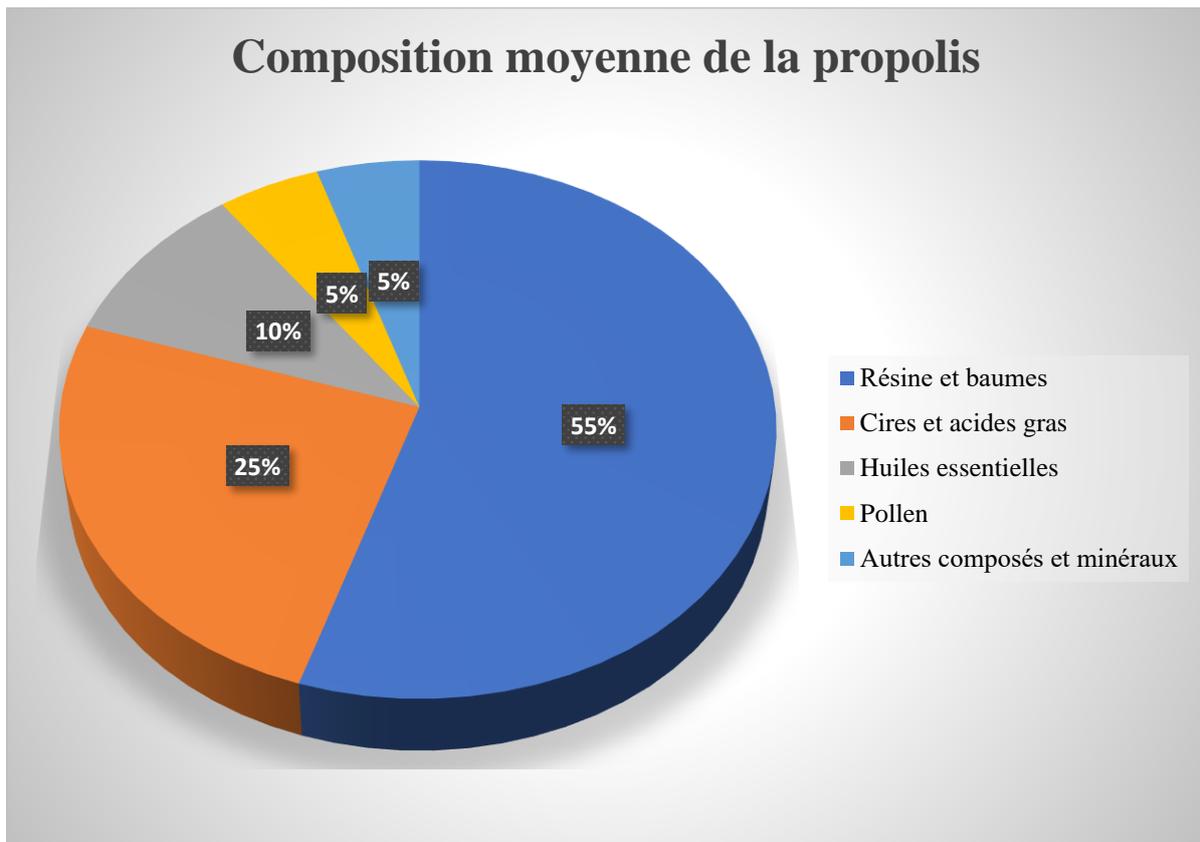


Figure n°3 : Composition moyenne de la propolis brute. pollen (Gabrys, 1986 ; Bankova et al., 1987 ; Papay, 1987 ; Tosi et al., 2006).

b) Composition de la propolis purifiée :

La composition de la propolis dépend directement de la flore locale au niveau des sites de collecte. Ceci engendre donc une réelle diversité de composition chimique de cette dernière. Actuellement il a été identifié plus de 300 composants différents de la propolis par les méthodes d'analyse modernes : chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (Kumazawa et al ,2004 ; Agra et al., 2006 ; Donadieu, 2008)

Le tableau ci-dessous présente les composants essentiels de la propolis purifié :

**Tableau n°1** : Composition chimique de la propolis pure.

Constituants	Eléments composant	Référence
Composés phénoliques	<ul style="list-style-type: none"> - Flavones : la pinostrombine. - Flavanols : la galangine, la quercétine. Flavanonales : la pinobanksine. - L'acide caféique, l'acide cinnamique, l'acide et l'alcool benzoïque, ainsi que l'acide férulique. - Les substances à l'origine des émissions odorantes : Elles englobent plusieurs familles chimiques de molécules, ainsi des alcools, des aldéhydes (notamment vanillique et isovanillique) et des cétones, des acides, des esters interviennent dans l'odeur de la propolis. - Acides aromatiques (dérivés de l'acide benzoïque et cinnamique). - Esters d'acides (cinnamique, coumarique, férulique, isoférulique et caféique). - Acides aliphatiques (notamment les acides arachidonique, linoléique, linoléinique, oléique, palmitique, lactique). 	<p>(Kumazawa et al., 2004)</p> <p>(Agra et al., 2006)</p> <p>(Amoros et al., 1992)</p> <p>(Genya et al., 2005)</p> <p>(Shiva et al., 2006)</p> <p>(Apimondia, 2001)</p> <p>(Gharbi, 2011)</p> <p>(Apimondia, 2001)</p> <p>(Gharbi, 2011)</p>
Eléments minéraux	On retrouve surtout le fer, le cuivre et le manganèse : Aluminium, argent, baryum, bore, calcium, chrome, cobalt, cuivre, étain, fer, magnésium, manganèse, nickel, phosphore, plomb, sélénium, silicium...etc.	(Donadieu, 2008)
Les vitamines	<ul style="list-style-type: none"> - Les vitamines du groupe B (B1, B2, B3, B6, B8, B12). - La provitamine A qui se transforme en vitamine A dans l'organisme. 	<p>(Krell, 1996)</p> <p>(Donadieu, 2008)</p>

Les constituants de la propolis du point de vue de l'activité pharmacologique sont :

❖ **Les polyphénols :**

Les composés phénoliques (appelés aussi polyphénols) sont des composés organiques possédant un ou plusieurs noyaux aromatiques. Ces derniers semblent les plus dominants dans



la composition de la propolis, en plus ce sont les principaux composés responsables des activités biologiques de la propolis.

Les phénols présentés dans la propolis sont principalement : l'acide caféique (au fort pouvoir antioxydant), l'acide cinnamique (antiseptique et antifongique), l'acide et l'alcool benzoïque, ainsi que l'acide férulique (puissant antioxydant et anti-inflammatoire) (**Amoros et al., 1992**). La composition en polyphénols de la propolis diffère d'une région à une autre et d'une race à l'autre comme il est illustré dans le tableau suivant :

Tableau n° 2 : La composition des différentes propolis en polyphénols.

Provenance	Polyphénols (mg équivalent de l'acide gallique /g de propolis)	Référence
Santiago: - San martin - Banda - Capital - Figurau	80 – 131 115 -253 86 – 209 71 – 130	(Lucrecia et Monica, 2009)
Chine: - Yuman - Hubei - Hainan - Shandoug - Neimongole	64,7 ± 1,5 224 ± 5,5 246 ± 4,8 265 ± 3,3 284 ± 4,9	(Ahn et al., 2007)
- Argentine - Brésil - Bulgarie - Sud Afrique - Uzbekistan	212 ± 9,2 120 ± 2,5 220 ± 2,5 99,5 ± 4,4 147 ± 6,7	(Kumazawa et al., 2004)

❖ **Les flavonoïdes :**

Ils jouent un rôle important dans la pigmentation des plantes. On dénombre dans la propolis pas moins de 60 flavonoïdes, comme la galangine, le kaempférol, la quercétine, la pinostrombine et la pinobanksine, ce nombre important de flavonoïdes fait de la propolis une substance aux multiples propriétés biologiques (**Agra et al., 2006**). Il est connu que la plupart des effets biologiques des flavonoïdes sont reliés à leur activité antioxydante (**Ghedia, 2005**).



Ils sont considérés comme les antioxydants les plus efficaces in vitro même plus que les tocophérols et l'acide ascorbique (**Blokhina et al., 2003**).

Des travaux réalisés par (**Kumazawa et al., 2004**) ont permis de quantifier les différents flavonoïdes présents dans des propolis des diverses régions (Tableau n°3).

Tableau n° 3 : La composition des différentes propolis en flavonoïdes.

Provenance	Flavonoïdes (mg EQ /g propolis)
Chine	147 (Ecart type : 9,3)
Argentine	130 (Ecart type : 5,5)
Brésil	51,9 (Ecart type : 2,4)
Bulgarie	157 (Ecart type : 8,9)
Ouzbékistan	94,2 (Ecart type : 6,8)
Sud d'Afrique	50,8 (Ecart type : 0,8)

2.5. Récolte

a) Par les abeilles :

La récolte de propolis est faite par un nombre relativement restreint d'abeilles ouvrières butineuses, qui se trouvent dans la dernière partie de leurs existences (les plus âgées). Ces ouvrières sont certainement très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie (**Donadieu, 1981**).

Les ouvrières butineuses localisent la source de résines à l'aide de ses antennes et triturent celle-ci avec leurs mandibules, les mélangent avec d'autres substances de leurs propres sécrétions afin de fabriquer de la propolis. Une fois fabriquée, la propolis est transportée à la ruche dans les corbeilles situées dans les pattes postérieures de l'abeille (**Lavie, 1975**).

La récolte de la propolis dépend des facteurs suivants :

- **Facteurs saisonniers :** la récolte a lieu, selon les cas, soit en début de printemps, soit à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernation (**Lavie, 1975**).
- **Facteurs géographiques :** il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propolisent plus que les ruches de plaines (**Hegazi, 1997**).
- **Facteurs climatiques (la température) :** les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15

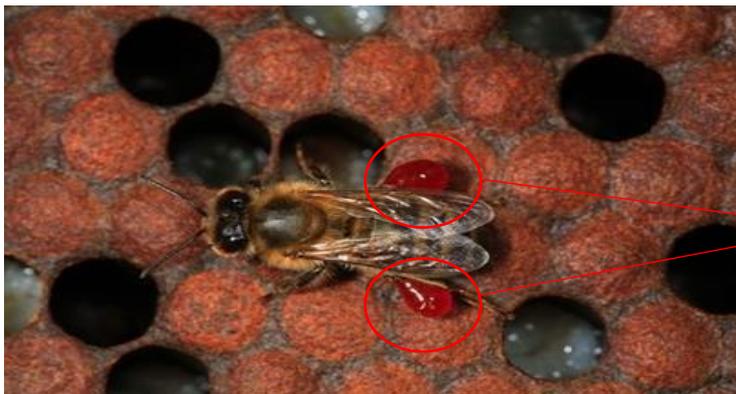
h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires (Lavie, 1975).

- **Facteurs liés à la race d'abeille :** la tendance à propoliser dépend de la race d'abeille. Il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure propolisent, en général, davantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises (Lavie, 1975).



Figure n°4 : Récolte de la propolis sur les bourgeons par l'abeille butineuse.

<https://unrucheraujardin.blogspot.com/2017/04/la-propolis-recolte-usage-et-proprietes.html>
consulté le 28/12/2018



Corbeilles de
l'abeille remplies

Figure n°5 : l'abeille muni de deux corbeilles remplies de propolis

<http://www.leruchersaintgervais.fr/La%20propolis.htm> consulté le 27/12/2018

b) **Par l'homme :**

La propolis peut être récoltée selon deux techniques diverses :

- Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux (**Lavie, 1975**).



Figure n°6 : Raclage de la propolis sur les cadres de la ruche.

<https://www.bien-etre-au-naturel.fr/propolis-resine-bonne-sante/> consulté le 24/12/2018

- Par des grilles moulées en matière plastique ou en métal. On pose cette grille comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche (**Krell, 1996 ; Evangelist et al., 2001**). Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité.



Figure n°7 : Grille en plastique souple où sera récoltée la propolis.

<https://propolia.com/monde-de-l-abeille/perles-de-la-ruche/la-propolis> consulté le 24/12/2018



2.6. Extraction :

L'obtention de la propolis pure nécessite trois étapes fondamentales :

- **Broyage** : la propolis brute est broyée afin d'obtenir une poudre.
- **Macération** : réalisée dans un solvant qui peut être une solution hydroalcoolique à différents pourcentages d'alcool « éthanol, méthanol » (Aagaard, 1974 ; Sawaya et al., 2002), des extractions aqueuses (Miguel et al., 2010), des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle) (Biscaia et Ferreira, 2009), ou encore des extractions par de l'huile de colza (Carvalho et al., 2011). D'une façon assez générale, les macérations alcooliques sont de loin les méthodes d'extractions les plus répandues.

Les durées et les températures d'extraction sont assez variables selon la nature de solvant d'extraction.

- **Séchage de l'extrait** : différents traitements peuvent être appliqués à la propolis, dans le but d'isoler et garder les éléments solubles de celle-ci, aux propriétés pharmacologiques intéressantes. Le traitement le plus fréquemment employé est la filtration sur papier suivie par une évaporation à sec (à l'évaporateur rotatif sous pression réduite) (Miguel et al., 2010 ; Szliszka et al., 2011) mais ces deux opérations sont parfois précédées d'un refroidissement (à -18°C au congélateur) afin d'éliminer les cires (Biscaia et Ferreira, 2009). Parfois, la centrifugation remplace ou précède la filtration (Gómez et al., 2006 ; BarbariĆ et al., 2011) et dans les cas des extractions aqueuses, les échantillons sont souvent lyophilisés (Midorikawa et al., 2001).

2.7. Conservation :

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions.

Avant extraction, la propolis est généralement conservée au congélateur (-18°C) avant d'être pulvérisée (Popova et al., 2005) ou simplement conservée à température ambiante à l'obscurité (BarbariĆ et al., 2011).

Après extraction, les échantillons sont conservés secs, soit dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de préférence), soit au réfrigérateur (4°C) (Ahn et al., 2007 ; BarbariĆ et al., 2011), ou soit encore au congélateur (-20°C) (Raghukumar et al., 2010).

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



pour en obtenir de meilleurs effets et résultats, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible (Krell, 1996).

2.8. Propriétés physico-chimiques

a) Propriétés physiques :

- **Consistance :** La propolis est une substance naturelle de consistance variable suivant la température :
 - À 15°C, elle est dure et friable.
 - À 30°C, elle est molle et malléable.
 - Entre 30 et 60°C, elle devient collante, jusqu' à fondre en moyenne vers 70°C ou plus (Donadieu, 2008).
- **Couleur :** Très variable selon sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrêmement riche et étendue rougeâtre, verdâtre, etc. (Lavie, 1975 ; Krell, 1996 ; Evangelist et al., 2001).
- **Saveur :** Elle est souvent âcre et parfois amère (Metzner et Schneidewind, 1997).
- **Odeur :** Variable selon son origine botanique : en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques (Donadieu, 2008).

b) Propriétés chimiques :

- **Solubilité :** La propolis est insoluble dans l'eau froide. Elle est, en revanche, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme... etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Lavie, 1975).
- **Point de fusion :** Son point de fusion se situe autour de 70°C. Chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties :
 - Une partie visqueuse qui tombe au fond du récipient
 - Une partie liquide appelée cire de propolis, qui reste en surface et qui a de nombreux usages dans le domaine apicole (Donadieu, 2008).
- **Densité :** La densité de la propolis est de 1,2 (soit supérieure à celle de l'eau) (Donadieu, 2008).



2.9. Propriétés thérapeutiques :

De nombreuses propriétés sont attribuées à la propolis. Cependant elles sont essentiellement basées sur des données empiriques issues de l'utilisation ancienne de la propolis dans l'exercice de la médecine et parfois sur des études à faible niveau de preuves scientifiques.

a) Action antibactérienne :

L'activité bactéricide de la propolis et/ou de ses constituants est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram- (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+ (**koo H et al., 2000**).

Parmi les bactéries inhibées, on retrouve des streptocoques (*Streptococcus mutans* responsable des caries dentaires), des staphylocoques (*Staphylococcus aureus*) (**Kim et al., 2011**), des Bacilles (*cereus* et *subtilis*), des Salmonella (**Donadieu, 2008**), des microcoques et ainsi sur *Helicobacter pylori* (responsable d'ulcères gastroduodénaux) (**Farseni et al., 2009**).

On attribue cette activité au groupe de flavonoïdes, aux composés phénoliques, mais aussi aux molécules aromatiques, aux acides diterpéniques, acides caféique, férulique, gallique, salicylique ...etc. (**Bankova et al., 1996 ; Boukraâ et Sulaiman, 2009 ; Ramanauskienè et Inkèniènè, 2011**).

Cependant, le mécanisme d'action est encore mal compris. Des chercheurs japonais pensent que l'inhibition de la croissance bactérienne serait due à la destruction de leur paroi empêchant ainsi leur division cellulaire (**Domerego et al., 2009**).

Des tests cliniques in-vitro ont montré que la propolis stimulait l'activité des bactériophages des phagocytes et les rendait deux fois plus actif. Cette action ne rencontre pas de résistance naturelle de la part de ces souches courantes (**Senne, 2010**).

Il a également été montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques (comme l'amoxicilline, l'ampicilline, la gentamycine, le chloramphénicol, etc.), augmente l'efficacité de ces derniers (**Sforcin et Bankova, 2011**).

b) Action antivirale :

L'action antivirale de la propolis a été montrée sur les poliovirus, les virus de type herpès (par des esters de l'acide caféique), les adénovirus (**Donadieu, 2008**), le virus de la grippe H1N1 (**Apimondia, 2001 ; Takemura et al., 2011**), de l'hépatite B (**Apimondia, 2001**) et de la stomatite vésiculaire (**Donadieu, 2008**).



Il existe des propolis ne contenant que peu de flavonoïdes mais ayant néanmoins une action antivirale. Ce serait plutôt les naphthoquinones et les sesquiterpènes qui seraient responsables de cette action (**Apimondia, 2001**).

c) **Action antifongique et antimycosique :**

Les effets antimycosiques de la propolis résultent de l'activité de substances multiples telles que : la Galangine, le Kaempférol, la Pinoцемbrine et l'acide caféique. Cette activité s'exerce sur plusieurs espèces de champignons parasites générateurs de mycoses, notamment : le genre *Candida* et, plus particulièrement, le *Candida albicans* ; les Trichophytons ; les *Microsporium Canis* et *Cryptococcus* (**Apimondia, 2001 ; Donadieu, 2008**).

Les mécanismes ne sont pas complètement élucidés. La principale hypothèse évoque une action antifongique par inhibition de la réplication de l'ADN et donc une inhibition de la division cellulaire. De plus il existe une action antifongique indirecte par stimulation du système immunitaire et plus particulièrement des macrophages (**Martin et al., 2002**).

d) **Action antiparasitaire :**

La propolis s'est révélée être efficace sur certains parasites. Une action antiparasitaire a été démontrée in vitro sur de nombreux parasites : Trypanosomas, Leishmanias, Giardia lamblia, Giardia intestinalis, Trichocephalus dispar, Trichomonas vaginalis ...etc. (**De Castro et Higashi, 1995 ; Abdelfattah et al., 2007**).

Toxoplasma gondii n'échappe pas au spectre large de la propolis. Cette dernière agirait sur la croissance du toxoplasme, l'empêchant de synthétiser ses protéines. Les principes actifs n'ont pas encore été identifiés. La propolis a également une action sur certains vers comme les genres *Ascaris*, *Tænia* et *Enterobius* (**Apimondia, 2001**).

e) **Action antioxydante :**

L'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait correspond à sa capacité à diminuer ou à empêcher les réactions d'oxydation (**Popovici et al., 2009**).

La propolis possède une activité antioxydante démontrée lors de l'opposition à la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) ce qui prévient les dommages des radicaux libres (**Kumazawa et al., 2004 ; Yang et al., 2011**) et la modulation de l'expression des enzymes antioxydantes « catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase » (**Okutan, 2005**).



Les composés antioxydants responsables de cette activité sont principalement les vitamines E et C, les flavonoïdes et les polyphénols « le CAPE, le kaempférol mais aussi les acides cinnamiques : caféique, p-coumarique et férulique » (**Kumazawa et al., 2004**).

Les effets de la propolis ont été mis en évidence dans la cataracte et dans la protection du LDL-cholestérol contre la peroxydation (qui favorise l'artériosclérose) ce qui permet de considérer la propolis comme agent de prévention de la dégénérescence (**Apimondia, 2001**).

f) Action anti-inflammatoire :

L'effet anti-inflammatoire de la propolis est dose-dépendant. Son mécanisme est sensiblement proche de celui de l'aspirine. Les extraits aqueux montrent de meilleurs résultats et de nombreux flavonoïdes y coopèrent certainement (**Borrelli et al., 2002**).

Deux mécanismes anti-inflammatoires de la propolis ont été identifiés :

- Le premier mécanisme consiste en une inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation « cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxydase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase » (**Khayyal et al., 1993**).
- Le second mécanisme implique le CAPE, qui intervient comme un puissant modulateur du métabolisme de l'acide arachidonique, composé à l'origine de la synthèse des leucotriènes et prostaglandines (**Rossi et al., 2002**).

g) Action immunomodulatrice :

La propolis possède une action immunomodulatrice in vitro et in vivo sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise (**Park et al., 2004 ; Orsatti et al., 2010**).

- Action sur les macrophages :

Elle stimule le pouvoir de présentation des macrophages, leur activité lytique et des "Natural killers" contre les cellules tumorales (**Sforcin, 2007**).

- Action sur les lymphocytes et la production d'anticorps :

Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (**Orsi et al., 2000 ; Sforcin, 2007**).

Ses effets biologiques bénéfiques sur le système immunitaire existent en partie grâce au dérivé de l'acide caféique (CAPE) (**Apimondia, 2001**).



h) Action anticancéreuse :

Les propriétés anti-carcinogènes de la propolis et de ses principaux constituants ont été signalées dans de nombreux travaux scientifiques réalisés sur l'animal. Les résultats montrent un effet antiprolifératif vis-à-vis d'un très grand nombre de lignées tumorales (sang, peau, côlon, sein, poumon, pancréas, foie, rein, prostate, cerveau) (**Watanabe et al., 2011**).

Selon **Orsolich (2010)**, l'activité chimio préventive de la propolis dans les modèles animaux et les cultures cellulaires par :

- Leur capacité à inhiber la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales,
- Leur capacité à induire l'apoptose (mort cellulaire) des cellules tumorales
- Leurs propriétés à activer les macrophages, par production des facteurs capables de réguler la fonction des cellules B, T et NK.

L'inhibition du processus tumoral serait due à Des agents cytotoxiques naturels ont présentés dans la propolis, comme les flavanones, l'artépilline C, les diterpénoïdes qui induisent l'apoptose des cellules cancéreuses et notamment le dérivé de l'acide caféique : le CAPE. (**Chen et al., 2011**).

i) Action cicatrisante et régénératrice :

La propolis accélère la régénération des tissus abîmés (pulpe dentaire, tissus hépatiques, osseux). Ces actions sont dues à l'activité antioxydante des flavonoïdes qui piègent les radicaux libres ainsi qu'à des acides phénoliques et certains acides aminés comme la choline (dans la division donc le renouvellement cellulaire) ou la proline (dans la synthèse de collagène, de l'élastine et de facteurs intervenant dans l'élasticité de la peau) (**Blanc, 2010**).

La propolis restructure les membranes capillaires cutanées et la néoformation vasculaire, stimulant les processus métaboliques au niveau cellulaire et tissulaire, lutte contre l'hypoxie tissulaire, réactive les processus enzymatiques et aide à la reformation de la substance fondamentale (**Apimondia, 2001 ; Domerego et al., 2009**).

j) Action analgésique-anesthésiante :

La propolis est un puissant anesthésique (**Metzner et Schneidewind, 1997 ; Burdock, 1998**). Les études ont démontré que cette résine est 52 fois plus puissante que la cocaïne, et sans effets secondaires dans les tests sur les cornées de lapin (**Ghisalberti, 1979**).

Cette action est vraisemblablement liée à l'activité des huiles volatiles de la propolis, mais est indépendante d'un mécanisme central, comme pour la morphine. (**Apimondia, 2001**).



2.10. Utilisation de la propolis

a) Par les abeilles :

Au sein de la ruche, la propolis possède plusieurs rôles :

- **Rôle dans la structure de la ruche :** les abeilles l'utilisent comme un véritable mortier qui permet le colmatage des fissures ou interstices et donc l'étanchéité. Par ailleurs il est aussi utilisé pour le renforcement des rayons ou parties endommagées de la ruche que le climat ou l'apiculteur peuvent occasionner, ce qui permet d'assurer la protection de la colonie en réduisant les possibilités d'entrée dans la ruche (**Jean-Prost, 2005**).
- **Rôle dans l'hygiène de la ruche :** Couche antiseptique mince et uniforme qui tapisse toute la ruche (parois, alvéoles, cadres, etc.). Tout ce qui est en contact avec l'abeille est recouvert de cette substance, afin d'éviter la prolifération de bactéries (**Peacock, 2008 ; Domerego et al., 2009**).
- **Rôle dans la défense de la ruche :** Elle est utilisée pour une barrière de défense en arrière du trou d'envol pour éviter au maximum l'entrée d'intrus. Les ennemis tués dans la ruche, sont enduits de propolis (momifiés) s'ils sont trop importants pour être évacués par les abeilles, ce traitement empêche la décomposition de ces derniers et assure qu'ils ne seront pas à l'origine d'un éventuel développement de micro-organismes (**Apimondia, 2001 ; Donadieu, 2008**).
- **Rôle dans le maintien de la température :** Cette utilité découle de son utilisation pour colmater chaque brèche dans la ruche, elle évite ainsi l'entrée d'air froid. Elle est utilisée pour réduire la taille du trou d'envol pour la période la plus froide de l'année dans le même but. Elle contribue ainsi au maintien du microclimat et à l'isolation thermique de la ruche. (**Donadieu, 2008**).

b) Par l'homme :

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

- **Cosmétique :** La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique, grâce à ses effets sur la régénération et la rénovation des tissus et ses caractéristiques bactéricides et fongicides (**Lejeune et al 1988**).
- **Thérapie :** La propolis est utilisée dans divers traitements tels que les problèmes cardio-vasculaires, les soins dentaires, les ulcères, le cancer, les infections des muqueuses et les lésions (**Krell, 1996**).

1. Matériel

1.1. Matériel non biologique :

Le matériel non biologique comportant l'appareillage, verrerie, les solvants utilisés sera inclus dans l'annexe I.

1.2. Matériel biologique :

❖ La propolis :

Les échantillons de la propolis algérienne utilisés dans notre étude ont été fournis par deux apiculteurs au niveau de deux régions : la première de la wilaya de Blida, la commune de Soumaa et la deuxième de la commune Aïn Sefra, wilaya de Naâma, la récolte est faite durant le printemps. Une quantité de propolis est gardée à l'état brut pour les analyses physiques, ainsi le culot issu de l'étape de filtration est récupéré pour la préparation du savon.

Tableau n°4 : Caractéristiques de provenance des échantillons de propolis.

Echantillon	1	2
Wilaya	Blida	Naâma
Commune	Soumaa	Aïn Sefra
Couvert floristique dominant	- Oranger (<i>Citrus sinensis</i>) - Citronnier (<i>Citrus limon</i>) - Cyprès (<i>Biota Orientalis</i>) - Pin (<i>Pinus nigra</i>) - Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	- Eucalyptus (<i>Eucalyptus astringens</i>) - Jujubier sauvage (<i>Zizyphus lotus</i>) - Pistachier d'atlas (<i>Pistacia atlantica</i>)
Climat	Climat méditerranéen Température moyenne 17.9°C Pluviométrie (791 mm/an)	Climat désertique Température moyenne 17.5°C Pluviométrie (154 mm/an)
Race d'abeille	<i>Apis mellifera intermissa tellienne</i>	<i>Apis mellifera intermissa sahariensis</i>
Méthode de récolte	Raclage des cadres	
Propolis récoltée		

❖ Souches microbiennes :

Les souches microbiennes utilisées (six souches bactériennes et une souche fongique) ont été fournis par le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Brahim Trichine wilaya de Blida. Ces derniers sont isolés de différents prélèvements des malades souffrant des infections urinaires, et maintenu en vie par plusieurs repiquages par semaine. Ces souches sont présentées dans le Tableau n° 5 :

Tableau n°5 : Les souches microbiennes utilisées dans l'antibiogramme.

Souches microbiennes						
Bactérie						Champignon
Gram +			Gram -			
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>

2. Méthodes

Les analyses physicochimiques ainsi que la formulation des produits cosmétique et thérapeutique est réalisés au sein du Laboratoire de Recherche de Plantes Médicinales et Aromatiques, Département de Biotechnologie, Université de Saad Dahleb Blida 1, tandis que l'activité antimicrobienne des échantillons étudiées et des produits formulé est réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Brahim Tirichine et le laboratoire d'hygiène à Blida.

2.1. Traitement de l'échantillon

a) Traitement préliminaire de la propolis :

- La première étape est le tri des impuretés de la propolis brute à l'aide d'une loupe binoculaire, elle consiste a retiré les impuretés visibles telles que les tiges de bois, ailes et corps d'abeille, petits vers blancs secs, etc. La propolis obtenue est conservée au froid à 6°C pendant 72h afin de faciliter le broyage.
- La seconde étape consiste à broyer cette propolis triée dans un mortier jusqu'à obtention d'une poudre grossière. La propolis broyée est alors conditionnée dans des flacons ambrés à température ambiante.

b) Traitement technologique de la propolis :

Les deux échantillons de la propolis subissent une macération dans l'éthanol à 70%. Ce solvant permet l'extraction du maximum des substances bioactives de la propolis. Dans un erlenmeyer, 125g de chaque poudre de propolis obtenue est additionné à 420mL de solvant (à raison de 1g propolis/ 3ml de solvant). Après une semaine sous agitation magnétique continue à température ambiante, la solution est filtrée sous vide.

La phase éthanolique obtenue est alors évaporée à 40 °C sous pression réduite puis séché dans une étuve à 40°C. La poudre résultante est alors conservée à 4 °C à l'obscurité jusqu'à son utilisation (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

Le taux de l'extraction (rendement) est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P_0 : poids de la poudre avant l'extraction.

P_1 : poids de l'extrait sec après l'extraction.

c) Préparation des extraits éthanolique de propolis :

Pour l'étude du profil chimique et la réalisation de l'antibiogramme, une partie d'extrait environ 700 mg (1 ml) est dilué dans 10 ml d'éthanol, puis une série de dilutions décimale est réalisée (S_1 , S_2 et S_3), dont la concentration de chacune est (70, 7, 0.7 mg/ml).

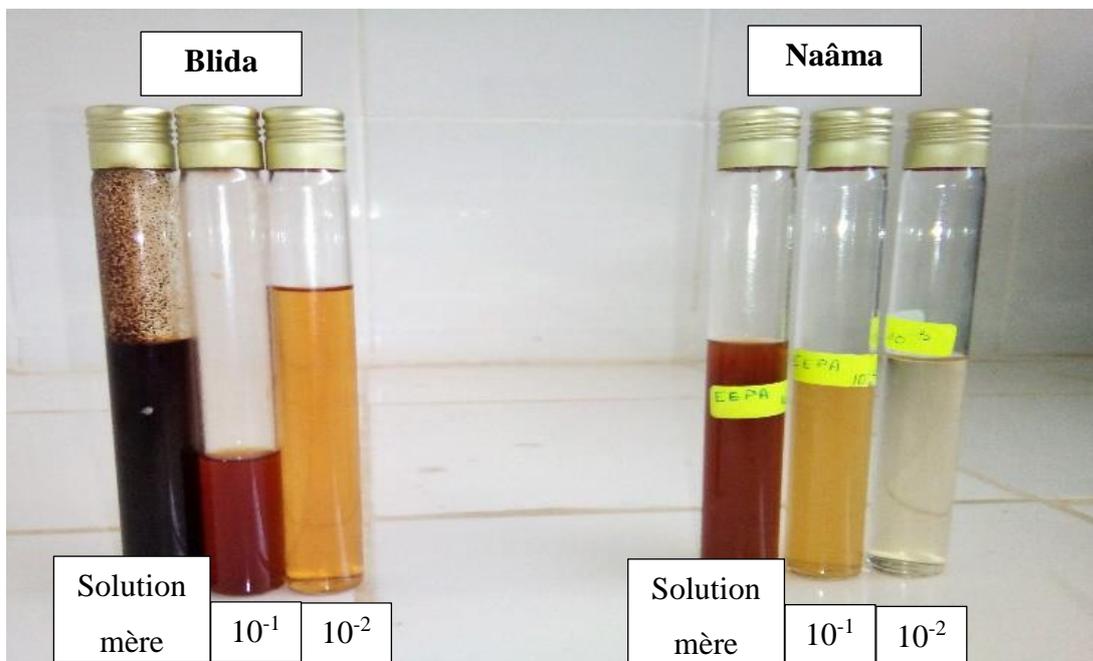


Figure n° 8 : Les extraits éthanoliques de propolis.

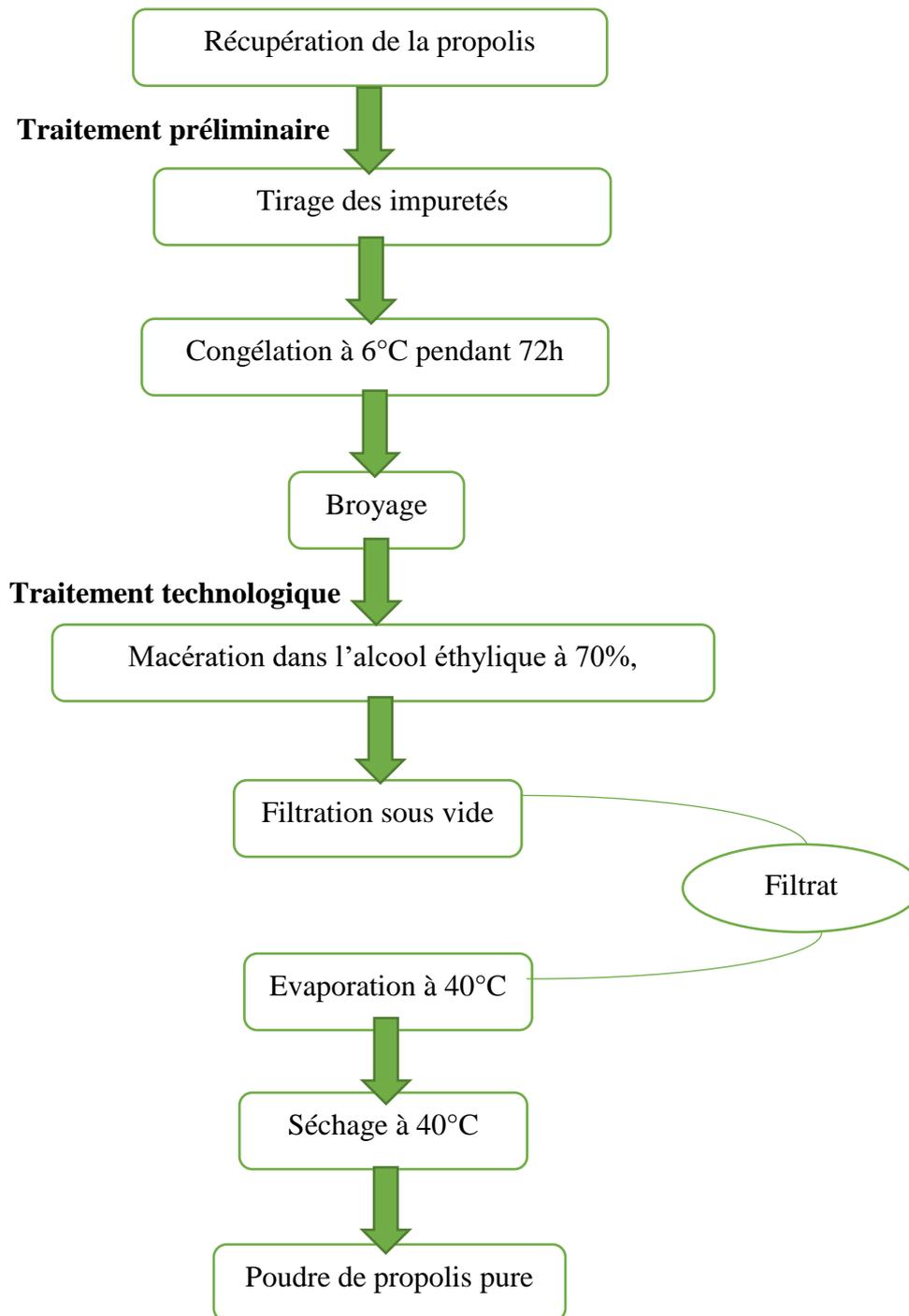


Figure n°9 : Traitements de la propolis.



2.2. Méthodes d'analyses physiques

a) Détermination de taux des pertes pendant le séchage

▪ Principe :

Le taux des pertes pendant le séchage, c'est-à-dire l'eau et les matières volatiles est déterminé sur une partie aliquote d'échantillon coupé en petits morceaux et mise dans une capsule en porcelaine puis séché dans une étuve réglée à une température de 103 ± 2 °C, jusqu'à obtention d'un poids constant. Le taux des pertes pendant le séchage a été déterminé selon la norme AFNOR (NF T 60-305, Juin 1976)

▪ Mode opératoire :

L'opération commence par le séchage des capsules vides à l'étuve durant 15 mn à 103 ± 2 °C, ensuite les refroidir dans un dessiccateur, les peser et les tarer. Dans chaque capsule 2 g d'échantillon brut préalablement couper en petits morceaux sont pesés et placés dans une étuve réglée à 103 ± 2 °C et laisser pendant 3 heures. Ces capsules ont retiré de l'étuve et placés dans le dessiccateur et pesés après refroidissement. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant en réduisant la durée de séchage à 30 mn pour éviter la caramélisation.

▪ Expression des résultats :

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H \% = (M_1 - M_2) / P \times 100$$

$$\text{Matières sèches} = 100 - H\%$$

Soit :

H % : Humidité + Matières volatiles

M₁ : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en g.

M₂ : Masse de l'ensemble après séchage en g.

P : Masse de la prise d'essai en g.

b) Détermination de la teneur en cendres

▪ Principe :

Le taux de cendres a été déterminé selon la norme française NF V05- 113 (1972). La propolis brute est coupée en petits morceaux puis calcinée à 550 °C dans un four à moufle jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre de poids constant.

▪ Mode opératoire :

Dans des capsules en porcelaine, 2 g de propolis coupée en petits morceaux sont pesés, placés dans un four à moufle réglé à 550 ± 15 °C et laissé pendant 5 heures jusqu'à l'obtention



d'une couleur grise, claire ou blanchâtre. Les capsules sont ensuite retirées du four, mises dans le dessiccateur pour se refroidir et peser par la suite.

▪ **Expression des résultats :**

La teneur en cendres (Cd) est calculée comme suit :

$$MO \% = (M1-M2) / P \times 100$$

$$Cd = 100 - MO \%$$

Soit :

MO % : Matière organique.

M₁ : Masse des capsules + prise d'essai.

M₂ : Masse des capsules + cendres.

P : Masse de la prise d'essai.

c) La masse volumique :

▪ **Principe :**

Préparation d'un morceau de propolis brute de 1 g et l'introduit dans une éprouvette graduée contenant un volume de 10 ml d'eau distillé. Détermination du volume occupé par ce dernier.

2.3. Méthodes d'analyses chimiques :

a) Détermination du pH :

▪ **Principe :**

Se base sur la détermination en unité de pH suivant la norme AFNOR (NF V 05-108, 1970) de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse de la propolis découpée en petits morceaux.

▪ **Mode opératoire :**

Une partie de l'échantillon de la propolis est coupée en petits morceaux, placés dans un bécher et y ajouter trois fois son volume d'eau distillée. Chauffer au bain-marie pendant 30 mn en remuant de temps en temps avec une baguette de verre. Le mélange obtenu est filtré et procéder ensuite à la détermination du pH en prenant soins que l'électrode soit complètement immergée dans la solution.

b) Détermination de l'acidité titrable :

▪ **Principe :**



L'acidité titrable (en mEq/100g), a été déterminée suivant la méthode colorimétrique décrite par la norme française NF V05-101 (AFNOR, 1974) avec quelques modifications. Le principe consiste en le titrage de l'acidité d'une solution aqueuse avec une solution d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

▪ **Mode opératoire :**

12.5 g de propolis coupée en petits morceaux sont pesé et placé dans une fiole conique avec 25 ml d'eau distillée chaude récemment bouillie et refroidie, puis mélanger jusqu' à l'obtention d'un liquide homogène. Un réfrigérant à reflux est adaptée à la fiole conique puis, le contenu est chauffé au chauffe ballon pendant 30 mn pour liquéfier la propolis.

Refroidir, transvaser quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 125 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie, bien mélanger puis filtrer. Ensuite, 50 ml de l'échantillon sont prélevé à la pipette et versé dans un bécher sous agitation magnétique. Quelques gouttes sont ajoutées (environ 0.5ml) de phénolphtaléine et le titrage est réalisé avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0.1N jusqu'à obtention d'une couleur rose pendant 30s.

▪ **Expression des résultats :**

L'acidité titrable est exprimée selon la formule suivante :

$$A\% = (125 \times V_1 \times 100) / (V_0 \times M \times 10)$$

M : Masse, en grammes de produit prélevé.

V₀ : Volume en millilitres de la prise d'essai.

V₁ : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 N utilisé.

2.4. Etude de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des extraits éthanoliques de la propolis est exprimée par la neutralisation des radicaux libres par la méthode colorimétrique DPPH. Le composé chimique DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Brand-Williams, 1995**).

▪ **Principe :**

Le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est défini comme radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption.

Il réagit avec des groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques, etc... Cette propriété est largement recommandée et utilisé dans la pratique analytique. Quand la solution de DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut donner

un atome d'hydrogène ou un électron, alors ceci provoque la forme réduite (1,1-diphényl-2-(2,4,6-trinitrophényl)hydrazine (DPPH₂)) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle due à la présence de groupement picryl selon la réaction suivante : (Molyneux, 2004).

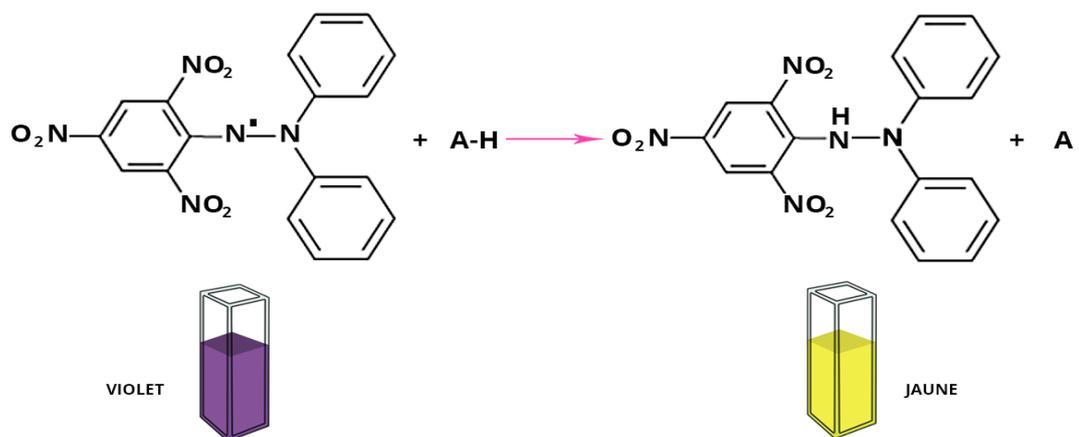


Figure n° 10 : Réduction du radical libre DPPH en DPPH₂.

<http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe> consulté le

15/03/2019

▪ **Mode opératoire :**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de propolis via le test DPPH, est effectuée par la méthode de (Shi, 1991).

Une solution méthanolique de 0.04 mg/ml de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits de propolis. A cet effet, 100 µl de chaque dilution de ces extraits sont mis dans un tube à essai, et additionnés de 2 ml de solution méthanolique de DPPH. Après une incubation de 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm contre la solution témoin composée de 2 ml de la solution de DPPH et 100 µl de méthanol. Des antioxydants de synthèse (acide ascorbique) sont préparés dans les mêmes conditions et utilisées comme standards de contrôle qualité pour leurs effets sur le pouvoir anti-radicalaire. Les extraits ou les composés à tester ainsi que les standards sont dilués dans le méthanol absolu.

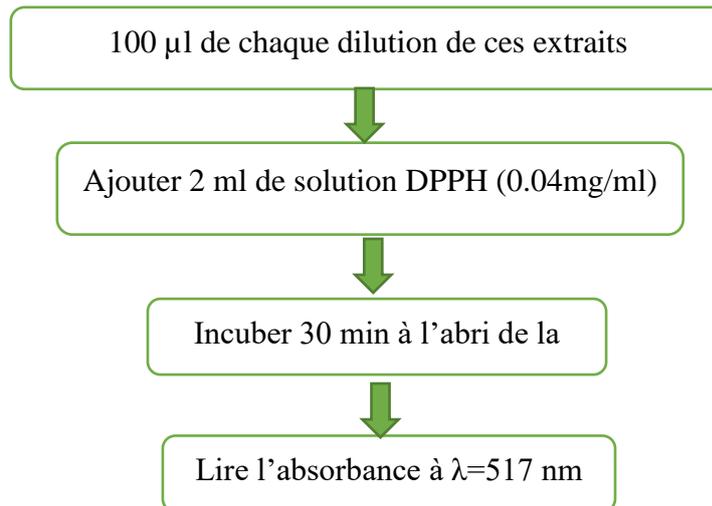


Figure n° 11 : Etapes de test DPPH.

▪ **Expression des résultats :**

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition de celui-ci selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH} = (A_C - A_E) / A_C \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle.

A_E : Absorbance de l'échantillon.

2.5. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite en 1965 par Singleton et Rossi. D (**Li et al., 2007**)

▪ **Principe :**

La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu est la plus fréquemment utilisée. Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). L'intensité de cette coloration bleue est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu ayant un maximum d'absorption à 765 nm (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**).

▪ **Mode opératoire :**

0.5 ml de EEP est mélangé avec 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 0.5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 10 %. Ensuite 5 ml d'eau pour diluer le mélange sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 760 nm après 1h d'incubation à température ambiante contre un blanc préparé suivant la même méthode, sauf que l'extrait a été remplacé par le solvant. Une



courbe standard est réalisée avec différentes concentration de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. Les mesures ont été faite en triple.

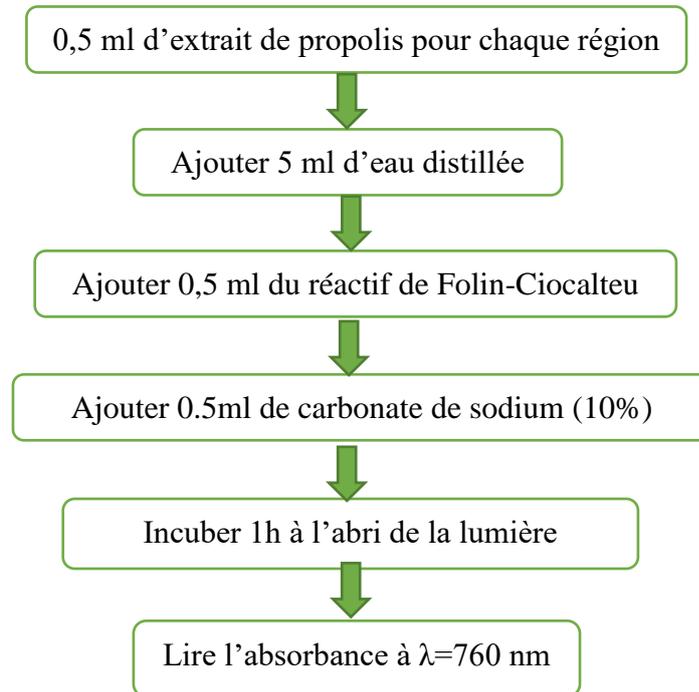


Figure n° 12 : Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux.

▪ **Expression des résultats :**

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de propolis sont calculées en extrapolant les valeurs d'absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1 g d'extrait (mg GAE/ g) selon la formule suivante :

$$\text{Taux de PT} = (C_{AG} / C_e) \times 1000$$

PT : Polyphénols totaux en (mg GAE/ g)

C_{AG} : Concentration d'acide gallique (mg/ml)

C_e : Concentration d'EEP en (mg/ml)

2.6. Dosages des flavonoïdes :

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de propolis est réalisée par la méthode de (Bahorun et al.,1996) avec quelques modifications.

▪ **Principe :**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium).

Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. (Ribéreau-Gayon, 1968). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait.

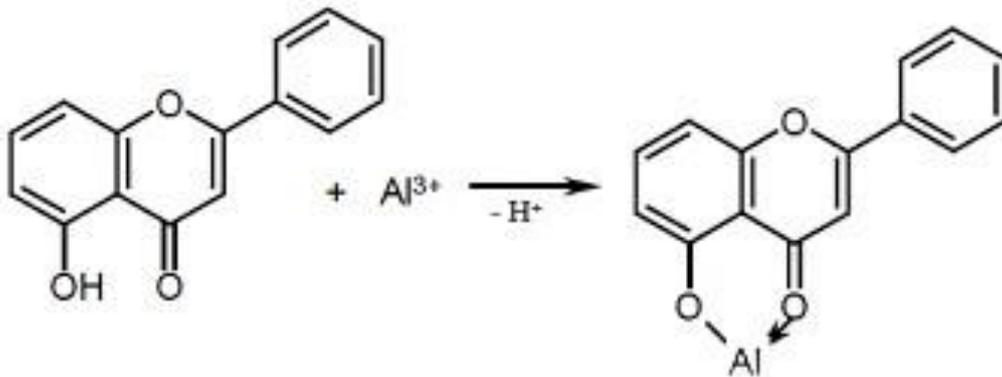


Figure n° 13 : Réaction du Chlorure d'aluminium et des Flavonoïdes.

<http://dspace.univmsila.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/8823/Chapitre%20IIII.pdf?sequence=5&isAllowed=y> consulté le 09/02/2019

▪ **Mode opératoire :**

Au 1 ml d'EEP, 1 ml d'une solution méthanolique de $AlCl_3$ 2% est ajouté, le blanc utilisé est le mélange réactionnel sans échantillon et le standard utilisé est un flavonol, la quercétine, à différentes concentrations afin d'établir la droite d'étalonnage. Après 1h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 430 nm. Les mesures ont été faite en triple.

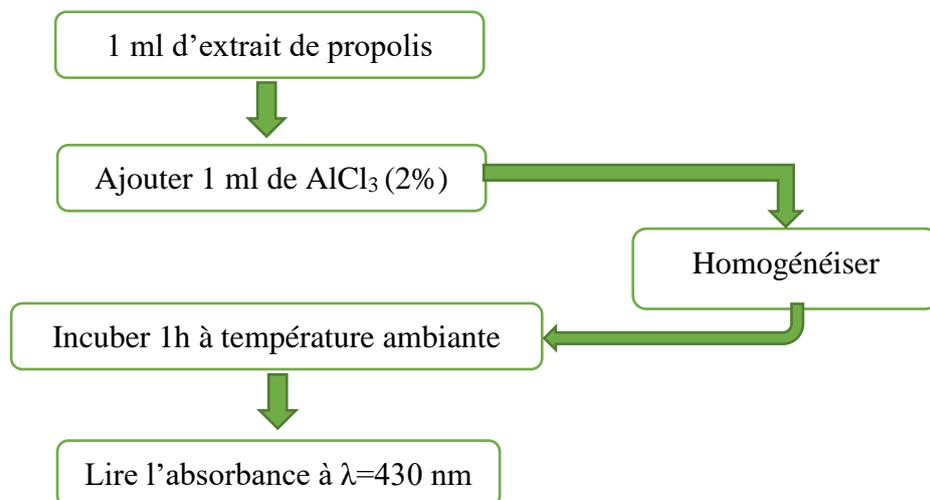


Figure n°14 : Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes totaux.



- **Expression des résultats :**

La concentration des échantillons de propolis en composés flavonoïques est déterminée en extrapolant les absorbances de ceux-ci à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard. La quantité des flavonoïdes est exprimée en équivalents milligramme de quercitrine par gramme d'extrait (mg EQ/g) selon la formule suivante :

$$\text{Taux de FT} = C_Q / C_e \times 1000$$

FT : Flavonoïdes totaux en (mg EQ/g)

C_Q : Concentration de quercétine (mg/ml)

C_e : Concentration d'EEP en (mg/ml)

2.7. Dosage des sucres totaux :

Les sucres totaux sont déterminés par le test au Phénol (**méthode de DUBOIS et autres, 1956**).

- **Principe :**

En présence de l'acide sulfurique concentré, les oses sont déshydratés en composés de la famille des dérivés furfuriques. Ces produits se condensent avec le Phénol pour donner des complexes jaune-orangé. La teneur en sucres totaux est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm (**Goodon B, 1997**).

- **Mode opératoire :**

Dans un tube en pyrex, 1 ml d'EEP, 1ml de la solution phénol (50g/l) et 5ml d'acide sulfurique sont mélangés avec précaution. Après homogénéisation légère de mélange réactionnel et refroidissement (pour diminuer la chaleur réactionnelle), la densité optique est mesurée à 490 nm. Le blanc utilisé est le mélange réactionnel sans échantillon et le standard utilisé est le glucose avec différentes concentrations préparées dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les mesures ont été faites en triple.

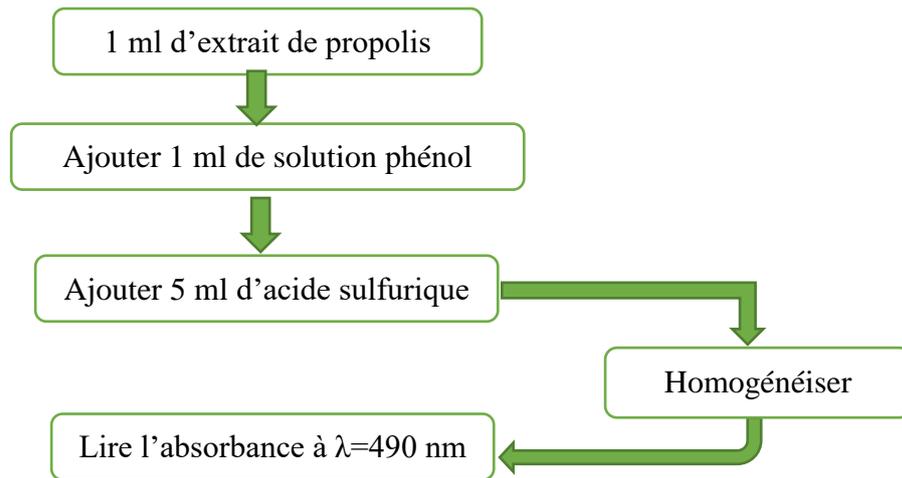


Figure n°15 : Organigramme représentant le dosage des sucres totaux.

▪ **Expression des résultats :**

La teneur en sucres totaux contenu dans les extraits de propolis est calculée en extrapolant les valeurs d'absorbance à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le glucose comme standard. Les résultats sont exprimés en mg glucose/ 100 g d'extrait selon la formule suivante :

$$\text{Taux de ST} = C_s / C_e \times 1000$$

ST : Sucres totaux en (mg EG/g)

C_s : Concentration de glucose (mg/ml)

C_e : Concentration d'EEP en (mg/ml)

2.8. Etude de l'activité antimicrobienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de propolis a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose (NCCLS, 2002). Nous avons choisi d'évaluer nos extraits de propolis sur un panel représentatif de bactéries Gram (-) et Gram (+), responsables d'infections nosocomiales, résistantes aux antibiotiques et les plus communes dans le milieu hospitalier.

▪ **Principe :**

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

▪ **Mode opératoire**



- **Réactivation des souches :**

Les souches bactériennes sont réactivées à partir du milieu de conservation par passage successif sur bouillon nutritif puis sur milieu de culture solide, non sélectif (Gélose Nutritive). L'ensemencement se fait en étalant sur la surface de la gélose nutritive, la souche bactérienne sélectionnée. Les boîtes de pétri sont fermées après chaque opération puis renversées et mises en incubation dans un étuve à 37°C pendant 24 heures. Après cette période d'incubation, les boîtes sont retirées et les cultures pures et jeunes serviront à la préparation des suspensions bactériennes.

- **Préparation d'inoculum :**

Cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, grâce à une anse de platine stérile puis déchargées dans un tube à essai contient 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée puis ajustée au standard Mc Ferland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ ml (Andrew, 2009).

- **Ensemencement :**

L'ensemencement par les suspensions bactériennes préparées est effectué par la méthode d'écouvillonnage à la surface de boîtes de pétri préalablement coulée avec la gélose de MH (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures). À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose.

- **Dépôts des disques stériles :**

Des disques stériles de papier buvard de 9mm de diamètre sont saisis à l'aide d'une pince stérile et imprégnés de 75 µl d'EEP de chaque extrait testé à différentes concentrations (Solution mère, S₁ et S₂). Les disques sont égouttés puis appliqués à la surface des boîtes précédemment ensemencées en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu.

Enfin, les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à température ambiante (sur la paillasse) pour une bonne diffusion de l'extrait, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 25°C pour les levures pendant 24h.

▪ **Expression des résultats :**



Les résultats sont interprétés par mesure à l'aide d'une règle graduée, du diamètre de la zone d'inhibition formée autour du disque de la zone d'inhibition autour du disque et comparés aux limites acceptables des diamètres des zones d'inhibition.

3. Essai de valorisation de la propolis dans le domaine cosmétique et thérapeutique

3.1. Essai de formulation d'un savon naturel à base de propolis :

Au sens strict et originel, le terme savon signifie un produit obtenu par une réaction dite de saponification et qui, par son action détergente, sert au nettoyage et au blanchiment. La saponification, c'est la réaction chimique d'une base (ou alcali) sur un corps gras. Donc la formulation d'un savon nécessite le mélange d'un corps gras (huiles et beurres d'origine végétale ou animale) avec un alcali (potasse, soude) en respectant les règles élémentaires d'hygiène et de sécurité et les quantités à mélanger. Pour assurer l'effet thérapeutique de la propolis deux préparations de savon sont mises en place :

- la première est pure destinée pour la réalisation des tests (un seul corps gras) additionnés de trois types de propolis (propolis brute broyée, extrait éthanolique de propolis et le culot obtenu dans l'étape de macération).

- la deuxième est améliorée par l'addition d'un mélange varié de corps gras à la soude, lorsque la saponification est à terme, une quantité de propolis est ajoutée comme traitement antimicrobien.

a) Formulation d'un savon pure

▪ **Les ingrédients :**

- Huile de maïs
- Eau distillée stérile
- Soude
- Propolis
- Alcool

(Préparés après plusieurs essais)

▪ **Mode opératoire :**

La formule utilisée dans la préparation des savons purs est obtenue après plusieurs essais. Il faut d'abord stériliser tout le matériel utilisé et le lieu de travail à l'alcool à 70°. Dans un bol en verre faire diluer la soude dans l'eau distillée stérile puis laisser le mélange refroidir. Chauffer au bain marie l'huile de maïs. Quand les deux phases sont à la même température ($\leq 45^{\circ}\text{C}$), verser la soude dans la phase huileuse. Mélanger les deux jusqu'à l'apparition de la

trace. Partager le mélange sur quatre bols en inox puis incorporer la propolis (la propolis brute broyée dans le premier bol, l'EEP dans le deuxième et le culot issu de processus de filtration dans l'EEP). Un témoin sans propolis est ajouté à l'essai.

Le mélange est versé ainsi dans les moules et homogénéiser. Recouvrir avec un film en plastique alimentaire et laisser afin de bien favoriser le processus de saponification. La durée de saponification dépend du mélange préparé, elle varie de 24h et plus pour enfin pouvoir démouler le produit. Pour pouvoir utiliser ce savon sans risque pour la santé, il doit être conservé dans un endroit assez sombre et bien ventilé durant minimum 4 semaines avant utilisation.



Figure n°16 : Etapes de la préparation du savon formulé à froid.

b) Test d'efficacité du savon formulé :

Afin de tester l'efficacité des savons préparés, un antibiogramme selon la méthode de diffusion par disque sur milieu solide (gélose) cité préalablement est réalisé en utilisant les savons préparés (des disques imprégnés par solutions de chaque savon) dans des boîtes contenant les milieux de cultures portant les germes obtenus par écouvillonnage cutané.

▪ **Mode opératoire :**

Les germes utilisés sont obtenus par écouvillonnage cutané. L'écouvillonnage consiste à passer un écouvillon de coton, dans un mouvement en Z combiné à une rotation. Devant le bec bunsen, frotter l'écouvillon préalablement humidifié avec de l'eau physiologique stérile à la main de l'opérateur. Après avoir effectué le prélèvement, décharger l'écouvillon dans le milieu de transport ou qui permet de conserver les bactéries pour une durée de 48 heures et également d'en inhiber la multiplication.



A l'aide d'une micropipette, 1 ml de la solution contenue dans le tube d'écouvillonnage est prélevé puisensemencé sur des boîtes de Petri contenant le milieu GN. Les boîtes sont fermées, renversées et mises en incubation dans un étuve à 37°C pendant 24 heures.

Cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, grâce à une anse de platine stérile puis déchargées dans un tube à essai contient 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% NaCl. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée puis ajustée au standard Mc Ferland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ 108 UFC/ ml.

L'ensemencement par la suspension bactérienne préparée est effectué par la méthode d'écouvillonnage à la surface de boîtes de pétri préalablement coulée avec la gélose de MH. À l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries parallèles et aussi serrées que possible. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose.

Des disques stériles de papier buvard de 9mm de diamètre sont saisis à l'aide d'une pince stérile et imprégnés de 75 µl de suspension de chaque savon testé (1g de chaque savon dans 9 ml d'eau physiologique stérile). Les disques sont égouttés puis appliqués à la surface des boîtes précédemmentensemencées en appuyant légèrement pour assurer le contact avec le milieu.

c) Formulation d'un savon amélioré à base de propolis

Dans le but d'améliorer la qualité du produit biocosmétique et obtenir un savon à effet adoucissant, nourrissant, assouplissant, réparatrice et hydratant la formule du savon pure est fertilisé par l'addition un mélange varié de corps gras chacun d'eux possèdent de nombreuses vertus pour la peau.

▪ Les ingrédients :

- Huile de coco
- Huile de maïs
- Cire d'abeille
- Beurre de karité
- Soude caustique
- Eau déminéralisée
- Propolis (EEP)
- Alcool



▪ **Mode opératoire :**

Il faut d'abord stériliser tout le matériel et le lieu de travail à l'alcool 70°. Faire fondre la phase huileuse au bain marie (beurre de karité, cire d'abeille, huile de coco et huile de maïs). Diluer la soude dans l'eau déminéralisée.

Quand les deux phases (huileuse et liquide) atteignent la même température ($\leq 45^{\circ}\text{C}$), verser la soude dans les huiles et mélanger jusqu'à l'obtention de la trace. Ensuite, incorporer la propolis mélanger bien puis verser le tout dans des moules en silicones. Protéger les moules par le plastique alimentaire et mettre à l'abris pour favoriser le processus de saponification. Après un temps nécessaire pour la saponification selon le mélange utilisé, les savons sont prêts à être démoulés.

Ces savons sont conservés dans un endroit assez sombre et bien ventilé durant la période nécessaire pour l'achèvement de la saponification qui dépend des ingrédients mélangés dans la préparation. Les savons sont prêts à être utilisés sans risque pour la santé après avoir effectué des tests cutanés au préalable.



1. Rendements des deux échantillons :

Les rendements en extrait éthanoliques sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°6 : Les rendements de propolis en extrait éthanolique.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Rendement (%)	38,8	30,9

Le taux de rendement des deux échantillons de propolis étudiés varie entre 30% et 38%. L'échantillon de Blida est plus rentable avec 38,8% par rapport à celui de Naâma.

Sachant que l'extraction a été réalisée par le méthanol, des études munis par (Rebiai et al., 2013) ont trouvé un rendement très faible de 0,72% pour la propolis de Ghardaïa et seulement 2,41% pour celle de Khenchla. En revanche une étude réalisée par Belkhiri et Bouab en 2018 a rapporté des taux d'extraction par l'éthanol à 96% variant entre 26% et 38% pour la wilaya d'Oum El Bouaghi, 33% pour Constantine. La propolis d'Italie a donné également un rendement de 55% par l'éthanol 70% (Trusheva et al., 2007).

Cette hétérogénéité de résultats obtenus à l'échelle nationale et globale révèle que le taux d'extraction varie selon le type de solvants ainsi que la provenance de la propolis, ce qui prouve la complexité de la composition de la propolis.

2.1. Résultats d'analyses physiques

a) Pertes pendant le séchage :

Les résultats de la teneur en pertes pendant le séchage (élimination d'humidité et de matières volatiles) sont reportés dans le tableau suivant :

Tableau n°7 : Les taux de pertes et la matière sèche des échantillons de propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Taux des pertes pendant le séchage (%)	3	4,5
Matière sèche (%)	97	95,5



Les valeurs de taux de perte calculés montrent que les deux échantillons sont pauvres en eau et en matières volatiles, ce qui donne à la propolis sa structure solide. Les analyses ont montré un taux de perte comprise entre 3% et 4,5%, ce qui signifie que la très grande proportion du poids de la propolis est constituée par la matière sèche (97% et 95,5%).

Par comparaison l'échantillon de Blida présente une valeur légèrement inférieure à celui de Naâma, ces valeurs concordent bien avec celles trouvées selon une étude faite par (Ferhoum, 2009) avec un échantillon de la même région (Mitidja) et qui est de l'ordre 3,89% de pertes.

b) Teneur en cendre :

Le taux des cendres nous renseigne sur la quantité totale en sels minéraux présents dans un échantillon de propolis, et par déduction le taux de la matière organique présent dans le même échantillon. Les résultats obtenus son illustriez dans le tableau suivant :

Tableau n°8 : Taux des cendres et de la matière organique de la propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Taux de cendre (Cd%)	2,86%	3,01%
Matière organique (MO%)	97,14%	96,99%

Le taux de cendres exprimés en pourcentage est compris entre 2,86% pour l'échantillon de Blida et 3,01% pour l'échantillon de Naâma. Le taux de matière organique est le même 97%, ce qui permet de déduire que les deux échantillons de la propolis étudiés ont la même richesse en matière organiques.

Les teneurs en cendres obtenus sont en concordance avec les valeurs trouvées par (Ferhoum, 2009) qui note un taux de cendre variant entre 1,58% et 5,32 % pour la propolis algérienne et supérieures comparativement aux propolis d'Argentine (1,8% à 2,4%) (Tosi et al., 2006).

Ces résultats montrent que la variation de la teneur en cendres peut s'expliquer par les matières collectées par les abeilles lors de la recherche de nourriture et qui sont principalement déterminée par le sol et le climat.

c) Masse volumique :



Les résultats du calcul de la masse volumique exprimés en g/cm³ des deux échantillons de propolis sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°9 : La masse volumique de la propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Masse volumique (g/cm ³)	1,1	0,8

La masse volumique varie entre 1,1 pour l'échantillon de Blida et 0,8 pour l'échantillon de Naâma, ce qui signifie que la propolis de Naâma a perdu une grande partie de ces constituants. Cela peut également nous renseigner sur les mauvaises conditions de conservation de l'échantillon (conservation à l'air libre), chez l'apiculteurs dès la récolte.

2.2. Résultats d'analyses chimiques :

a) Ph :

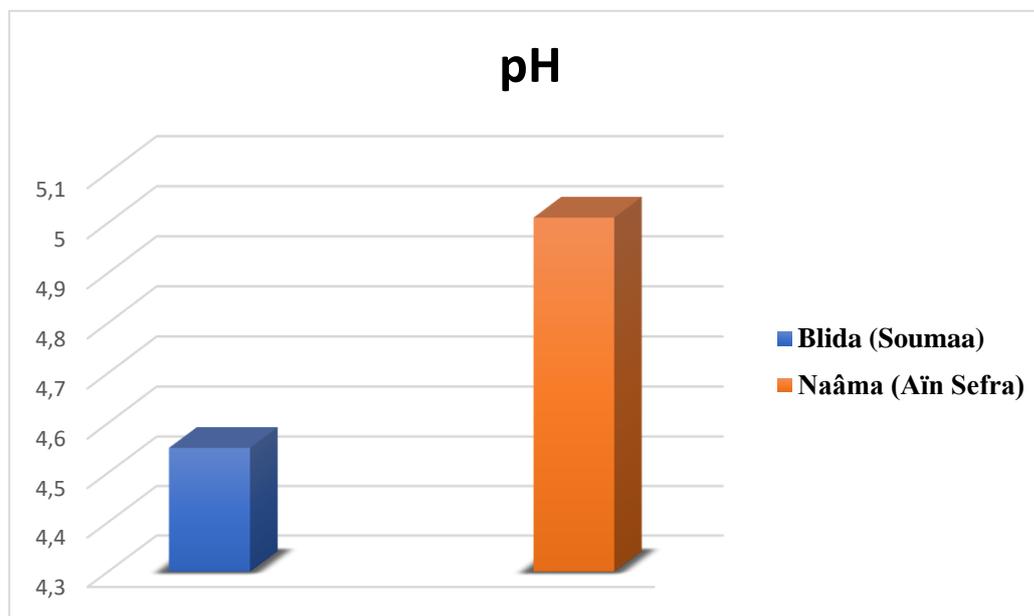


Figure n° 17 : Valeur de pH des différents échantillons de propolis.

Les valeurs du pH des échantillons de propolis sont comprises entre 4,55 et 5,01. Ce qui signifie que toutes les propolis sont de nature acide, cette acidité est due à la richesse de la propolis en acides aromatiques et acides aliphatiques.



L'échantillon de Blida présente un pH plus acide que l'échantillon de Naâma, cette différence en potentiel hydrogène peut-être expliqué par la variation du régime alimentaire de l'abeille dans les deux régions.

b) Acidité titrable :

L'acidité titrable nous renseigne sur la quantité en acides organiques présents dans l'échantillon de propolis. Les résultats de dosage de l'acidité titrable des deux échantillons de propolis sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n° 10 : Acidité titrable des échantillons de la propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Volume de soude (ml)	4,2	4
A (%)	8,4	8

Les résultats d'acidité titrable des deux échantillons de propolis révèlent des valeurs voisines variant entre 8 et 8,4 et confirment les résultats du pH trouvées précédemment qui indiquent que l'échantillon de Blida est le plus riche en acide organiques, cela est due à l'alimentation de l'abeille tellienne qui est basé principalement sur la consommation des agrumes.

3. L'activité antioxydante :

Les résultats de l'activité de piégeage vis-à-vis le DPPH sont représentés dans la Figure n°18.

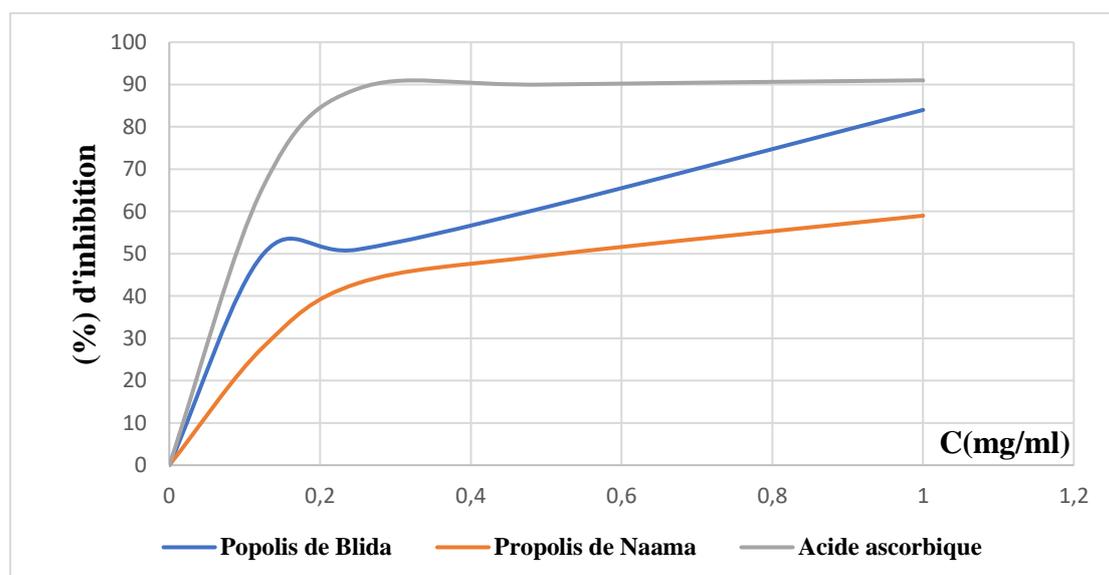


Figure n° 18 : Pourcentage d'inhibition des radicaux libres.



D'après les courbes illustrées précédemment, on remarque que les activités antiradicalaires des extraits de la propolis sont assez importantes et que le pourcentage d'activité antioxydant augmente avec l'augmentation de la concentration pour les deux extraits de propolis. Il semble que l'activité antiradicalaire est fortement dépendante des concentrations des extraits de propolis, plus l'extrait est concentré, plus le pourcentage d'activité est élevé (figure18).

Afin d'établir une comparaison entre les échantillons, les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH.

Tableau n°11 : Valeurs d'IC₅₀ des différents échantillons de propolis analysés.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)	Acide ascorbique
IC ₅₀ (mg/ml)	0,38	0,66	0,11

L'échantillon de Naâma possède la valeur la plus élevée en concentration d'inhibition IC₅₀ de l'ordre 0.66 mg/ml par rapport à l'échantillon de Blida qui possède une valeur de 0.38 mg/ml, cela confirme que la propolis de Blida contient la plus grande quantité de composés accepteurs de radicaux libres et le plus grand potentiel antioxydant car plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. En comparaison avec la vitamine C qui est le piègeur du radical DPPH le plus puissant avec une valeur de IC₅₀ de l'ordre 0.11, l'extrait de Blida testés s'avère plus actifs.

4. Teneur en polyphénols totaux :

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits éthanoliques de la propolis ont été mesurées et exprimées en mg EAG/g d'extrait. Les résultats de dosage des échantillons de propolis analysés sont rapportés dans le Tableau n° 12.

Tableau n°12 : Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g d'EEP)	285,66 ± 3,72	73,88 ± 0,1



Les échantillons étudiés présentent des valeurs importantes variant entre $73,88 \pm 0,1$ et $285,66 \pm 3,72$ mg EAG/ g d'extrait. L'échantillon de Blida marque la concentration la plus élevée en polyphénols en comparaison avec celle de Naâma. Ces résultats sont jugés satisfaisants si on se réfère à ceux trouvés dans d'autres régions algériennes mentionnés dans le travail de (Ferhoum, 2009) avec des taux allant de 233,075 à 244,42 mg EAG/g, et dans l'étude faite par (Boufadi et al., 2014) qui montrent que la propolis d'Aïn Témouchen contient 194 ± 14 mg EAG /g et celle de Laghouat contient 91 ± 1 mg EAG /g.

Des travaux réalisés sur la propolis d'autre pays montre une hétérogénéité dans les résultats obtenus. La propolis brésilienne possède une teneur de l'ordre de 232 ($\pm 22,3$) mg EAG/g (Alencar et al., 2007), la propolis du Portugal, montrant des teneurs en polyphénols totaux de l'ordre ($329,00 \pm 0,01$) mg EAG/g (Leandro et al., 2008), tandis que la propolis coréenne a montré une teneur de $212,7 \pm 7,4$ mg EAG /g (Choi et al., 2006). Seul l'étude réalisée par (Ahn et al., 2007) sur la propolis chinoise indique des résultats semblables aux résultats obtenus dans la présente étude, ces valeurs en composés phénoliques oscillent entre 64 et 284 mg / g.

Toutes ces différences dans la teneur en polyphénols peuvent revenir aux conditions environnementaux (le climat, la nature du sol, le couvert floristique) de chaque région de l'échantillon récoltée, ou/et aux conditions expérimentaux (les procédures d'extraction, le dosage et les différents solvants utilisés).

5. Teneur en flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis exprimée en mg EQ/g d'extrait est rapportée dans le Tableau n°13.

Tableau n°13 : Teneurs en flavonoïdes des différents échantillons de propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'EEP)	$68,98 \pm 0,24$	$60,90 \pm 2,19$

Les flavonoïdes sont une classe de composés ubiquitaires dans les plantes (ce qui prouve que la propolis est beaucoup plus d'origine végétale) (Macheïx, 1990), donc la quantification de la teneur en flavonoïdes peut être utilisée comme un indice de provenance de la propolis.



La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait de Blida est le plus riche en composés flavonoïques avec une teneur de $68,98 \pm 0,24$ mg EQ/g d'extrait. Les résultats obtenus durant cette étude sont différents de ceux trouvés par quelques auteurs dans d'autres régions du pays. Une étude faite par (Boufadi et al., 2014) révèle des teneurs en flavonoïdes de 32 ± 1 mg EQ/g pour la propolis de Djelfa, et de $14,4 \pm 0,9$ mg EQ/g pour la propolis de Laghouat.

Selon les travaux réalisés par (Kumazawa et al., 2004) cité précédemment (Tableau n°3) sur la propolis provenant du Brésil et du Sud d'Afrique, la teneur des flavonoïdes obtenu dans la présente étude sont jugés satisfaisants.

6. Teneur en sucres totaux :

Les teneurs en sucres totaux dans les extraits de propolis sont exprimées en mg équivalent de glucose par 100 g d'extrait qui sont présentés dans Tableau n°14 :

Tableau n°14 : Teneur en sucres totaux des différents échantillons de propolis.

Echantillon	Blida (Soumaa)	Naâma (Aïn Sefra)
Teneur en sucre totaux (mg EG/ g d'EEP)	$0,24 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$

D'après les résultats de dosage chlorométrique, les sucres totaux sont présents dans les échantillons de propolis étudiées en état de trace et avec des teneurs similaires. En se référant au travail réalisé par (Ferhoum ,2009) sur la propolis algérienne qui a donné des teneurs en sucres totaux oscillent entre 0,47 et 3,46 mg EG /100 g d'extrait, nos échantillons semblent pauvres en sucres totaux.

7. L'activité antimicrobienne :

L'évaluation des activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques de la propolis, provenant des deux régions étudiées, à l'égard des bactéries pathogènes testées a été réalisée selon la méthode de diffusion par disque sur gélose. Les résultats de mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne obtenus sont mentionnés dans le tableaux suivant :



Tableau n° 15 : Mesure des diamètres des zones d'inhibition.

Echantillons Germes	Zones d'inhibition (mm)					
	Blida (Soumaa)			Naâma (Aïn Sefra)		
	Solution mère	10 ⁻¹	10 ⁻²	Solution mère	10 ⁻¹	10 ⁻²
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	12	10	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21	15	12	13	12	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	11	11	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	10	-	11	11	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	11	10	12	11	11
<i>Bacillus subtilis</i>	-	17	12	-	15	14
<i>Candida albicans</i>	17	16	13	15	12	12

- : signifie l'absence de la zone d'inhibition claire autour des disques.

Interprétation des résultats :

Dans le principe de l'antibiogramme solide, un antimicrobien est d'autant plus efficace que son cercle d'inhibition de la croissance microbienne est grand. Les mesures montrent des variations des diamètres de la zone d'inhibition sont estimés selon trois niveaux d'activité des souches utilisées (Mutai et al., 2009) :

- Fortement inhibitrice : $21 \text{ mm} \leq D \leq 29 \text{ mm}$
- Modérément inhibitrice : $16 \text{ mm} \leq D \leq 20 \text{ mm}$
- Légèrement inhibitrice : $10 \text{ mm} \leq D \leq 15 \text{ mm}$

Les résultats montrent que les deux extraits inhibent la croissance de l'ensemble des germes testées et leurs activités antimicrobiennes varient selon la concentration et selon le type de germes testées.

L'activité antibactérienne la plus élevée était à l'encontre des bactéries Gram+ (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) comparativement aux bactéries Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*). La résistance des Gram- est liée à la présence d'une enveloppe qui comprennent une membrane cellulaire riche en lipopolysaccharides et une paroi ce qui limite l'accès des agents antimicrobiens à leurs cibles dans les cellules bactériennes, car les agents antimicrobiens sont en contact avec l'enveloppe cellulaire. Contrairement aux bactéries Gram positif qui sont moins protégées contre les agents externes (détergents et antibiotiques) (Masibo et He, 2009), ou encore, au fait que la propolis contient beaucoup de constituants dérivés des plantes qui sont sécrétés à l'origine pour protéger les plantes contre les bactéries pathogènes



Gram+ la plupart du temps (Tegos et al., 2002). La souche *Staphylococcus aureus* est la plus sensible des germes étudiés vis-à-vis de l'échantillon de Blida avec un diamètre atteint jusqu'à 25 mm, cependant aucune zone d'inhibition n'a été observée dans les boîtes de pétri contenant l'échantillon de Naâma, cela signifie que cette bactérie est résistante contre cet extrait.

Quant à l'activité antifongique, les résultats ont révélé une activité légèrement inhibitrice à l'égard de propolis de Naâma variant de 12 à 15 mm en comparaison avec la propolis de Blida qui a présenté une inhibition modérée allant de 13 jusqu'à 17 mm de diamètre pour la solution mère et 10^{-1} , cependant la concentration de 10^{-2} a donné une activité légèrement inhibitrice.

L'EEP de Blida présente des activités antimicrobiennes légèrement supérieur (inhibition légère a forte pour la solution mère et légère a modéré pour les concentrations 10^{-1} et 10^{-2}) comparativement à celle de Naâma (une activité légèrement inhibitrice pour tous les concentrations) à l'égard des souches testées.

Cette variabilité dans le potentiel antimicrobiens est due à la différence dans la composition chimique des deux extraits : teneurs en composées phénoliques, flavonoïdes, pH (le pH acide renforce l'activité antibactérienne car les bactéries ne peuvent se multiplier dans un milieu acide) ...etc. (Bogdanov et Blumer, 2001).

8. Résultats de formulation de propolis dans le domaine cosmétique et thérapeutique :

a) Fabrication d'un savon naturel :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des savons a donc été réalisée par un antibiogramme en milieu gélosé. Le tableau n°16 regroupe les résultats de l'antibiogramme des quatre savons préparés à base de propolis :

Tableau n° 16 : Mesure des diamètres des zones d'inhibition des savons.

Echantillon	Savon témoin	Savon EEP	Savon Propolis brute	Savon propolis culot
Diamètre (mm)	20	55	20	38

L'étude de l'activité antimicrobienne des savons préparés a révélé que le savon préparé par la propolis brute et celui qui ne contient pas de propolis (témoin) possèdent une activité plus faible (20mm) en comparant avec les autres savons. Ceci explique que



les molécules possédant l'activité antimicrobienne ne sont pas libérées chez le produit brut et qui semble être emprisonnés dans la cire un des composant de la propolis brute. Le meilleur résultat est remarqué chez le savon préparée par l'extrait éthanolique de propolis (55mm) suivit par le savon contenant le culot issu de filtration de propolis (38mm).

Ces résultats suggèrent que l'effet thérapeutique de la propolis est conditionné par le traitement technologique de cette dernière, donc l'extraction des substances bioactifs contenus dans la propolis (polyphénols et flavonoïdes) responsable de pouvoir antimicrobien est assurée seulement par l'étape de macération



Dans le domaine de la recherche biologique, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche de nouveaux traitements à base de plantes et des produits naturel, l'étude de leurs éléments d'efficacité et la compréhension de leur mode d'action.

Au cours des travaux réalisés dans la présente thèse, nous nous sommes focalisés sur la propolis qui constitue la véritable usine chimique dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien-être et la santé de population.

Pour cela, deux échantillons de propolis ont été recueillis à partir de deux wilayas appartenant à deux régions pédoclimatiques différentes, la première est de Blida (Soumaa) et la seconde est de Naâma (Aïn Sefra), dans le but de la réalisation d'une étude phytochimique, en bénéficiant des résultats obtenus dans la valorisation de cette propolis dans le domaine thérapeutique et cosmétique.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la réalisation d'une série d'analyses physiques (taux de perte pendant le séchage, teneur en cendre et la masse volumique) et chimiques (pH et acidité titrable), suivit d'une quantification de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et sucres, ainsi qu'une évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des deux échantillons ont été étudiés. Et enfin, une formulation d'un produit cosmétique à base de la propolis, munis d'une étude microbienne supplémentaire évaluant l'effet thérapeutique de ce dernier.

Les résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques indiquent que les échantillons de propolis étudiés contient un taux de cendres varie entre 2,86 à 3.01 %, une masse volumique de l'ordre de 1.1 et 0.8 g/cm³ et un taux de pertes (humidité + matières volatiles) oscillant entre 3% à 4.5 % à l'équivalent de la matière sèche 97% et 95.5% pour l'échantillon de Blida et de Naâma respectivement. Chimiquement, notre propolis est de nature acide comme toutes les propolis, marquant un pH entre 4.55 et 5.01 avec une acidité titrable allant de 8.4% à 8% pour les régions de Blida et de Naâma respectivement.

L'extraction des composés phénoliques des propolis étudiés permet de déterminé leurs rendements. Nous avons obtenu un rendement élevé de propolis de Blida (38.8%) par contre le plus faible a été obtenu par l'extrait de Naâma (30.9%). L'analyse quantitative représentée par le dosage spectral des composés phénoliques et flavonoïques contenus dans l'extrait éthanolique de propolis révèle que la propolis de Blida est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que celle de Naâma. Tandis les sucres sont présents sous forme des traces dans les deux échantillons.



L'estimation de l'activité antioxydante effectuée par la méthode de DPPH sur les échantillons de propolis et a confirmé les propriétés puissantes des extraits éthanoliques à piéger les radicaux libres. En effet, les résultats obtenus lors de cette étude ont prouvé que la vitamine C présente le pouvoir antioxydant le plus élevé avec un pourcentage de (90,82%), suivi par la propolis de Blida (84,40%), puis la propolis de Naama qui présente le pouvoir antioxydant le plus faible avec un pourcentage de (79,10%) que celle des autres régions.

Les résultats obtenus de l'effet antimicrobien (antibactérien et antifongique) permettent de constater que toutes les souches testées sont sensibles à l'action inhibitrice des propolis analysés, avec des différences de » degrés d'inhibition d'une souche à une autre, ce qui indique un large spectre d'action antibactérienne des propolis. De l'ensemble des résultats microbiologique, les zones d'inhibitions enregistrées prouvent que les propolis étudiées sont de bonne action antimicrobienne, ce qui assure leur qualité thérapeutique.

Les résultats obtenus lors d'études réalisées permettent de prouver l'effet antimicrobien et antioxydant tout en renvoyant cela à la richesse en polyphénols totaux ainsi qu'en flavonoïdes totaux, qui renvoient à leur tour aux patrimoine floral de provenance des deux types de propolis.

Nous conférant ainsi la légitimité de juger et classer nos échantillons de propolis selon efficacité, désignant que l'échantillon du Blida comme le plus riche en principes actifs et le plus efficace antimicrobien des deux échantillons.

Au vu des résultats prometteurs obtenus, et du potentiel du sujet traité, nos principales perspectives sont :

- Identification des principales plantes productrice de propolis
- Etude qualitative plus approfondie pour déterminer la composition chimique
- Envisager une meilleure valorisation industrielle de la propolis en Algérie, dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.
- Analyses in vivo pour détecter les effets thérapeutiques des échantillons

- Aagaard, K. L., (1947). *The Natural Product: Propolis, the Way to Health*; Mentor: Denmark.
- Abdel-Fattah NS, Nada OH., (2007). Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol.* Aug;37(2 Suppl):691-710.
- Agra DR, Evangelista A, Marcucci MC et al., (2006). Physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the extracts propolis of the Paraiba, Brazil. *Cienc Rural* ;36(6):1842-1848.
- Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.; Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T., (2007). Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383–1392.
- Alencar S. M., T. L. C. Oldoni, M. L. Castro, I. S. R. Cabral, C. M. Costa-Neto, J. A. Cury, P.L Rosalen, M. Ikegaki. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2007) 278- 283.
- Allen DM (1958). Drone Brood in Honey Bee Colonies. *Journal of Economic Entomology*. Vol.51, n°1, pp.46 48.
- Amoros, M., Simoes, C.M., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M., (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55, 1732– 1740.
- Andrew J.M. (2009). standardized disc susceptibility testing method (version 8). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64: 454-489.
- Apimondia - standing commission of apitherapy (2001) *Traité d'Apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom]* v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels. 2001 ISBN : 29600270-0-0.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M., (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung.*, 46, 1086-1089.
- Barbarić, M. ; Mišković, K. ; Bojić, M. ; Lončar, M. B. ; Smolčić-Bubalo, A. ; Debeljak, Ž. ; Medić-Šarić, M., (2011). Chemical Composition of the Ethanolic Propolis Extracts and Its Effect on HeLa Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 772–778.

- Bankova, V. Dyalgerov, A., Popov, S. and Marekov, N.L. (1987). A GC/MS study of the propolis phenolic constituents. *Z. f. Naturforschung*, 42:147-151.
- Bankova V., Marcucci MC., Simova S., Nikolova N., Kujumgiev A., Popov S. (1996) Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis *Z. Naturforsch C*. 51(5-6):277-80.
- Belkhiri, B. Bouab, C. (2018). Extraction, dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH de la propolis et pollen de l'est Algérien. P 38-39.
- Bensalah, N. Belhadj, A. (2018). Etude comparative du contenu en polyphénols totaux et de l'activité antimicrobienne de trois extraits de propolis locale. Thèse de master, Université Abdelhamid Ibn Badis, Wilaya de Mostaganem, Algérie.
- Berche, P. Gaillard, J-L. Simonet, M., (1994) *Bactériologie*, Flammarion Médecine. P 123, 124-230, 236- 268-274.
- Biscaia, D.; Ferreira, S. R. S., (2009). Propolis Extracts Obtained by Low Pressure Methods and Supercritical Fluid Extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51, 17–23.
- Blanc M., (2010). Propriétés et usage médical de produits de la ruche. Thèse : Doctorat Pharmacie, Université de Limoges.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot*, 91, 179-194.
- Bogdanov, S., (2016). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*, 6.
- Bogdanov S., Blumer P. (2001). Propriétés antibiotiques naturelles du miel. *Revue Suisse d'apiculture*, 98 (3): 107-114.
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L et al., (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* ;73(1) :53-63.
- Boufadi YM, Soubhye J, Riazi A, et al (2014) Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *Int J Mol Sci* 15:2327–45
- Boukraâ L., Sulaiman SA. (2009) Rediscovering the antibiotics of the hive *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov*. 4(3) :206-13.
- Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset; (1995) "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity "; *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*;28; 2530.

- Burdock, GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36, 347-363.
- Caillas A., (1947) LES PRODUITS DE LA RUCHE. LE MIEL, LA CIRE, LA PROPOLIS. L'auteur, 3e édition.
- Carvalho, A. A.; Finger, D.; Machado, C. S.; Schmidt, E. M.; Costa, P. M. da; Alves, A. P. N. N.; Morais, T. M. F.; Queiroz, M. G. R. de; Quinária, S. P.; Rosa, M. R. da; Santos, J. M. T. dos; Pessoa, C.; Moraes, M. O. de; Costa-Lotufo, L. V.; Sawaya, A. C. H. F.; Eberlin, M. N.; Torres, Y. R., (2011). In Vivo Antitumoural Activity and Composition of an Oil Extract of Brazilian Propolis. *Food Chemistry*, 126, 1239– 1245.
- Castaldo, S., Capasso, F., (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 (1), 1-6.
- Chauvin, R., (1968). *Traité de biologie de l'abeille* ; Masson.
- Chen CN., Hsiao CJ., Lee SS., Guh JH., Chiang PC., Huang CC. Huang WJ. (2011) Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis *Nat. Prod. Res.* Jul 27 Epub ahead of print.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M., (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lwt-Food Science and Technology* 39, 756-761.
- Clément H., (2011). *Le traité rustica de l'apiculture*. Editions Rustica (528p.).
- Collins AM et Pettis JS (2013). Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie*. Vol.44, n°3, pp.351–356
- Crane, E., (1999). *History of other products from bees the world history of beekeeping and honey hunting*, Gerald Duckworth & Co Ltd, London, pp. 545-553.
- Debuyser, E. (1984). *La propolis*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante, Faculté de pharmacie.
- De Castro SL, Higashi KO., (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol.*;46(1):55-8.
- De Kievit, T. R., M. D. Parkins, R. J. Gillis, R. Srikumar, H. Ceri, K. Poole, B. H. Iglewski, et D. G. Storey, (2001), Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1761-1770.
- Delorme J., Robert A. (1997). *Mycologie médicale*. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique. Mont-Royal Québec, p. 184.

- Domerego R., Imbert G., Blanchard C. (2009) Les remèdes de la ruche Editions Alpens, Monaco, 95p.
- Donadiou, Y. (1981). les produit de la ruche. 3ième Edition.
- Donadiou, Y. (2008) Naturellement vôtre avec ... La propolis ; Naturellement vôtre avec... ; Dangles. ; France, 2008.
- El housseini, N. (2013). Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. Thèse de Doctorat, université de Nantes, France.
- Evangelist-Rodrigues, A., Carneiro of Cunha. M (2001). Analise comparative da qualidade da propolis colectado atraves de calços de madeira etela plastica na regiaô do byo paraeibano. Mensagem Doce 63 (bis).
- Farseni 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 and Molecular Research 8(2):635-640
- Fearnley, J., (2001). Bee propolis: natural healing from the hive. Souvenir Press London, pp. 172.
- Fekete T., (2009). Bacillus species (not anthracis). Clinical Microbiology Newsletter. ;31(12) :87- 92.
- Ferhoum F (2010) Analyses physico chimiques de la propolis local selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeilles locales (Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis). Thèse de Magister, Université M'Hamed Bouggara, Wilaya de Boumerdes, Algérie.
- Fidel, P. L.; Vazquez, J. A; Sobel, J. D. (1999). Candida Glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison t C. Albicans. Clinical Microbiology Reviews, 12, 80– 96.
- Flandrois J.P. (1997). Bactériologie médicale, p.301.
- Gabrys, J. (1986). Free amino acids in bee hive products (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. Pharmac. Research Communications 18 (6) : 513518.
- Genya Gekker.; Shuxian Hua.; Marla Spivak.; James R.; Lokensgard.; Phillip K. Peterson. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. Journal of Ethnopharmacology 102 (2005) 158–163.
- Gharbi, M. (2011). Les produits de la ruche : origines – fonction naturelle – composition – propriété thérapeutiques.

- Ghedia K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (2005) Numéro 4 : 162-169.
- Ghisalberti, E. L (1979). Propolis a review. *Bee World* 60, 59-84.
- Golder, W., (2004). Propolis. The bee glue as presented by the graeco roman literature. *Wurzburger Medizinhistorische Mitteilungen journal*, 23, 133-145.
- Gómez-Caravaca, A. M. ; Gómez-Romero, M. ; Arráez-Román, D. ; Segura Carretero, A. ; Fernández Gutiérrez, A., (2006). Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived from Bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220–1234.
- Goodon.B, (1997). Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales. Tec. et Doc. P 346, 347-353,354.
- Harrison JM (1987). Roles of individual honeybee workers and drones in colonial thermogenesis. *Journal of Experimental Biology*. Vol.129, n°1, pp.53 61.
- Hatjina F, Bieńkowska M, Charistos L, Chlebo R, Costa C, Dražić MM, Filipi J, Gregorc A, Ivanova EN et Kezić N (2014). A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*. Vol.53, n°3, pp.337–363
- Hegazi, A. G (1997). Propolis an overview. *International Symposium on Apitherapy Cairo 8 and 9th Egypt*.
- Hrassnigg N et Crailsheim K (2005). Differences in drone and worker physiology in honeybees. *Apidologie*. Vol.36, n°2, pp.255 277.
- Iabadene H., Messai Y., Alouache S., Arlet G. et Bakour, R. (2010). Mécanismes de résistance aux β - lactamines et aux quinolones d'Enterobacter dans les hôpitaux d'Alger. *Revue Tunisienne d'Infectiologie* ;4 (1): 24.
- Irish J., Carter D.A., Shokohi T., Blair S. E. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, 44 (3): 289-291.
- Jean-Prost P. et Le Conte (2005) *Apiculture. Connaître l'abeille, conduire le rucher* 7ème édition, Tec & Doc Lavoisier.
- Jean Y. H. Lee, Ian R. Monk, Anders Gonçalves da Silva, Torsten Seemann, Kyra Y. L. Chua, Angela Kearns, Robert Hill, Neil Woodford, Mette D. Bartels, Birgit Strommenger, Frederic Laurent, Magali Dodémont, Ariane Deplano, Robin Patel, Anders R. Larsen, Tony M. Korman, Timothy P. Stinear et Benjamin P. Howden,

(2018). Global spread of three multidrug-resistant lineages of *Staphylococcus epidermidis*, *Nature Microbiology*.

- Khayyal MT, El-Ghazaly MA et El-Khatib as., (1993). Mechanisms involved in the anti-inflammatory response of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* ;19(5):197-203.
- Kim MJ et al. (2011) Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean J. *Microbiol.* 49(1):161-164
- Koo H, Vacca Smith AM, Bowen WH et all., (2000). Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferase in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res* ;34(5):418-426.
- Krell. R, (1996). Value - edded products from beekeeping. Food and agriculture organization of the United Nations Rone. Chapitre 5.
- Kumazawa S, Hamasaka T et Nakayama T., (2004). Antioxydant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*; 84:329-339.
- Lakhal E., Hammami S., Kammoun A., Ghozzi R., Saidani M., Miled D., Boutiba-Ben Boubaker I. et Slim A. (2010). Suivi des *Enterobacter cloacae* producteurs de β -lactamases à spectre étendu à l'hôpital Charles Nicolle de Tunis (2000- 2009). *Revue Tunisienne d'Infectiologie* ;4 (1): 23-24.
- Lambrechts, C., Karoubi, L., Maire, P., Houssemaine-Florent, H.& Collectif. (2006). *Le Petit Larousse illustré: En couleurs Version reliée.* (Larousse, 2006).
- Lavie, P (1975). *La propolis.* Edition : Apimondia. Bucharest.
- Leandro M., Luis G., Diase, José Alberto Pereira, Leticia Estevinho, (2008). Antioxydant properties, total phenol and pollen anlysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology* 46 (2008) 3482 – 3485.
- Lejeune. B. ; Pourrat, A. et Dehmouche. H. (1988). Propolis utilisation en dérmocosmetologie. *Parfums, Cosmétiques, Aromes*: 73-77.
- Li, H., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y., (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102, 771-776.
- Lucrecia L. Chaillou.; Monica A. Nazareno. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology* 42, 1422–1427.
- Macheix J. J.; Fleuriet A.; Billot J. (1990). *Fruit phenolics-boca rato*, USA: CRC Press.

- Martin RS, Pereira ES, Lima SM, Senna MI, Mesquita RA, Santos VR., (2002). Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-Seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci.* Mar;44(1):41-8.
- Masibo, M and He, Q. (2009). In vitro antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2): 73-80.
- Maurizio A (1953). Weitere Untersuchungen an Pollenhörschen: Beitrag zur Erfassung der Pollentrachtverhältnisse in verschiedenen Gegenden der Schweiz. HR Sauerländer.
- Metzner, J., Schneidewind, E. M (1997). Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazi* 33 (7). German.
- Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G.; Kadota, S., (2001). Liquid Chromatography–mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis*, 12, 366–373.
- Miguel, M. G. ; Nunes, S. ; Dandlen, S. A. ; Cavaco, A. M. ; Antunes, M. D., (2010). Phenols and Antioxidant Activity of Hydro-Alcoholic Extracts of Propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3418–3423.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakarini. *Journal of science technology*, 26 (2) : 211219.
- Moore PA, Wilson ME et Skinner JA (2015). Honey Bee Queens: Evaluating the Most Important Colony Member.
- Moszer I., Jones L.M., Moreira S., Fabry C., Danchin A. (2002). SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Res.*, 30: 62-65.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th edn. Approved Standard M7-A5. Wayne, PA: NCCLS.
- Orsatti, C. L. ; Missima, F. ; Pagliarone, A. C. ; Sforcin, J. M., (2010). Th1/Th2 Cytokines' Expression and Production by Propolis-Treated Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 314–318.
- Orsi, R. O.; Funari, S. R. C.; Soares, A. M. V. C.; Calvi, S. A.; Oliveira, S. L.; Sforcin, J. M.; Bankova, V., (2000). Immunomodulatory Action of Propolis on Macrophage Activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6, 205–219.

- Orsolich, N., (2010). A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct and ApiMedicalScience*, 2 (2), 1-20.
- Page RE et Peng CYS (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*. Vol.36, n°4, pp.695–711.
- Papay, V. (1987). Chemical and pharmacological study of propolis from various locations. *Acta Pharmac. Hung.*, 57:143-151.
- Park, J. H.; Lee, J. K.; Kim, H. S.; Chung, S. T.; Eom, J. H.; Kim, K. A.; Chung, S. J.; Paik, S. Y.; Oh, H. Y. (2004) Immunomodulatory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Balb/c Mice. *International Immunopharmacology*, 4, 429–436.
- Peacock P. (2008) *Keeping bees, a complete practical guide* Edition Gaia Book, a division of Octopus Publishing group, 148p.
- Pendleton, J. N.; Gorman, S. P.; Gilmore, B. F., (2013). Clinical Relevance of the ESKAPE Pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11, 297–308.
- Popova, M. ; Silici, S. ; Kaftanoglu, O. ; Bankova, V., (2005). Antibacterial Activity of Turkish Propolis and Its Qualitative and Quantitative Chemical Composition. *Phytomedicine*, 12, 221–228.
- Popovici, C. ; Saykova, I. ; Tylkowski, B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25–39.
- Raghukumar, R.; Vali, L.; Watson, D.; Fearnley, J.; Seidel, V., (2010). Antimethicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Activity of “Pacific Propolis” and Isolated Prenylflavanones. *Phytotherapy Research*, 24, 1181–1187.
- Ramanauskienė K., Inkėniene AM. (2011) Propolis oil extract: quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity *Nat. Prod. Res.* Jun 30.
- Ransome, H.M., (1937). *The sacred bee in ancient times and folklore*. George Allen and Unwin, London, pp. 308.
- Rebiai, A., Lanez, T., Belfar, M.L., (2013). Total polyphenol contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of Algerian propolis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 6 (1), 975-1491.
- Ribéreau-Gayon, P., (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris, pp.254.

- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P., (1972). Sciences et techniques du vin. Tome1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, pp.671.
- Rossi A, Ligresti A, Longo R et coll., (2002). The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*; 9(6):530-535.
- Sawaya, A. C. H. F.; Palma, A. M.; Caetano, F. M.; Marcucci, M. C.; Da Silva Cunha, I. B.; Araujo, C. E. P.; Shimizu, M. T., (2002). Comparative Study of in Vitro Methods Used to Analyse the Activity of Propolis Extracts with Different Compositions against Species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 203–207.
- Senne A. (2010) Propolis Le trésor millénaire de santé et de beauté Edition du Paléon 5ème édition, Saint-Evarvec, 125p.
- Sforcin, J. M. (2007). Propolis and the Immune System: A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1–14.
- Sforcin, J. M.; Bankova, V, (2011). Propolis: Is There a Potential for the Development of New Drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.
- Shi X., Dala N.S; (1991). Antioxydant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radical. *Food and Chemical toxicology* 29, 1 – 6.
- Shiva.Mohammadzadeh, Mohammad Shariatpanahi.; Manoochehr Hamdi.; Reza Ahmadvkhniha.; Nasrin Samadi.; Seyed Nasser Ostad. (2006). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*.
- Struve C., Stahlhut S G., Krogfelt K A et Reisner A. (2012). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 p350–359.
- Szliszka, E.; Zydowicz, G.; Janoszka, B.; Dobosz, C.; Kowalczyk-Ziomek, G.; Krol, W. (2011). Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis Sensitizes Prostate Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis. *International Journal of Oncology*, 38, 941–953.
- Takemura T. et al. (2011) 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2012, Article ID 946867, 7 p.
- Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR et Delaney DA (2011). Experimentally induced variation in the physical reproductive potential and mating success in honey bee queens. *Insectes sociaux*. Vol.58, n°4, pp.569–574.

- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chem.*, 46: 3133-3141.
- Tosi, Enzo A.; Ciappini, Maria C., Cazzolli, Ampelio F., Tapiz, Luis M., (2006). Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *APIACTA* 41 PAGE 110-120.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. 10.1186/1752-153X-1-13.
- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblan, S., Singh, M., Maiese, W. M., Timmerman, B. N, (1999). Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z. Naturforsch* 54c, 406-416.
- Watanabe, M. A. E. ; Amarante, M. K. ; Conti, B. J. ; Sforcin, J. M, (2011). Cytotoxic Constituents of Propolis Inducing Anticancer Effects: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1378–1386.
- Yang H., Dong Y., Du H., Shi H., Peng Y., Li X., (2011). Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China *Molecules*. 16(4):3444-3455
- http://www.biolineaires.com/les_savons__pourquoi_et_comment/
- www.microbiologie-medicale.fr

Annexe I : Matériel technique et réactifs.

Appareillage	Verreries et accessoires	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> - Balance analytique de précision - Balance électrique - Bain marie thermostaté - Bec bunsen - Dessiccateur - Etuve - Four à moufle - PH mètre - Plaque chauffante - Plaque agitatrice - Mortier - Rota vapeur - Spectrophotomètre UV-visible - Thermomètre 	<ul style="list-style-type: none"> - Ballons - Barreau magnétique - Becher - Boites pétri - Capsules en porcelaine - Capsules en verre - Ecouvillons - Embouts - Entonnoirs - Éprouvettes graduées - Erlenmeyer - Fioles - Flacons - Micropipette - Papier aluminium - Papier wattman - Pince - Pipettes graduées - Pipettes Pasteur - Porte tubes - Réfrigérants à reflux - Spatule - Tubes à essais stériles 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide gallique - Alcool éthylique 70% - Acide sulfurique - Carbonate de sodium (10%) - Eau distillée stérile - Eau physiologique - Glucose - Hydroxyde de sodium - Méthanol - Phénol - Phénolphtaléine - Quercétine - Réactif Folin-Ciocalteu - Saccharose - Trichlorure d'aluminium (2%)

Annexe II : Préparation des solutions et réactifs.

Solution Acide gallique : 200 mg de l'acide gallique + 100 ml d'eau distillée.

Solution Folin-Ciocalteu (0,1N) : 1ml de réactif de folin + 10 ml d'eau distillé.

Solution carbonate de sodium (10%) : 10 g de carbonate de sodium + 100 ml d'eau distillée

Solution DPPH : 4 mg de DPPH + 100 ml de méthanol.

Solution hydroxyde de sodium (0.1N) : 1g d'hydroxyde de sodium + 250 ml d'eau distillée.

Solution de quercétine 4 mg de la quercétine + 10 ml de méthanol.

Solution de chlorure d'aluminium (2%) : 2 g de chlorure d'aluminium + 100 ml de méthanol.

Solution NaCl (0,9%) : 0,9 g de du chlorure de sodium + 100 ml d'eau distillée.

Solution phénol : 50 g de phénol + 1000 ml d'eau distillée.

Annexe III : Composition, d'un litre, des milieux de cultures utilisés.

Bouillon Nutritive : un milieu liquide utilisé davantage que le milieu gélosé, lors de l'examen d'échantillons liquides ou lors de cultures d'enrichissement.

Peptone10 g
Extrait de viande5 g
Chlorure de sodium5 g
Ph=7,2

Gélose Mueller Hinton : un milieu relativement riche, mais qui reste un milieu de base permettant ainsi la lecture de l'antibiogramme.

Extrait de viande2 g
Infusion de viande de bœuf300ml
Peptone de caséine17,5 g
Amidon de maïs1,5 g
Agar17 g
Ph=7,4

Gélose Nutritive : un milieu de base qui permet de cultiver des bactéries non-exigeantes.

Peptone5 g
Extrait de viande1 g
Extrait de levure2 g
Chlorure de sodium5 g
Agar15 g
Ph= 7.

Gélose Sabouraud : un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

Peptone.....10g
Glucose.....20 g
Agar.....15g
Ph= 6

Annexe IV : Données générales sur les bactéries testées.

***Staphylococcus aureus* :**

Sont des Cocci à gram positif à coagulase +, forme sphérique, de 0.8 à 1µm de diamètre, regroupés en diplocoques ou en petite amas(grappe).

Ils sont aéro-anaérobies, immobiles, asporulés, souvent acapsulés donnant facilement sur gélose ordinaire après 24h des colonies convexes, lisses de 1 à 4 mm.

Capable de produire de nombreux toxines et enzymes extracellulaires ce qui explique que ces bactéries sont responsables d'un grand nombre d'infections chez l'homme et l'animal (**Berche et al, 1994**).

***Staphylococcus epidermidis* :**

Bactérie a coagulase -, de forme sphérique, immobile, gram positif, anaérobies facultatifs. Elle se retrouve fréquemment sur la peau et les muqueuses des humains et des animaux. De ce fait, c'est une source majeure de contamination des échantillons dans les laboratoires d'analyse grâce à leur capacité de produire des biofilms qui leur permettent d'adhérer aux surfaces des prothèses médicales par exemple (**Jean et al, 2018**).

***Pseudomonas aeruginosa* :**

P. aeruginosa est un bacille à gram négatif, fin, de 1.5 à 3µm de long et de 0.5 à 0.8 µm de large, très mobile à ciliature polaire, aérobie strict, oxydase +. Il est peu exigeant et donne après 24h, sur gélose standard, des colonies de 1 à 3 mm, à bord régulier.

Responsable d'infections post-chirurgicales ou d'infections nosocomiales au niveau hospitalier (**Berche et al, 1994**).

***Klebsiella pneumoniae* :**

Sont des bacilles gram négatif, présents dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires, toujours immobiles et très souvent encapsulés qui donne un aspect muqueux assez typique.

Après 24h d'incubation à 37°C sur milieu simple ou sélectif on obtient des colonies de 3-4 mm, rondes, muqueuses, bombées et translucides (**Berche et al, 1994 ; Flandrois, 1997**).

***Bacillus subtilis* :**

Sont des bacilles à Gram positif, mobile, capsulé, ne sont pas considérés comme pathogènes pour l'Homme mais peuvent contaminer les aliments et provoquer des intoxications (**Moszer et al., 2002**).

***Enterobacter cloacae* :**

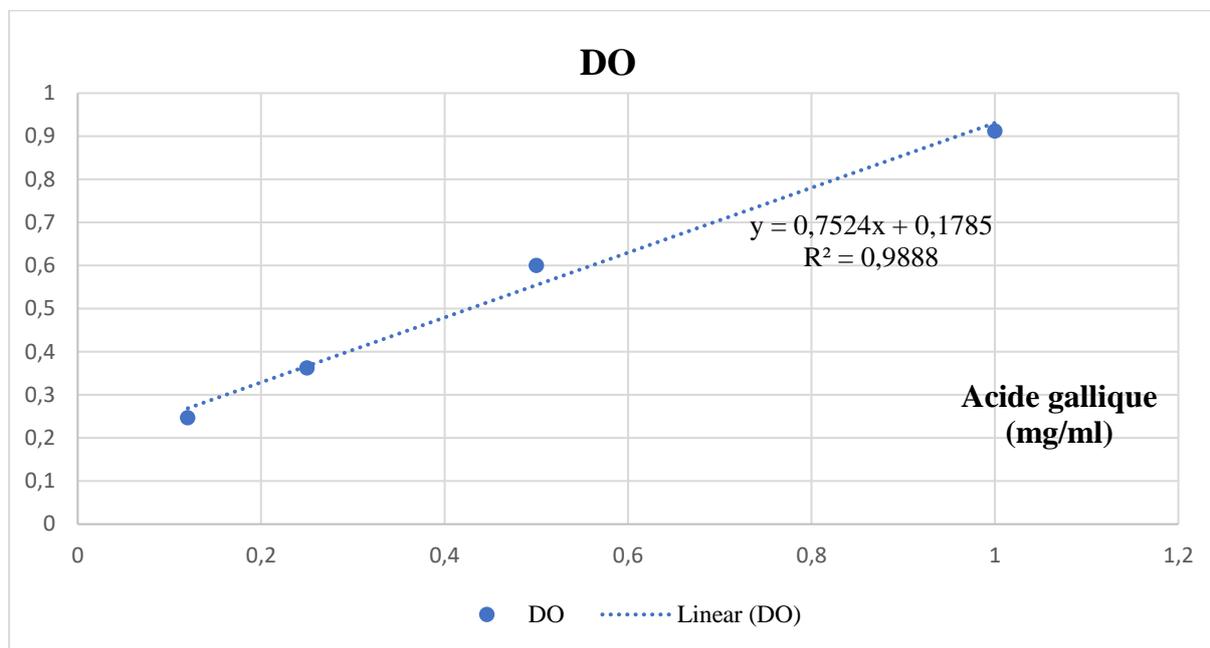
Bacilles à gram négatif, mobiles, non capsulés (**Berche et al, 1994**). C'est une bactérie pathogène opportuniste responsable en milieu hospitalier d'infections urinaires, infections pulmonaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses (**Lakhal et al, 2010**).

***Candida albicans* :**

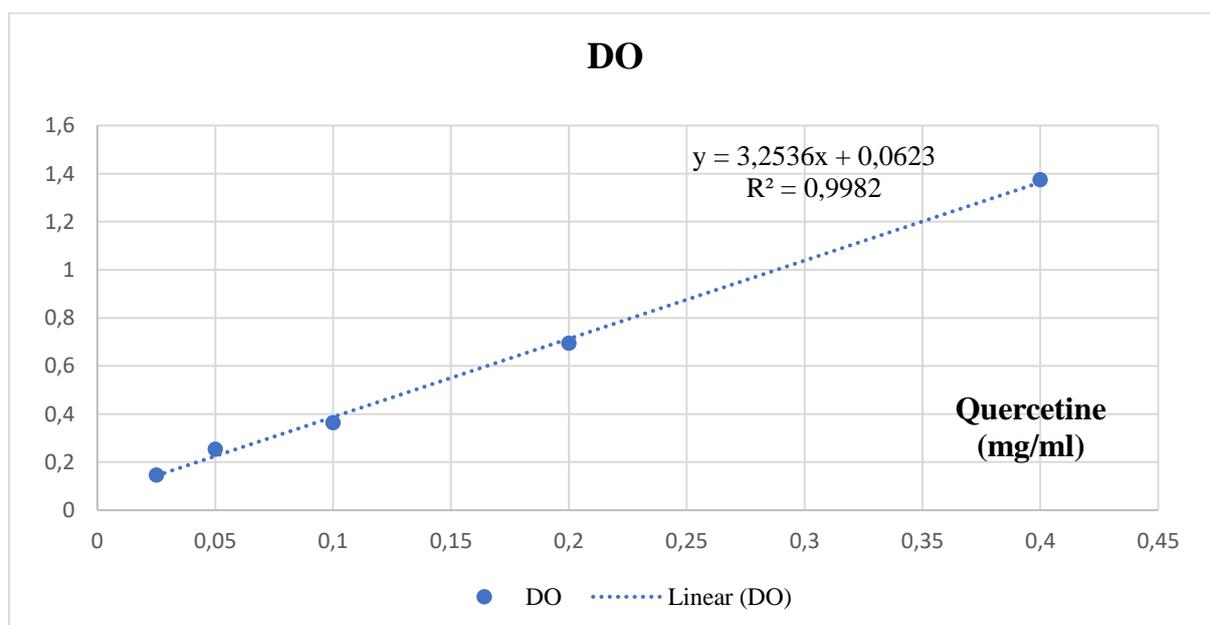
Sont des levures qui provoquent des infections fongiques (candidoses) essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques (**Delorme et Robert, 1997 ; Irish et al, 2006**).

Souches microbiennes	Type de paroi	Maladies causales	Sensibilité aux antibiotique	Références	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	- Intoxications alimentaires - Infections localisées suppurées	- Vancomycine - Métricilline - Béta-lactamines	(Pendleton et al., 2013)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		- Infections cutanées - Infections nasales - Infections urinaires	- Pénicilline - Métricilline	(Pendleton et al., 2013)	
<i>Bacillus subtilis</i>		- Intoxication alimentaire	- Vancomycine - Clindamycine - Fluoroquinolones - Aminosides - Carbapénèmes	(Fekete, 2009)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Gram -	- Infection de l'œil, de la peau, des urines, gastro-intestinales et des poumons	- Ticarcilline - Gentamicine - Ciprofloxacine - Pipéracilline	(De Kievit et al., 2001)
<i>Enterobacter cloacae</i>			- Infections pulmonaires, cutanées, urinaires et ophtalmiques	- β- lactamases - Céphalosporinases plasmidique - Aminosides - Fluoroquinolones	(Iabadene et al., 2010)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			- Infections urinaires - Infections pulmonaires - Infections intestinales	- Amoxicilline - Ticarcilline - Pipéracilline	(Struve et al., 2012)
<i>Candida albicans</i>	Champignon	----- - Infections, ou candidoses, au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques.	- Echinocandines - Morpholines - Fluorocytosine	(Fidel et al., 1999)	

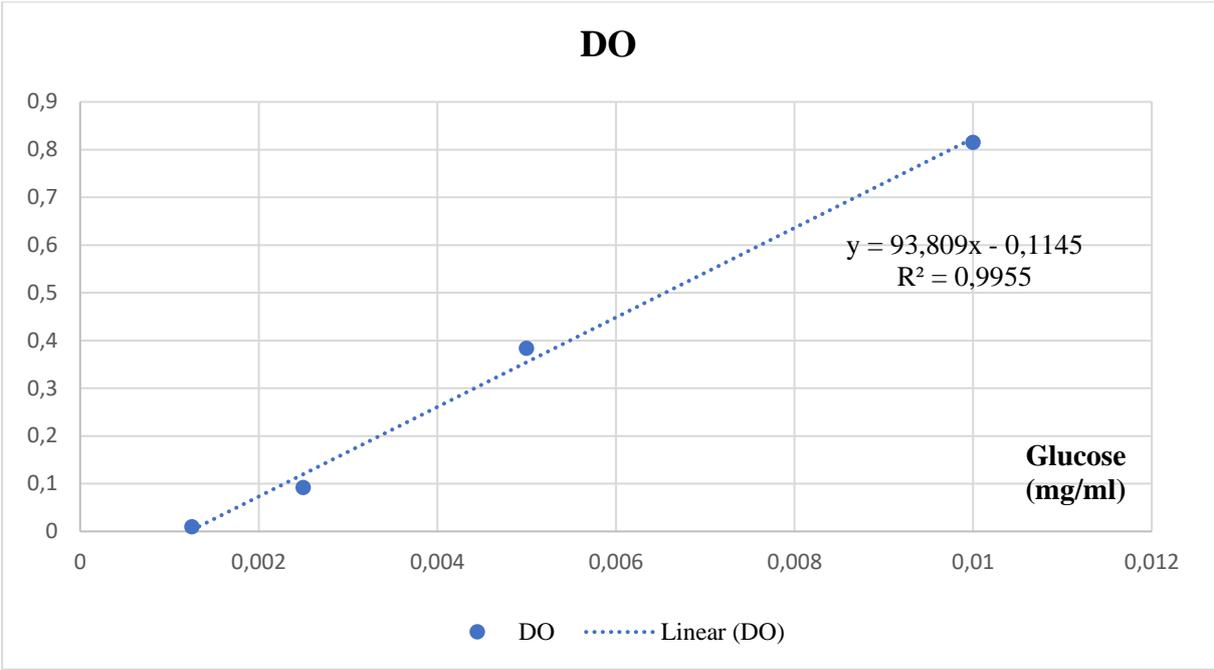
Annexe V : Les courbes d'étalonnage utilisées pour les dosages des polyphénols totaux, les flavonoïdes et les sucres.



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

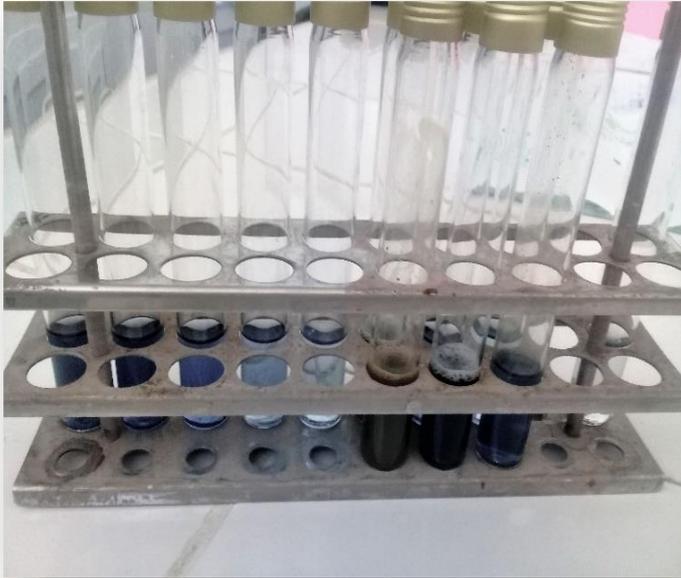


Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.



Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage de sucres totaux.

Annexe VI : Photographies des expériences réalisées au cours du travail



Dosage des polyphénols totaux



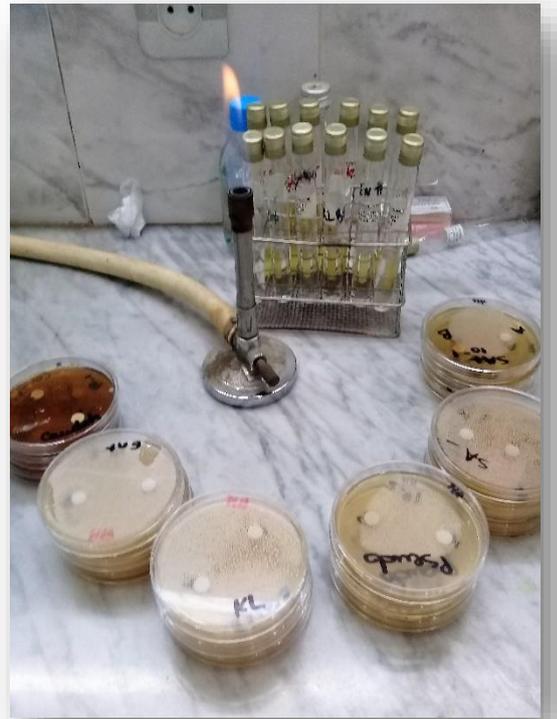
Dosage des flavonoïdes totaux



Activité antioxydante



Dosage des sucres totaux



Activité antimicrobienne

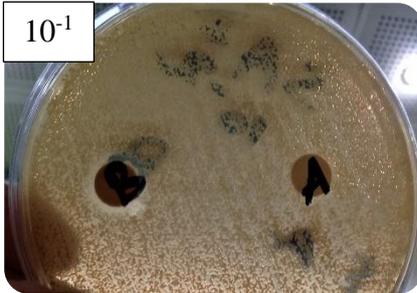
Annexe VII : Photographies des diamètres des zones d'inhibition de EEP de Blida et Naâma vis-à-vis à différentes concentrations des germes testés.

Staphylococcus aureus

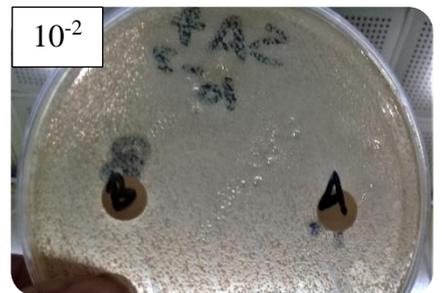
Solution mère



10^{-1}



10^{-2}

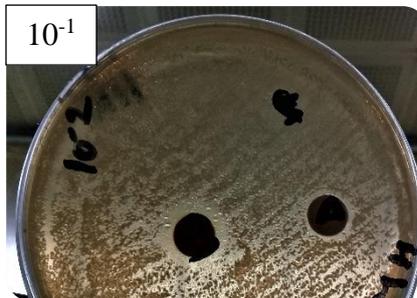


Staphylococcus epidermidis

Solution mère



10^{-1}

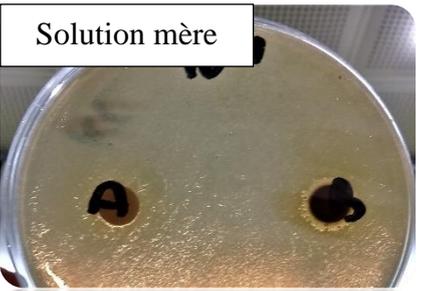


10^{-2}



Klebsiella pneumoniae

Solution mère



10^{-1}

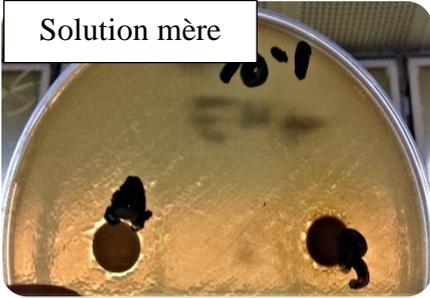


10^{-2}

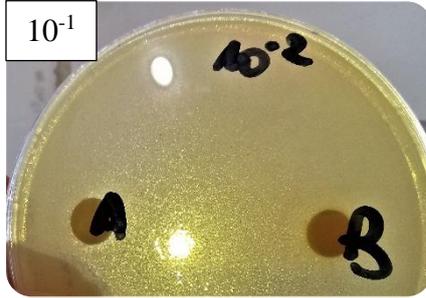


Enterobacter cloacae

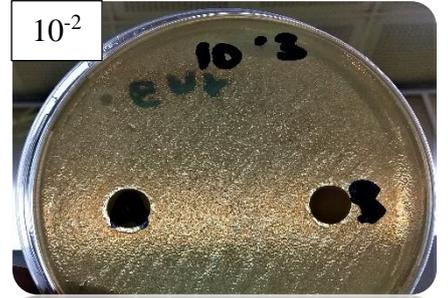
Solution mère



10^{-1}

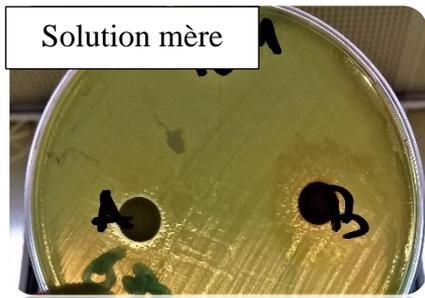


10^{-2}

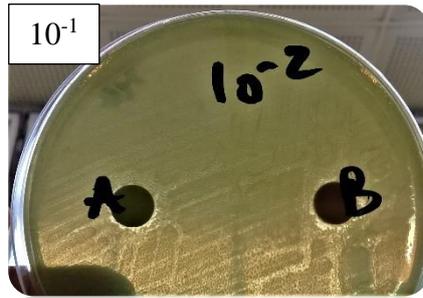


Pseudomonas aeruginosa

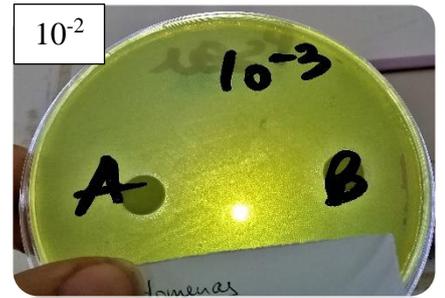
Solution mère



10^{-1}



10^{-2}



Bacillus subtilis

Solution mère



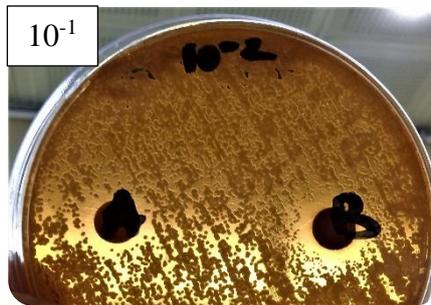
10^{-1}



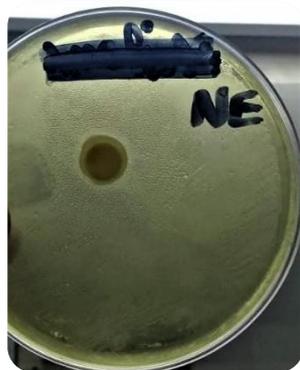
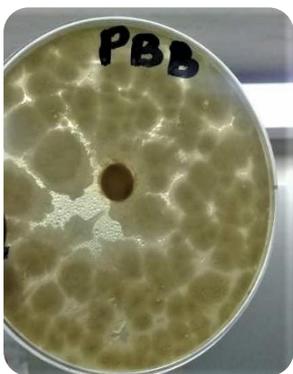
10^{-2}



Candida albicans



Annexe VIII : Photographies des diamètres des zones d'inhibition des savons préparée vis-à-vis des germes testés.



Savon a
propolis brute
broyé

Savon neutre

Savon à
l'extrait
éthanolique de
propolis

Savon au culot
de filtration de
propolis

Annexe IX : Photographies des savons formulés à base de propolis



Savon témoin



Savon propolis brute



Savon EEP



Savon propolis culot

