

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. M. OULHADJ - Bouira
Faculté des Sciences et des Sciences Appliquées
Département de Génie des Procédés



Mémoire

Présenté par

ABCHICHE HAMIDA
GHEMAM ZOHRA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière: GENIE DES PROCEDES
Spécialité : GENIE PHARMACEUTIQUE

**Etude biologique d'extrait éthanolique de la
propolis de la wilaya de "Bouira"**

Soutenu le 22 / 06 / 2016

Devant le jury composé de :

Mme A. CHETOUANI	Maitre Conférence B	UAMO, Bouira	Présidente
Mme M. AZI	Maitre Assistante B	UAMO, Bouira	Examinatrice
Mme E. SOLTANI	Maitre Assistante B	UAMO, Bouira	Promotrice

قَالَ تَعَالَى: أَعُوذُ بِاللَّهِ مِنَ الشَّيْطَانِ الرَّجِيمِ

﴿ وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّعْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ يَتُوكًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ ﴿٦٨﴾

ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ

مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿٦٩﴾ وَاللَّهُ خَلَقَكُمْ

ثُمَّ يَنُوفِقْكُمْ وَيُمِيتُكُمْ مِّنْ بَرْدٍ إِلَىٰ أَذْدِلَ الْعُمْرِ لِكَيْ لَا يَعْلَمَ بَعْدَ عِلْمٍ شَيْئًا إِنَّ اللَّهَ عَلِيمٌ

قَدِيرٌ ﴿٧٠﴾ ﴿ النحل: ٦٨ - ٧٠



Remerciement

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le Miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimerons nos profonds remerciements et nos vives connaissances à Mme Soltani, Maître assistant B, Université de Bouira, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé pour réaliser ce travail.

Nous remercions également Madame Zaim K., Veuillez trouver ici l'expression de nos gratitude pour nos avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Soyez assuré de nos profonds respects et de nos vives reconnaissances pour avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles.

Nous adressons nos sincères remerciements à Dr Chetouani. A, Maître de conférence B à l'Université de Bouira d'avoir accepté de présider le jury.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme Azi, M, Maître Assistante B à l'Université de Bouira pour sa précieuse aide et ses conseils, et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Nous tenons à exprimer également nos profonde reconnaissance aux ingénieurs de Laboratoire de génie des procédés de L'université de Bouira et les laboratoires de recherche de biochimie appliquée et d'électrochimie de l'université FREHAT ABBAS Sétif - 1- qui ont mis à nous disposition les conditions nécessaires pour la réalisation de ce travail pour ses précieux conseils tout au long de la période de recherche.

Nous adressons aussi nos sincères remerciements à l'ensemble des enseignants de l'université de Bouira qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions beaucoup l'apiculteur de village de Beni Hamad qui nous a fourni la propolis.

Nous remercions chaleureusement tous ceux qui ont participé de près ou de loin de façon directe ou indirecte, à la réussite de ce travail. A toutes et à tous un grand merci et une infinie reconnaissance.

Hamida et Zohra

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à ma chère grand-mère Fatima,
qui m'a toujours encouragé et conseillé. Que Dieu
lui accorde une longue vie et parfaite santé.
Ainsi qu'à la lumière de ma vie, mes parents, pour leurs
amour, leurs encouragements et leurs sacrifices
durant toutes mes années d'études.*

Merci maman, Merci papa

À mes très chères sœurs adorées : Samia et Chafia

À mes frères : Saïd et Zoubir que dieu les protège.

À mon oncle et sa famille son exception

À mes amis (es) sans exception

*À la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon
binôme d'étude Ghemam Zahra*

Hamida

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A celui qui a été toujours la source de l'honneur, du courage

et celui qui a fait de moi femme. . . . Merci papa.

A celle qui m'a inculqué le goût de la vie et le sens de la responsabilitéMerci maman.

Avec toute ma fidélité et tout mon amour pour vous, mes

parents, je ne pourrai jamais égaler votre mérite.

Qu'Allah vous garde et vous protège.

A mes frères : Said, Laid, Amirouche, Ahmed et Amar

et mes sœurs : Djamilâ, Noura et Nadia

*Pour leur soutien moral, leur complicité, leur présence
à tout moment à mes cotés, et de m'avoir fait confiance.*

A toute ma famille grande et petite.

A mes meilleurs amis chacun à son nom.

A la fin je dédie très chaleureusement ce mémoire à mon

binôme d'étude Abchiche Hamida.

Zohra

Liste des abréviations

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens;

AlCl₃: Trichlorure d'Aluminium ;

AZT :Azidothymidine;

BHT : Butyle Hydroxy Toluène ;

CAPE : Ester Phénylethylique de l'Acide Caféique ;

°C : Degré Celsius ;

cm² : Centimètre au carre ;

Cte : Constante ;

DMF : Diméthylformamide

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ;

E : Potentiel ;

EAG : Equivalent d'Acide Gallique ;

ECS : Electrode ou Calomel Saturé ;

EEP : Extrait Ethanolique de la Propolis ;

EQ : Equivalent de Quercétine ;

EtOH : Ethanol ;

FC : Folin- Ciocalteu ;

FRAP : Essai de la Réduction du Fer du Plasma;

g : Gramme ;

h : Heure ;

HAT : Transfert d'Hydrogène Atomique ;

HE : Huile Essentielle ;

H₂O : Eau;

IC₅₀ : La concentration minimale de l'extrait (antioxydant) qui inhibe 50% du radical libre;

JC : Jésus-Christ ;

l : Litre ;

m : Molarité ;

min : Minute ;

mg : Milligramme ;

ml : Millilitre ;

mV/s : Millivolt par seconde ;

nm : Nanometer ;

Na₂CO₃ : Carbonate de Sodium;

NaCl : Chlorure de Sodium;

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate;

O₂ : Oxygène ;

ORAC : Le dosage de l'Oxygène de la Capacité d'Absorption des Radicaux ;

PVC : Poly Vinyl Chlorure ;

R² : Coefficient de corrélation ;

SET : Transfert d'un Electron ;

TRAP : Le dosage des Paramètres Radicaux Piégeage Antioxydante Totale ;

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity;

UV-Vis : Ultraviolet/Visible ;

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine ;

% : Pourcentage ;

µl : Microlitre ;

µg : Microgramme.

Liste des figures

Partie bibliographie

Figure I-1 : Propolis brute provenant de la montagne Algérienne	04
Figure I-2 : Récolte de la propolis	06
Figure I-3 : Butineuses de la propolis dans la ruche	06
Figure I-4 : Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche	09
Figure I-5 : La récolte de la propolis avec un filet en plastique placé sur le dessus de la ruche	09
Figure II-1 : Composition générale moyenne de la propolis	14
Figure II-2 : Structure de base des flavonoïdes	16

Partie expérimentale

Figure III-1-1 : La propolis de Bouira (Beni Hamad)	26
Figure III-1-2 : Méthode d'extraction de la propolis	27
Figure III-1-3 : Le spectrophotomètre	29
Figure III-1-4 : Le principe de spectrophotomètre	29
Figure III-1-5 : Réduction du radical DPPH	34
Figure III-1-6 : Montage de teste électrochimique	37
Figure III-1-7 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat	37
Figure III-1-8 : Dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé	40
Figure III-2-1 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique	43
Figure III-2-2 : Droite d'étalonnage de la quercétine	44

Figure III-2-3 : La quantité des polyphénols et des flavonoides dans un mg d'EEP	45
Figure III-2-4 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait	48
Figure III-2-5 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT	49
Figure III-2-6 : Voltampérogrammes linéaire de l'extrait éthanolique de la propolis à 60mg/ml	51

Sommaire

Sommaire

Introduction Générale	01
-----------------------	----

Partie bibliographique

Chapitre I: Généralités sur la propolis

I-1- Définition de la propolis	03
I-2- Etymologie de la propolis	04
I-3- Histoire de la propolis	05
I-4- Récolte de la propolis	05
I-4-1- Récolte de la propolis par les abeilles	05
I-4-1-1- Les conditions de récoltes	07
• L'âge de l'abeille	07
• La race	07
• La saison	07
• Le climat	07
• La géographie	07
I-4-1-2- La quantité de la propolis	07
I-4-2- Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche	08
I-5- La qualité de la propolis	10
I-6- Utilisation de la propolis	10
I-6-1- Utilisation de la propolis par l'abeille	10
I-6-2- Utilisation de la propolis par l'homme	11
I-6-2-1- Cosmétique	11
I-6-2-2- Médecine	11
I-6-2-3- Technologie alimentaire	12

Chapitre II : Composition et propriétés de la propolis

II-1-la composition de la propolis	13
II-1-1- Les polyphénols	14
II-1-2- Les flavonoides	15
II-2- Les propriétés physico-chimiques	16
II-3- Propriétés pharmacologique	17
II-3-1- Propriétés antibactérienne	17

II-3-2- Propriétés antifongique	17
II-3-3- Propriétés antioxydante	19
II-3-4- Propriétés anticancéreuse	20
II-3-5- Propriétés anti-inflammatoire	21
II-3-6- Propriétés antivirale	22
II-3-7- Propriétés cicatrisante	22
II-3-8- Propriétés anti-infectieuse	23
II-3-9- Propriétés digestives	23
II-4- Propriétés biologique	23
II-5- Autres activités	24

Chapitre III : Partie expérimentale

III-1- Matériels et méthodes

III-1-1- Présentation de la matière première	26
III-1-2- Appareils et produits chimiques	26
• Appareillages	26
• Réactifs	26
III-1-3- Extraction éthanolique de la propolis	27
III-1-4- Détermination de rendement	28
III-1-5- Analyses quantitative de l'extrait	28
III-1-5-1- Dosage spectrophotométrique	28
III-1-5-1-1- La spectrophotométrie	28
• Définition	28
• Principe	30
III-1-5-1-2- Dosage des polyphénols totaux	30
• Principe	30
III-1-5-1-3- Préparation de la gamme d'étalonnage	31
• Mode opératoire	31
• Expression des résultats	32
III-1-6- Dosage des flavonoïdes totaux	32
• Principe	32
III-1-6-1- Préparation de la gamme d'étalonnage	32
• Mode opératoire	33
• Expression des résultats	33

III-1-7- L'activité antioxydante	33
III-1-7-1- Méthode de réduction du radical libre DPPH	34
• Test DPPH	34
• Principe	34
• Mode opératoire	35
• Expression des résultats	35
III-1-7-2- Technique électrochimique utilisée pour déterminer l'activité antioxydante	36
III-1-7-2-1- Techniques électrochimiques voltampérométriques	37
III-1-7-2-2- Les électrodes	38
III-1-7-2-3- La solution	38
III-1-7-2-4- Composants et principes de la Voltampérométrie linéaire	38
• Principe	38
• Composants	39
• Test électrochimique	40
• Principe	40
• Mode opératoire	40
<i>III-2- Résultats et discussions</i>	
III-2-1- Extraction	42
III-2-2- Dosage spectrophotométrique	43
III-2-2-1- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux	43
III-2-3- Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire	48
III-2-3-1- Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH	48
III-2-3-2- La méthode électrochimique	52
Conclusion Générale	54
Référence Bibliographique	56

Introduction
générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25 - 30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons).

En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin. Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années [1].

En effet, la recherche scientifique a tendance à se focaliser sur l'exploration de ces substances qui constituent une alternative prometteuse aux anciennes substances d'origine synthétique. Face à cette situation préoccupante, d'énormes efforts sont consentis dans le domaine de la recherche médicale en vue de trouver des nouvelles molécules naturelles actives efficaces et non toxiques.

Les 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 [2].

Parmi ces produits, la propolis est définie comme un remède naturel utilisé depuis l'antiquité, et aussi une résine végétale. Elle est sécrétée par les feuilles, les bourgeons, les branches et l'écorce des arbres pour se protéger contre les infections.

Dans le monde entier, de nombreuses études sont consacrées à la propolis, source importante de composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, diverses substances de la propolis récoltées de différentes régions de monde ont été identifiées, dont les acides phénoliques, les flavones, les flavonols et les flavonones marquent leur présence permanente (éléments standards de la propolis).

Ces composés phénoliques possèdent certaines activités biologiques : germicide, bactériostatique, anti-inflammatoire et antiviraleetc.

Introduction Générale

Le but de ce travail est d'analyser un produit local (la propolis Algérienne typiquement de la wilaya de Bouira), et déterminant ses compositions afin d'améliorer son utilisation.

Ce mémoire s'articule principalement sur deux parties, la première partie consiste à une étude bibliographique, elle comporte un couple de chapitres. Le premier chapitre, on s'intéresse a donné quelques connaissances concernant la propolis et le deuxième chapitre est consacré à la composition et les activités biologiques de la propolis.

La suivante partie consiste en une étude expérimentale subdivisée en deux sous-chapitres. Le premier sous-chapitre comporte les méthodes et matériels utilisé pour la quantification et l'identification des polyphénols et des flavonoïdes dans notre extrait, et aussi l'évaluation de l'activité antioxydante, où nous avons utilisé également deux tests in vitro. Le premier test est la détermination du pouvoir réducteur ainsi que l'estimation à la moyenne de DPPH de la capacité de l'extrait éthanolique de la propolis à piéger les radicaux libre. L'autre consiste à mesurer la capacité réductrice présente dans notre extrait, c'est le test électrochimique.

Enfin, le deuxième sous-chapitre consiste à la discussion des résultats obtenus dans cette étude.

Partie
bibliographique

Chapitre I
Généralités sur
la propolis

Généralement, lorsqu'on parle d'abeille et de ruche, on pense directement à la production de miel. Pourtant, ce n'est pas le seul résultat du travail de nos abeilles.

En plus de nectar, les abeilles récoltent aussi du pollen. Elles fabriquent de la cire, du venin, de la gelée royale et de la propolis.

La propolis est un produit de ruche résineuse qui a été utilisé par l'homme depuis les temps anciens pour ses propriétés pharmaceutiques et il est encore utilisé comme constituant de «bio-cosmétiques», «aliments santé» et pour de nombreuses autres fins [3].

Propolis, ou «colle d'abeille», est une substance bien connue que les apiculteurs trouvent dans leurs ruches.

Propolis selon les recherches ont révélé être efficace contre une variété de bactéries, des virus, des champignons et des moisissures. Il a été montré comme un stimulant immunitaire non spécifique [4].

I-1- Définition de la propolis

« 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)» [5].

Donc la propolis, est une matière résineuse recueillie et préparée par les abeilles pour boucher tous les fentes et toutes les ouvertures de leurs ruches avant d'y former leurs alvéoles de cire [6].



Figure I-1 : La propolis brute provenant de la montagne Algérienne [7].

I-2- Etymologie de la propolis

Etymologiquement, « pro » (devant) et « polis » (cité) veut dire « devant la cité » ou « protège la cité ». Son nom résume bien à lui seul les propriétés et les rôles de cette substance d'origine à la fois végétale et animale. Bien que la composition soit relativement différente selon l'origine géobotanique, l'activité des diverses propolis reste commune [8].

Deux théories avaient été énoncées quant à l'origine précise de la propolis. Certains auteurs pensaient que des variétés de la propolis étaient obtenues à partir du pollen accumulé provisoirement dans les intestins de l'abeille [8].

On sait maintenant que la propolis est formée à partir des résines végétales sécrétées par les bourgeons et l'écorce de certains arbres. La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source qu'elle attaque avec ses mandibules. Elle décolle les fragments de résine, les mélange avec ses mandibules et les incorpore à sa salive. Puis, tête redressée, elle se recule afin d'étirer la particule saisie jusqu'à ce qu'elle soit transformée en un fil et que celui-ci se rompe. Enfin, elle entasse et loge les gouttelettes formées dans ses corbeilles et les rapporte à la ruche [5, 8,9].

I-3- Histoire de la propolis

Depuis des millénaires, Égyptiens, Grecs, Romains, Mayas utilisaient les produits issus de la ruche à des fins préventives, curatives et alimentaires.

Dès l'Antiquité, la propolis était employée comme thérapeutique contre les affections de la peau, les plaies et les suppurations.

De -3200 à -1100 ans avant 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.

De -700 à -600 ans avant JC, les Grecs ont observé que cette substance résineuse se situait à l'entrée de la ruche comme barrière de protection contre les prédateurs [10].

En Rome Antique, les soldats romains, eux, partaient au combat avec un morceau de la 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.

Durant la même période, en Amérique du Sud, les Incas utilisaient la propolis comme antiseptique.

Au XVI^{ème} siècle, elle servait à cicatriser les blessures de flèches. Hippocrate recommandait la propolis pour la guérison des plaies et des ulcères. C'est surtout au XVIII - XIX^{ème} siècle que la propolis fut utilisée pour panser les plaies. 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. On pouvait la trouver sous formes variées de pommade, d'emplâtre, de lotion ou de gaz [10].

I-4- Récolte de la propolis

I-4-1- Récolte de la propolis par les abeilles

Le nombre de butineuses, spécialisées dans la récolte des résines et la fabrication de la propolis est relativement restreint au sein d'une colonie d'abeilles.

Les ouvrières butineuses localisent la source de résines 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 corbicules (ou corbeilles) situés dans les pattes postérieures de l'abeille [11].



Figure I-2 : Récolte de la propolis [11].



Figure I-3 : Butineuses de la propolis dans la ruche [11].

I-4-1-1- Les conditions de récoltes

Cette récolte ne répond pas à des règles bien définies et constantes, elle dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons dégager et analyser les plus notables :

- **L'âge de l'abeille** : Il semble que ce soient les abeilles les plus âgées donc les plus expérimentées qui récoltent la propolis. L'étude histologique montre que leurs glandes cirières sont totalement atrophiées, l'âge minimal est de dix-huit jours.
- **La race** : La tendance à propolis dépend de la race d'abeille. Il est reconnu que L'abeille grise des montagnes appelée encore Caucasiennne (*Apis mellifica caucasia*) et certaines autres races d'Asie Mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propolisent en général davantage que les autres, c'est le cas de l'abeille carniolienne (*Apis mellifica carnica*) et l'abeille Tellienne (*Apis mellifera*). Mais dans de nombreux autres cas, les données d'information en ce qui concerne ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises.
- **La saison** : La récolte à lieu, soit, en début de printemps, mais le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche d'automne au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage.
- **Le climat** (dont la température): Les abeilles récolteuses de la propolis déploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température le plus souvent supérieure à 20°C) et en outre, pendant les heures les mieux exposées, à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne), ceci du fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.
- **La géographie** : C'est ainsi, entre autres, que les ruches situées dans les régions boisées propolisent davantage que les ruches de plaine [7].

I-4-1-2- La quantité de la propolis

La quantité de la propolis récoltée et fabriquée par les abeilles varie selon la race et aussi selon la flore. Ainsi, les abeilles caucasiennes produisent beaucoup plus de la propolis que les autres races, et avant l'hiver, elles bouchent avec de la propolis l'entrée de la ruche, ne laissant qu'un petit trou pour leur passage. Dans la même race, la quantité récoltée varie avec le type de flore. Etant donné que les résines sont récoltées sur les bourgeons des arbres, entre autres des peupliers, chênes et bouleaux, et sur l'écorce et les bourgeons des conifères, les ruches contiennent plus de la propolis en forêt qu'en région de

cultures où la flore est en majorité annuelle. Le colmatage des couvre-cadres, des bords des hausses et des épaulements des cadres par une couche de la propolis sur leurs surfaces d'appui est un handicap pour les visites des ruches et pour la récolte du miel [12].

La quantité récoltée est très variable. Elle est sous la dépendance de facteurs qui conditionnent la propre recoulée par les abeilles. Elle se situe en moyenne entre 100 et 300g par ruche et par année. Cette propolis brute doit être purifiée avant toute utilisation [13].

I-4-2- Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche

Il existe différentes méthodes pour récolter la propolis. Pour obtenir une propolis relativement propre, on peut utiliser un filet ou une grille spéciale en PVC avec des trous en forme de berceaux ou avec des fentes de 2 à 3 millimètres. La grille à propolis est disposée sur ses cadres en haut de la ruche, ces grilles existant aussi cette forme de petits cadres suspendus entre autres cadres. Les abeilles repèrent les petits trous ou petites fentes qu'elles assimilent à des fissures et qu'elles colmatent le plus rapidement possible avec de la propolis. C'est important pour la thermorégulation de la chambre à couvain. La récolte de la propolis est ensuite déposée dans un endroit frais, dans le congélateur ou dans de l'eau froide. Après avoir refroidissement de la propolis, l'apiculteur peut chercher à détacher des morceaux. Il réutilisera éventuellement la grille une nouvelle fois.

Une méthode de récolte plus simple est souvent utilisée consiste à gratter la propolis des vieux cadres après les avoir sortis de la ruche. La propolis se trouve surtout sur les planchettes supérieures est sous les planchettes latérales.

Pour les ruches de type top-bar, on gratte la propolis sur les cotés des barres supérieures.

Dans les pays tropicaux, on peut aussi accrocher des Calebasses ou des pots dont l'entrée est large. Les abeilles obturent alors entièrement l'entrée avec de la propolis [14].



Figure I-4: Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche [13].



Figure I-5: La récolte de la propolis avec un filet en plastique placé sur le dessus de la ruche [15].

I-5- La qualité de la propolis

La diversité de la propolis pose un problème pour la qualité et la standardisation des analyses.

Le contrôle de qualité s'effectue ainsi:

- Analyse macroscopique ;
- Analyse physique ;
- Analyse chimique.

D'une manière générale, les critères essentiels d'une propolis sont :

- Une faible teneur en débris (bois, abeilles mortes,....etc) ;
- Une faible teneur en cire ;
- Peu ou pas de contamination par les pesticides et métaux lourds;
- Une teneur élevée en baume oléorésine naturelle particulière caractérisée par la présence de constituants benzoïques et/ou cinnamiques ;
- Une teneur élevée en métabolites secondaires [16].

I-6- Utilisation de la propolis

I-6-1- Utilisation de la propolis par l'abeille

Certaines colonies récoltent beaucoup de propolis et d'autres peu. On ignore l'origine de ces différences, qui pourrait être liées au climat [17]. Les abeilles utilisant la propolis pour colmater les fissures de la ruche, pour fixer les cadres, pour consolider les cellules, pour réduire la largeur du trou de vol, et pour recouvrir les animaux qui auraient pénétré à l'intérieur de la ruche et auraient été tués par les gardiennes (une souris par exemple). Si l'intrus est volumineux, les abeilles ne parviennent pas à rejeter son corps hors de la ruche. Elles essaient alors de le vider pour éviter qu'il ne se putréfie et, par la suite, le recouvrement de la propolis [18].

Les abeilles utilisent également la propolis:

- Comme matériau de construction pour réduire la taille des entrées du nid et lisser la surface pour le trafic des abeilles ;

- En couches fines pour vernir l'intérieur des alvéoles à couvain avant que la reine y pondre ses œufs, fournissant ainsi une unité résistante, imperméable et hygiénique pour le développement des larves [19].

I-6-2- Utilisation de la propolis par l'homme

La propolis aux propriétés, antiseptiques et anesthésiantes est souvent un des éléments des médicaments, des dentifrices, des aérosols buccaux, des chewing-gums, des shampoings, savons, onguents pour la peau et produits de beauté [19].

La propolis fait partie de la pharmacopée traditionnelle et est également une colle efficace pour réparer et sceller des récipients (bois, métal ou argile), ou pour boucher les nœuds du bois.

La propolis est un vernis à bois apprécié depuis longtemps. Son utilisation en tant que vernis pour les violons faits par Stradivarius, à Crémone dans le nord de l'Italie, est bien connue. La propolis de cette région provient des peupliers [19].

I-6-2-1- Cosmétique

En raison de ses nombreuses propriétés, la propolis peut être utilisée en cosmétologie dans les préparations suivantes :

- Produits de rasage et d'après rasage, notamment pour ses propriétés antiseptiques et anesthésiques locales ;
- Produits de soin du cuir chevelu et shampoings, pour ses propriétés antiseptiques et antipelliculaires ;
- Dentifrices et chewing-gums, pour ses propriétés antibactériennes visant à lutter contre la plaque dentaire ;
- Déodorants, savons et bains moussants, pour ses propriétés antiseptiques [20].

I-6-2-2- Médecine

La substance qui se trouve à l'entrée des ruches, et que nous avons nommée propolis, fait sortir des plaies les pointes et les corps étrangers qui y sont engagés; elle résout les tumeurs, amollit les duretés, calme les maux de nerfs, et sèche les ulcères les plus rebelles à se cicatrifier [21].

La propolis est utilisée en médecine grâce à ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et thérapeutiques, en industrie et en artisanat [22].

Ce produit est utilisé dans la fabrication des produits à usage externe comme les gouttes pour le nez, les sirops anti toux, les dentifrices, lotions, pommades, crèmes et huiles corporelles, shampooings ou produits nettoyants pour la peau.

Les produits de soins du corps à la propolis sont appliqués sur les plaies, cicatrices, inflammations et affections musculaires, ils permettent de lutter contre l'eczéma, le psoriasis, les verrues, les champignons, l'épaississement des ongles ou encore les mycoses entre les orteils (pied d'athlète) [14].

I-6-2-3- Technologie alimentaire

Les activités antioxydantes, antimicrobiennes et antifongiques de la propolis offrent des possibilités pour les applications de la technologie alimentaire.

Un avantage particulier est que, contrairement à certains conservateurs classiques, les résidus de la propolis semblent avoir un effet généralement bénéfique sur la santé humaine. Cependant, très peu d'études ont été menées sur les effets secondaires possibles d'augmentation de la consommation de la propolis. Individuellement, certains des composants identifiés dans la propolis peut être très dommageable pour la santé humaine [23].

Chapitre II

Composition et

propriétés de la

propolis

La propolis est un produit de l'abeille connue pour ces propriétés biologiques et les propriétés pharmacologiques depuis des siècles. Il a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle et aussi, en raison de ses propriétés antibactériennes, antiseptique, anti-inflammatoire, anesthésique et activités, dans la médecine complémentaire. La propolis est devenue l'objet de nombreuses études élaborées et mises en œuvre partout dans le monde afin d'analyser sa composition chimique ainsi que ces propriétés médicinales [24], qui varie principalement en fonction de son origine, ce qui à son tour, entraînent des changements dans son l'activité [24].

II-1- La composition de la propolis

La propolis est une substance très particulière, visqueuse, brune et parfumée. Les abeilles en colmatent les trous et fissures des parois de ruche et en enduisant finement les cellules à fin de protéger le couvain à naitre. Les abeilles se servent par ailleurs de la propolis pour modifier l'ouverture de la planche de vol, qu'elles rétrécissent en préversion d'un hiver rigoureux. Elles enduisent également les parois intérieur de leur habitat et collent les parties détachées de la ruche avec de la propolis. La propolis est un atout lorsque des abeilles voyagent [14].

La composition de la Propolis dépend de l'espèce des abeilles et le type de végétation présente dans cette géographique région, et par la saison de collecte [25].

A notre connaissance et de nos jours nous trouvons jusqu'à 270 molécules différentes dans la propolis. Mais de manière générale :

- ✓ Résines et baumes 55% ;
- ✓ Huiles essentiels 7% ;
- ✓ Cire 30% ;
- ✓ Pollen 3% ;
- ✓ Divers 5% (vitamines et acides aminés) [26] ;
- ✓ Acides organiques : benzoïque et gallique ;
- ✓ Aldéhydes aromatiques : vanilline, isovanilline [27].

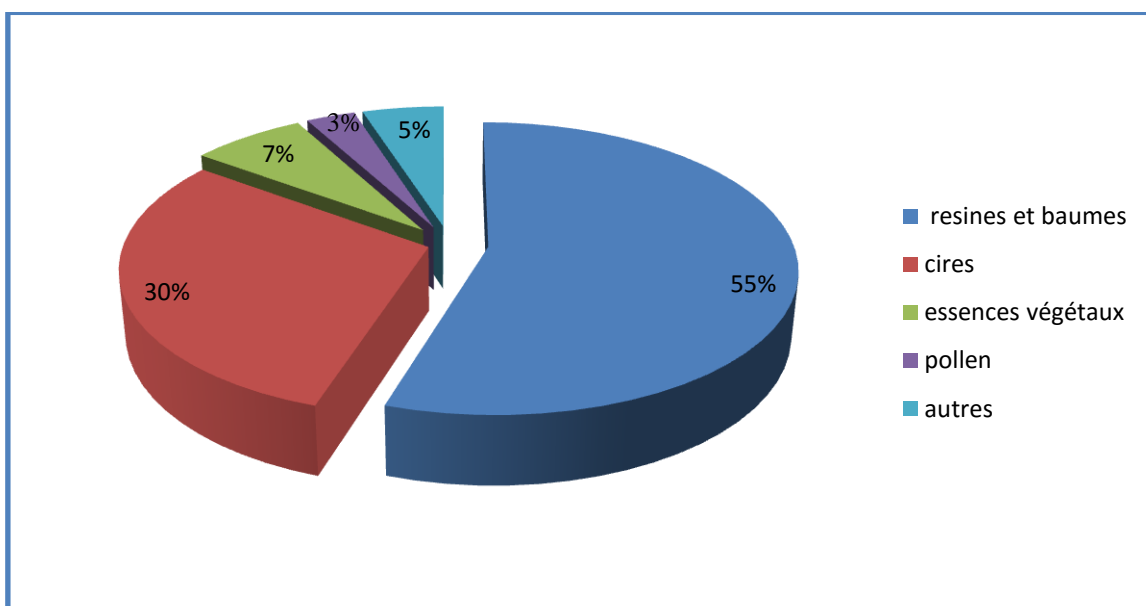


Figure II-1: Composition générale moyenne de la propolis [28].

De nombreuses études ont démontré que la propolis était une source importante de polyphénols, et notamment de flavonoïdes.

II-1-1- Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production.

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique. Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une

grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière [29].

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [30].

II-1-2- Les flavonoïdes

Le mot « flavonoïde » a été introduit en 1952 par HINREIER pour désigner tous les pigments ayant un squelette C6-C3-C6 analogue à celui des flavones, lui-même dérivant du Latin flavus qui signifie jaune.

Les flavonoïdes sont presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aures, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigment : tel est le cas des flavones et des flavonols incolores co-pigmentant et protégeant les anthocyanosides.

Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen, condition de la survie de l'espèce végétale.

Les flavonoïdes sont également présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet [31].

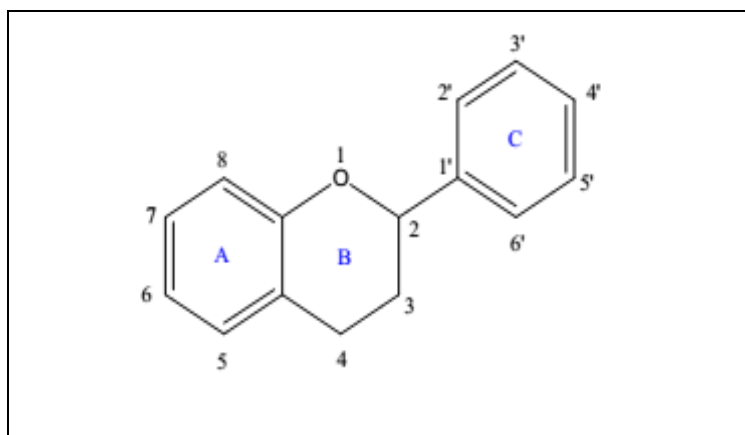


Figure II- 2 : Structure de base des flavonoïdes [29].

Les éléments actifs de la propolis sont les flavonoïdes, les acides ferriques, les huiles essentielles et les caroténoïdes. Les autres matières qui la composent sont les cires botaniques et les cires d'abeilles (environ de 30%) ainsi que des matériaux bruts.

Les résines, gommés et les cires botaniques récoltées par les abeilles proviennent toujours de sorte d'arbres différents ayant chacune son propre type de résine. La propolis varie donc énormément de son origine végétale et géographique. Les flavonoïdes ont tous la même formule chimique mais diffèrent néanmoins les uns des autres.

C'est pourquoi on les utilise pour identifier l'origine géographique ou botanique de miel [14].

II-2- Les propriétés physico-chimiques

La propolis est un produit facile à conserver, quelle que soit la forme sous laquelle elle se présente. Il est toutefois préférable de la conserver dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur. Pour bénéficier de toutes ses propriétés, il est recommandé d'utiliser la propolis aussi fraîche que possible [12].

La couleur de la propolis varie du jaune ou noire avec des teintes rougeâtres et verte, son odeur est aromatique avec un mélange de résine, de cire, de vanille et de miel.

Sa consistance devient celle de chewing-gum quand on mastique la propolis. Mais la propolis colle aux dents dans les premières secondes. La température fait varier la consistance à faible température, moins de 10°C, la propolis est dure et friable tandis que 30°C, elle va ramollir, et devient malléable, souple et collante vers 65°C, elle fond.

La propolis ne se dissout pas dans l'eau mais dans l'alcool. Sa dissolution dans l'alcool permet d'éliminer les morceaux de cire et d'autres impuretés [32]. Et la densité elle est de l'ordre de 1,2 en moyenne [7].

II-3- Propriétés pharmacologique

De nos jours, une multitude d'études scientifiques ont été menées sur la propolis dans le but de mettre en évidence les nombreuses propriétés physico-chimiques et pharmaceutiques qui lui ont été assignées de manière empirique. Les divers travaux rendus publics au cours de ces 30 dernières années ont permis de démontrer les bénéfices d'une utilisation thérapeutique de la propolis tant sur le plan préventif, qu'au niveau curatif [33].

II-3-1- Propriétés antibactérienne

Des travaux ont mis en évidence l'action antibactérienne, antifongique et antiprotozoaire de la propolis.

L'association avec des antibiotiques classique permettrait de réduire les phénomènes de résistance et de baisser les dosages de ces produits.

Son spectre antibactérien est très large, en agissant sur les staphylocoques (*staphylococcus aureus* résistant à la *méthicilline*), les streptocoques (*streptococcus mutans* implique dans les caries dentaires), *Helicobacter pylori*, les *Bacillus*, les salmonelles au encore les microcoques.

Cette action est essentiellement due aux flavonoïdes certaines molécules aromatiques et à l'acide cinnamique. D'après une étude japonaise, la propolis inhiberait la croissance microbienne en bloquant la division cellulaire et en détruisant la paroi bactérienne, et ceci principalement sur les bactéries à Gram positif [34].

II-3-2- Propriétés antifongique

La propolis est également antifongique. Des propolis de plusieurs origines (Nouvelle Zélande, Brésil, Japon) ont été testées sur des cultures de *Trichophyton mentagrophytes* et de *Candida albicans*. Toutes ont eu une activité antifongique. Cependant, elles sont moins efficaces sur *Candida albicans* que ne l'est l'HE de Thym à thymol.

Cette étude a permis d'observer les molécules majoritairement présentes dans ces propolis et qui pourraient être à l'origine de l'activité antifongique [16].

Pour les propolis du Brésil, les principaux composants sont l'artepilline C et la drupanine. Pour celles de Nouvelle-Zélande, il s'agit de la pinocembrine, la galangine et l'alkylphénol. En revanche, aucune molécule ne s'est véritablement démarquée dans la propolis de Chine.

Les propolis d'autres origines telles que la France, l'Allemagne ou l'Autriche ont montré une activité antifongique sur *Candida albicans* avec une efficacité plus importante pour celles d'Allemagne et d'Autriche.

La synthèse des études précédemment citées démontre que l'activité antifongique est liée à la présence de : pinocembrine, pinobanksine, acide caféique, ester benzylique, sakuranetine, artepilline C, drupanine et ptérosilbène [16].

Millet-Clerc et al ont rapporté que la propolis a présenté une activité antifongique importante contre *Trichophyton* et *Microsporum* en présence de propylène glycol, qui interagit de manière synergique à une concentration de 5%.

Des combinaisons de certains médicaments antimycosique de la propolis (10%) ont augmenté leur l'activité sur des levures *Candida albicans*. Le plus grand effet synergique contre la plupart souches a été obtenu lorsque la propolis était ajoutée aux médicaments antifongiques qui expriment par Holderna et Kedzie en 1987.

Valdés et al, ont testé 30 échantillons de la propolis produits à Cuba contre 2 souches de *C. albicans*. Lisa et al a vérifié l'activité antifongique d'extraits de la propolis (10% dans l'éthanol) contre 17 des agents pathogènes fongiques. L'EEP inhibée *Candida* et les dermatophytes testés. Fernandes junior et al a évalué l'activité antifongique des EEP contre *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. guilliermondii*; 98% des échantillons de champignons sont sensibles à des concentrations d'EEP inférieures à 5,0% [35].

Lori a observé dans les testes in vitro, les concentrations de propolis de 5 ou 10% a empêché la croissance de *Trichophyton verrucosum*. L'activité antifongique de la propolis était observée chez certains champignons de plantes in vitro par Marcucci en 1995 [35].

II-3-3- Propriétés antioxydante

Le terme « antioxydante » est entré dans notre quotidien à travers notre alimentation. C'est un argument de vente pour beaucoup de produits et compléments alimentaires. D'après les connaissances scientifiques, les antioxydantes permettent de prévenir de nombreuses maladies de types dyslipidémie, hypercholestérolémie, diabète [16].

Une antioxydante est une molécule capable de ralentir ou de prévenir l'oxydation des autres molécules et ainsi d'éviter de tels changements. L'effet antioxydant correspond à peu près à l'activité anti-inflammatoire et hépatoprotecteur.

Bien que le contenu phénolique semble varier en fonction de l'origine botanique, des effets antioxydant pour la plupart des types de la propolis ont été rapportés.

Par rapport au pollen et la gelée royale, des extraits de la propolis présentaient la plus forte activité antioxydante.

Dans une étude portant sur la propolis de différente origine géographique et botanique, il a été constaté que l'activité antioxydante est bien corrélée avec la concentration totale en polyphénols [36].

Des essais de capacité antioxydante peuvent être grossièrement divisés en deux catégories, en fonction de la réaction chimique impliquée: transfert d'hydrogène atomique (HAT) et le transfert d'un électron (SET) réactions basées sur des essais.

Les essais à base de HAT surveiller la cinétique de la réaction de compétition (ie, le dosage de l'oxygène de la capacité d'absorption des radicaux (ORAC) et le dosage des paramètres totale de l'antioxydante a piégé les radicaux (TRAP)). Les essais basés sur SET-impliquent une réaction redox avec l'oxydant (ie, Trolox équivalent antioxydant capacity, TEAC), Essai de la réduction du fer du plasma (FRAP), test à base de DPPH, le cuivre (II) la capacité de réduction, et le dosage des composés phénoliques totaux par Folin- Ciocalteu (FC).

Les techniques électrochimiques permettent l'évaluation de l'activité antioxydante ainsi que la mesure de la quantité totale des espèces antioxydantes présentes dans l'échantillon, offrant des avantages par rapport aux autres méthodes en raison de la vitesse, la simplicité et réduction de la consommation de réactifs analytiques.

En ce qui concerne la recherche de la propolis, certains travaux ont été déjà faits en utilisant des méthodes électrochimiques, principalement dans l'évaluation de l'activité antioxydante par flux ampérométrique analyse par injection, voltamétrie cyclique, et polarographie [15].

II-3-4- Propriétés anticancéreuse

Dans nos sociétés modernes, les cancers demeurent une cause majeure de mortalité et les traitements anticancéreux présentent de nombreux effets secondaires. Aussi, les patients sont en demande de traitements complémentaires naturels, susceptibles d'améliorer la qualité de vie lors de chimiothérapies lourdes [37].

La propolis, tout comme le miel, a fait l'objet de nombreuses études en raison de ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antiviraux et hépatoprotective. Plus récemment, la propolis a été étudiée pour ses activités anticancéreuses potentielles [38].

La propolis présente à cet égard un réel intérêt pour de nombreux types de cancer. La prise de la propolis lors de chimiothérapie ou de radiothérapie permet de diminuer les effets secondaires des traitements, en particulier d'améliorer l'immunité des patients par un effet positif sur les cellules sanguines. L'efficacité antiseptique de la propolis offre en plus une bonne protection contre de nombreux germes chez des patients fragiles [37].

Par ailleurs, des études in vitro ont montré que la propolis inhibe la multiplication de plusieurs lignées de cellules cancéreuses. L'efficacité de cette inhibition dépend de la composition de la propolis qui varie selon les sources des plantes. Des récentes recherches ont mis en évidence l'importance des dérivés de l'acide caféique dans cet effet cytostatique [37].

La propolis est un mélange riche en polyphénols, des flavonoïdes aglycones, des acides phénoliques et leurs esters et aldéhydes phénolique et cétones. Les composés polyphénoliques sont connus pour avoir l'activité anti-carcinogène sur les modèles de tumeurs murines. De plus, l'acide caféique, CAPE [34], et la quercétine peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses. La suppression de la croissance tumorale était susceptible d'être en raison de sa propre cytotoxicité directe ainsi que le renforcement immunité et l'inhibition de la peroxydation des lipides.

Un effet positif de la thérapie anticancéreuse est la capacité à initier l'apoptose dans les cellules cancéreuses. L'apoptose est un mécanisme naturel de réguler la mort cellulaire à divers stades de développement et fonctionnel.

L'intérêt thérapeutique de la propolis pour anticancéreux est dû à sa capacité à ressort induire l'apoptose, bien que le mécanisme dépendant du type et de la concentration de l'extrait de la propolis [38].

II-3-5- Propriétés anti-inflammatoire

L'inflammation, le premier système de défense physiologique dans le corps humain peut protéger contre les blessures causées par des blessures physiques, des poisons, etc. Ce système de défense a également appelé à court terme l'inflammation peuvent détruire des micro-organismes infectieux, éliminer les irritants et maintenir physiologie une physiologie régulière, à savoir, l'asthme normale et la polyarthrite rhumatoïde.

La monnaie et large du traitement inflammatoire est utilisé des AINS médicament. Mais alors que la majorité des AINS ont donc irritation gastro-intestinale naturelle substances ayant un effet anti-inflammatoire et un effet secondaire mineur peut être aussi un effet bénéfique remplacement de ces médicaments.

Dans certains pays, la propolis est utilisé pour le traitement de différentes maladies, telles que odontologique, dermatologiques et troubles gynécologiques, dans laquelle l'inflammation et la douleur sont des éléments importants. Piégeur de radicaux libres générés par les neutrophiles dans les processus inflammatoires, est le principal mécanisme de médicaments anti-inflammatoires classiques, et est également une propriété connue de la propolis [39].

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.

Cet effet est dû à son action inhibitrice (principalement celle des flavonoïdes qu'elle contient) sur la prostaglandine synthétase, empêchant ainsi la synthèse des prostaglandines, composants responsables de la réaction inflammatoire.

Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : 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, myéloperoxidase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase). Le CAPE s'est révélé être le plus puissant modulateur du métabolisme de l'acide arachidonique à la base de la synthèse des leucotriènes et des prostaglandines pro-inflammatoires.

La cire de la propolis provenant des résidus solides de la fabrication des teintures de la propolis, possède encore des constituants actifs. Son utilisation sous forme de cataplasme donne de très bons résultats [11].

II-3-6- Propriétés antivirale

Les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, adénovirus. Ainsi, la propolis et certains de ses constituants (apigénine, chrysine) possèdent un effet prophylactique contre le virus de la grippe, en atténuent les symptômes à travers une action antineuraminidase. La propolis de peupliers et l'un de ses principaux composés, l'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE), ont un potentiel anti-VIH (comme agent anti-intégrase du virus) et un effet additif avec l'AZT (inhibiteur de la transcriptase inverse). Des crèmes à base de la propolis se sont révélées efficaces pour réduire les durées des lésions, les douleurs et augmenter les intervalles entre deux épisodes d'herpès labial et génital [40].

II-3-7- Propriétés cicatrisante

Les vertus cicatrisantes de la propolis sont connues depuis l'antiquité. Utilisé au cours des siècles, la propolis a démontré qu'elle possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire épidermique, les vaisseaux, la formation du collagène grâce à un phénomène de stimulation fibroblastique [11].

En effet, la propolis accélère la régénération de différents tissus abîmés : c'est le cas notamment de la pulpe dentaire, des tissus hépatiques ou du tissu osseux, comme l'ont suggéré des études réalisées sur l'animal [11].

II-3-8- Propriétés anti-infectieuse

Elle présente des propriétés antimicrobiennes (antibactériennes, anti-fongiques, anti-parasitaires et antivirales) et probablement immunostimulantes : elle active les fibrocytes et inhibe l'histaminosécrétion des mastocytes [41].

II-3-9- Propriétés digestives

Elle est inhibitrice des spasmes des voies digestives. Elle protège l'estomac contre des lésions induites par l'éthanol. L'extrait de la propolis agirait en inhibant la lipoxgénase et protège la muqueuse gastrique du stress oxydatif.

L'ester phényléthylique du CAPE de la propolis atténue les symptômes de la colite induite par le peptidoglycane-polysaccharide bactérien en inhibant les NF-Kappa B produites dans les macrophages, réduisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires [42].

II-4- Propriétés biologique

La connaissance des propriétés biologiques de la propolis a permis, au cours de ces dernières années, son utilisation avec des résultats satisfaisants en thérapeutique humaine et vétérinaire, en dermatologie, gynécologie, stomatologie et dans le traitement de diverses maladies infectieuses [42].

Les nombreuses propriétés biologiques de la propolis sont reconnues depuis déjà plusieurs siècles. En effet, elle était utilisée déjà 300 ans avant Jésus-Christ pour concocter les remèdes [43].

La propolis stimule la régénération des tissus de mammifères, comme il a causé une forte activation de la mitose des cellules cultivées in vitro et amélioré la biosynthèse des protéines.

Extraits de la propolis ont été étudiés pour l'activité cytostatique in vitro par Scheller et al.

Étude chimique et pharmacologique de la propolis provenant de divers endroits étaient une enquête par Papay et al en 1997.

Des travaux expérimentaux de Stojko et al et Haldon et al, ont montré que la propolis accélère le processus ostéogénique et le processus de régénération des différents tissus.

Matsuno a isolé les substances tumoricides de la propolis brésiliens [4].

Strehl et al ont montré que les extraits éthanoliques et aqueux de la propolis indiquent l'importance des fonctions anti-inflammatoire ainsi que des activités antibiotiques, où l'extrait aqueux de la propolis inhibe l'enzyme dihydrofolate réductase, cette activité d'inhibition peut être au moins partiellement en raison de la teneur en acide caféique [44].

Krol et al (1990) a suggéré que l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) a des propriétés médicales remarquables, y compris la protection des souris contre gamma-irradiation. Ils ont dit que cet effet antioxydant est partiellement dû à sa haute teneur en flavonoïdes [45].

II-5- Autres activités

La propolis a de nombreuses autres activités biologiques y compris l'activité immunostimulante. Elle a un effet antimutagène contre différents agents mutagènes environnementaux tels que la 4-nitro O-phénylènediamine, le 1-nitropyrene, le 2-amino-3-méthylimidazo [4,5-f] quinoléine et le benzo [a] pyrène [46].

Hartwich et al ont utilisé la propolis dans quelque traitement des patients opérés pour un goitre, les patients avec blessures et ulcérations difficiles à guérir et les patients avec inflammation non spécifique par voie rectale. Ils ont également testé l'efficacité de la propolis en tant que moyens complémentaires de l'éradication de traitement de l'*Helicobacter pylori* [47].

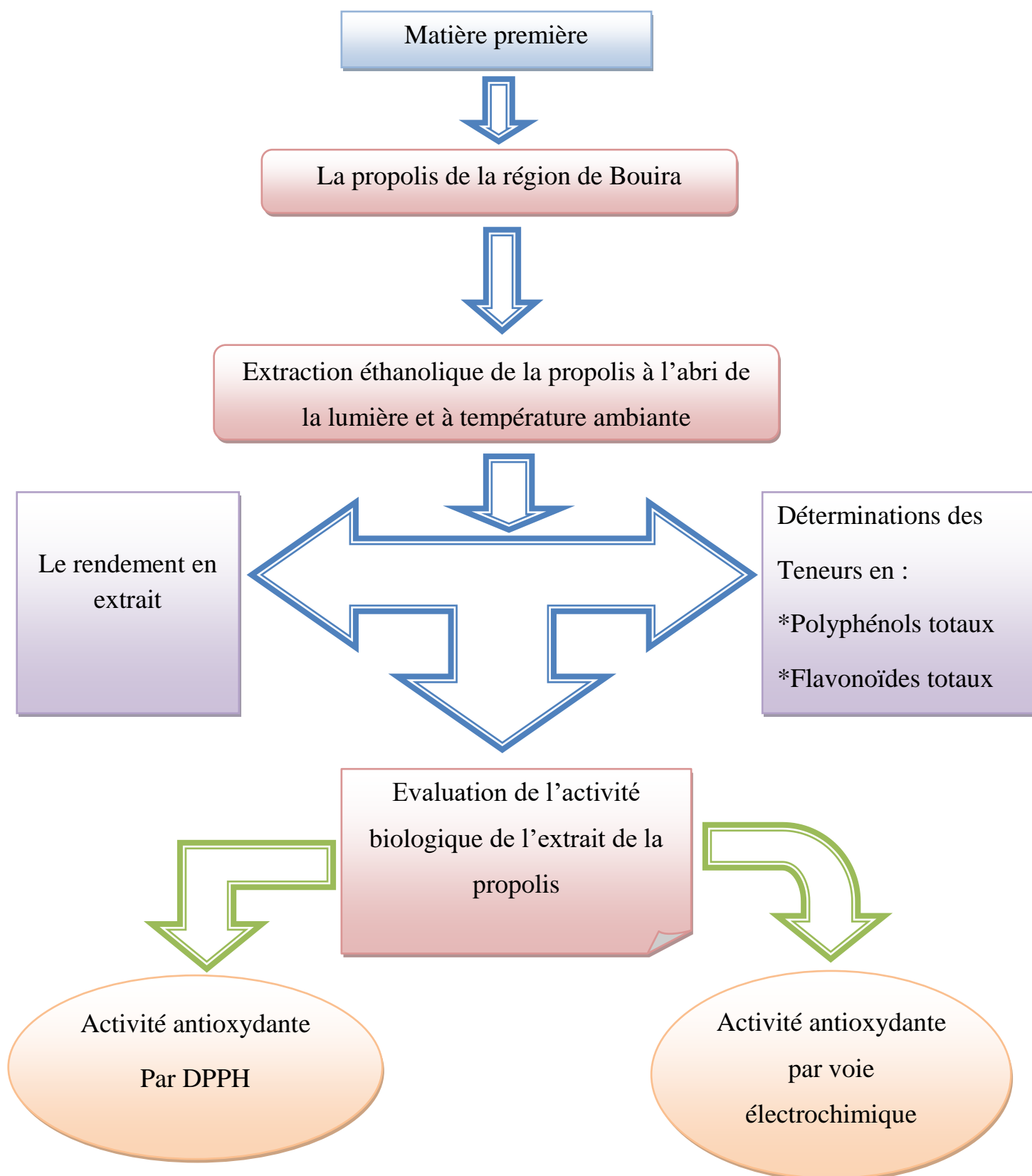
Chapitre III

Partie

expérimentale

Matériels
et
méthodes

Notre démarche expérimentale a été résumée à travers le diagramme comme suit :



Organigramme de l'étude expérimentale.

III-1- Matériels et méthodes

III-1-1- Présentation de la matière première

L'échantillon de la propolis est de l'origine de la wilaya de Bouira exactement de village de Beni Hamad, récolté en février 2016 par des grilles de la propolis, avec une quantité de 20 g, caractérisé par une couleur brune et une odeur parfumée. La conservation de notre échantillon a été faite a froid dans le réfrigérateur à 4 °c.



Figure III-1-1 : La propolis de Bouira (Beni Hamad).

III-1-2- Appareils et produits chimiques

- **Appareillages**

Balance ;

Spectrophotomètre (type Spectronic 20 Genysis TM) ;

Vortex ;

Potentiostat/Galvanostat(référence 3000 ZRA).

- **Réactifs**

Carbonate de sodium ; Chlorure d'Aluminium ($AlCl_3$) ; Nacl ; Réactif de Folin-Ciocalteu ; DPPH proviennent tous de Sigma-Aldrich. Les autres réactifs et solvants Éthanol ; Méthanol, ont été obtenus de Prolabo.

III-1-3- Extraction éthanolique de la propolis

L'extraction a été effectuée comme décrit précédemment par (Eraslan et al en 2004), et la méthode d'extraction que nous avons adopté est la macération à partir d'une quantité bien déterminé 20 g de la propolis mis en contact avec 67 ml de l'éthanol 70% à température ambiante et à l'abri de la lumière avec agitation de temps en temps, pendant un jour, puis on fait la filtration et l'opération est répétée 03 fois successivement. L'extrait obtenu est appelé Extrait Ethanolique de la Propolis (EEP), l'extrait est mis dans des boites de pétris, et évaporée dans un étuve à 40 °C pour obtenir un extrait sec et facile à manipuler. Après deux jour l'extrait est récupéré se forme des cristaux, puis conserve à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à son utilisation.

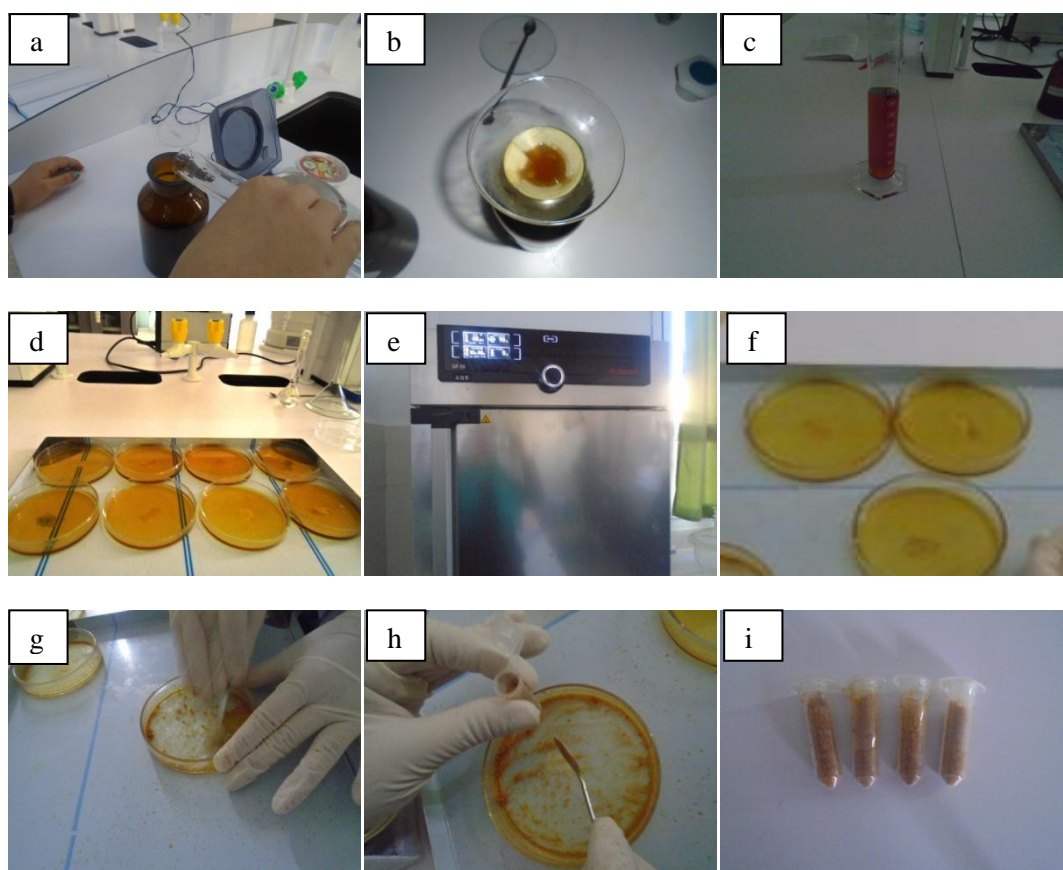


Figure III-1-2 : Méthode d'extraction de la propolis.

- a** : Mélange d'éthanol et de la propolis ; **b** : Filtration; **c** : Récupération de volume d'EEP ;
d : L'extrait dans des boites de pétries ; **e** : Séchage de l'extrait; **f** : EEP sec ;
g : Grattage de la propolis sèche ; **h** : Remplissage ; **i** : Récupération finale d'EEP.

III-1-4- Détermination du rendement

C'est la quantité des composés ou substances pouvant être extraites par un solvant typique dans des conditions spécifiques [48].

Le rendement est calculé à partir de cette équation :

$$\mathbf{R\%=(Me/Mv) \times 100}$$

Considérons :

- R% : Rendement par rapport au poids de la propolis utilisée ;
- Me : Poids en gramme des cristaux ;
- Mv : Poids en gramme de la propolis.

III-1-5- Analyses quantitatives de l'extrait

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires ont été effectuées sur les extraits de la propolis par le spectrophotomètre.

III-1-5-1- Dosage spectrophotométrique**III-1-5-1-1- La spectrophotométrie****• Définition**

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert.



Figure III-1-3 : Le spectrophotomètre

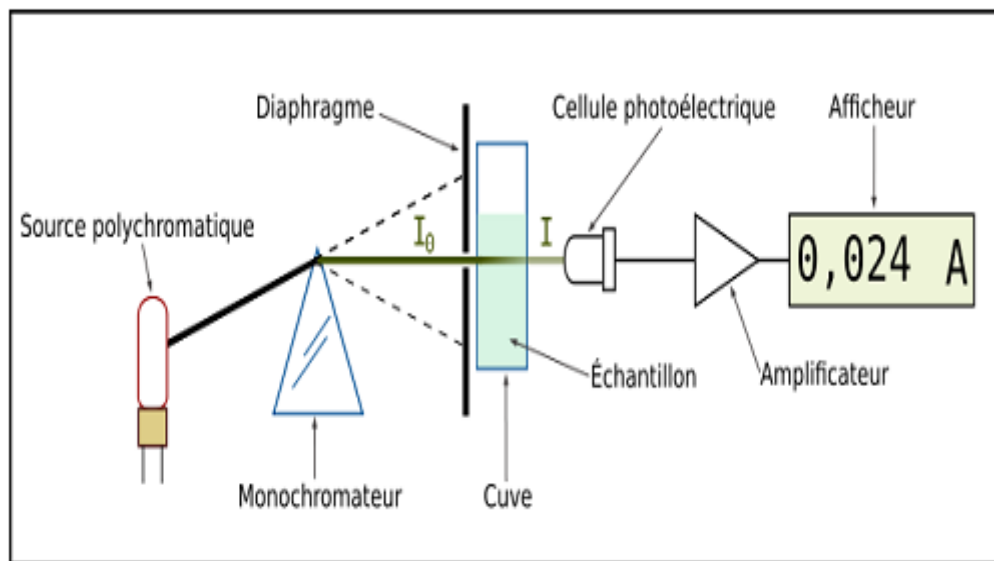


Figure III-1-4 : Le principe de spectrophotomètre [1].

- **Principe**

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance.

$$A = \varepsilon c l$$

Avec:

- A : Absorbance sans unite;
- ε : Coefficient d'extinction (qui dépend de la longueur d'onde);
- l : Longueur du trajet optique (en cm), qui correspond à l'épaisseur de la cuve de mesure ;
- C : Concentration du soluté (l'unité dépend de celle du coefficient d'extinction).

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner des réactions sous l'effet de la lumière incidente [49].

III-1-5-1-2- Dosage des polyphénols totaux

- **Principe**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Rossi (en 1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3), ce qui nous aide à doser les phénols dans le visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm [29, 50].

III-1-5-1-3- Préparation de la gamme d'étalonnage

- Peser 10 mg d'acide gallique;
- Les dissoudre dans 10 ml de méthanol, soit une solution (S1) avec une concentration de 1mg/ml ;
- Diluer la solution mère comme suit : volume totale 500 µl (**Tableau III-1-1**).

Tableau III-1-1 : Dilution de la solution mère du dosage de l'acide gallique.

[C]	10	20	40	60	80	100	120	140
V _{sm} (µl)	5	10	20	30	40	50	60	70
V _{ed} (µl)	495	490	480	470	460	450	440	430

➤ Mode opératoire

Les polyphénols totaux sont dosés de la manière suivante:

A l'aide d'une micropipette, 100 µl de l'extrait de la propolis (1mg/ml) ont été introduit dans 03 tubes à essais (triplicata). Puis 500 µl de Folin – Ciocalteu dilué 10 fois dans H₂O distillé (v/v) a été ajouté dans chaque tube. Agiter vigoureusement puis laisser agir 4 min avant d'ajouter 400 µl de Na₂CO₃ (7,5 %). Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière.

L'absorbance de chaque solution a été déterminée à partir du spectrophotomètre UV-visible (Spectronic 20 Genysis TM) à 765 nm. La lecture de la densité optique à 765 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Le blanc est représenté par 100 µl de chaque concentration avec l'ajoute de 400 µl de Na₂CO₃ additionné du 500 µl, de H₂O distillée.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

✚ Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/mg).

III-1-6- Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par Djeridane et al [51], et Boudiaf [52], est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans notre extrait.

• Principe

1 ml de l'extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol).

Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation [53].

III-1-6-1- Préparation de la gamme d'étalonnage

- Peser 2,5 mg de quercétine.
- Les dissoudre dans 1ml de méthanol, soit une solution (S2).
- Diluer la solution mère dans une fiole qu'on complète à 50ml de méthanol, ce qui donne une concentration de 50 μg /ml.
- Le volume total est de 5 ml.
- La préparation de la courbe d'étalonnage des flavonoïdes est illustrée dans le **tableau** ci-dessous.

Tableau III-1-2: Dilutions de la solution mère pour le dosage de la quercétine.

[C] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1	2	5	7	10	15	20	40
V_{sm} (ml)	0,1	0.2	0,5	0,7	1	1,5	2	4
V_{MeOH} (ml)	4,9	4.8	4,5	4,3	4	3,5	3	1

➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essais introduire 1ml de chaque dilution d'échantillon, après 4 min, ajouter 1ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2%, le mélange obtenu est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant environ 10 min.

Le blanc est représenté par 1ml de l'extrait à laquelle on ajoute 1ml de méthanol, toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'absorbance du mélange obtenue est mesurée par un spectrophotomètre UV-visible à 430 nm, après agitation et repos de 10 min.

Un standard de calibration a été préparé en utilisant des solutions de quercétine des différentes concentrations, pour déterminer la concentration en composés flavonoïques dans l'extrait de la propolis.

✚ Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligramme par g d'extrait (mg/g).

III-1-7- L'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante, Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant, d'autres reposent sur la mesure de la capacité d'une substance à piéger les composés radicalaires [54, 55].

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits éthanolique de la propolis étudiées a été déterminée en utilisant deux méthodes différentes :

- La première est l'évaluation du pouvoir antiradicalaire en mesurant le pourcentage de neutralisation du radical DPPH par les antioxydants présents dans l'extrait éthanolique de la propolis étudiée.

- La deuxième méthode par l'estimation de l'activité antioxydante par voie électrochimique.

III-1-7-1- Méthode de réduction du radical libre DPPH

❖ Test DPPH

- Principe

(1,1 DiPhenyl-2-Picryl Hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquées par la présence de l'extrait. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsqu'on lui associe avec un proton. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques [56].

Dans ce test, le substrat d'oxydation est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule d'antioxydant, se transforme en DPPH-H [56], (1,1-diphényl-2-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazine (DPPH₂)).

Cette réduction peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Le système est très utilisé car il est rapide, facile et non coûteux [56].

Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances de notre extrait [56].

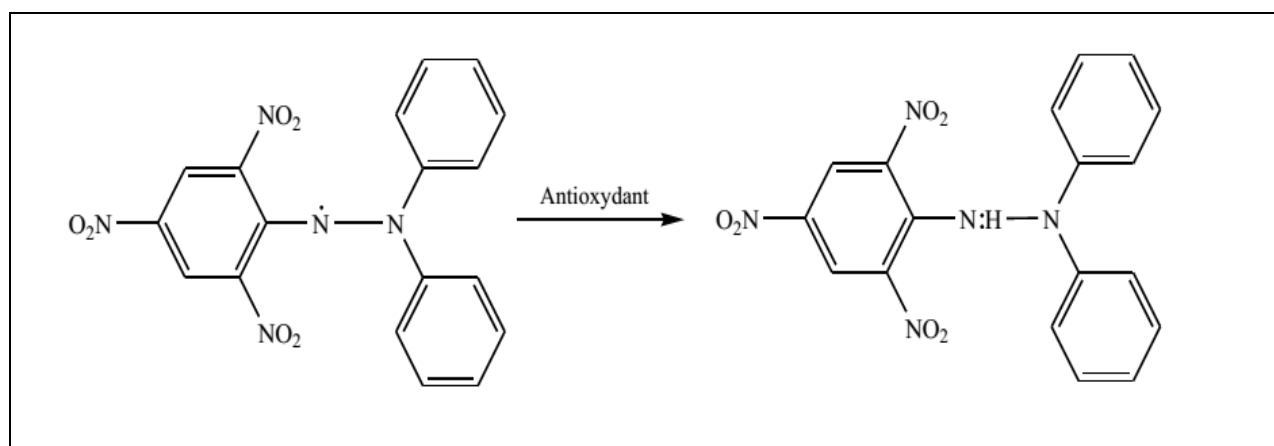


Figure III-1-5: Réduction du radical DPPH [57].

➤ **Mode opératoire**

La Capacité du radicale libre a été mesurée en utilisant le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Bondet, Brand-Williams, et Berset, 1997) [58], avec des modifications.

Une solution méthanolique de 0,004% de DPPH est mélangée avec différentes concentrations des extraits de la propolis. Dans des tubes à essais on a introduit 0,05 ml de chaque dilution de notre extrait, et on ajoute 1,25 ml de solution méthanolique de DPPH. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis il est maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante pour que la réaction accomplisse.

L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm, et le méthanol a été utilisé comme témoin.

Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

✚ **Expression des résultats**

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés.

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

• **Calcul des pourcentages d'inhibitions**

L'évaluation de l'activité antiradicalaire en utilisant la méthode DPPH est exprimée en :

$$I(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_1}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Soit :

- I (%) : pouvoir d'inhibition en % ;
- A₀: absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait ;
- A₁: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait.

- **Détermination quantitative du pouvoir antiradicalaire**

Afin de déterminer le pouvoir antiradicalaire des extraits et de composé de référence (BHT), nous avons tracé les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition (I %) en fonction de la concentration massique (g/l) (**Figures III-2-3 et III-2-4**).

- **Calcul des IC₅₀**

IC₅₀ est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH, les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées et les standards.

III-1-7-2- Technique électrochimique utilisée pour déterminer l'activité antioxydante

L'électrochimie est une bonne méthode pour étudier des réactions comportant des transferts d'électrons car elle permet d'obtenir les espèces oxydées ou réduites sans ajout d'agent oxydant ou réducteur.

C'est au cours du XIX^{ème} siècle que naît et se développe l'électrochimie. En effet après la réalisation d'une pile capable de produire une tension et de délivrer un courant électrique, des expériences portant sur des dépôts métalliques vont être réalisées.

Au cours du XIX^{ème} siècle l'électrochimie apporte une véritable révolution chimique ouvrant l^{ère} de la chimie moderne. Au cours de ce siècle, cette science a permis de mettre en place des procédés électrolytiques dans l'industrie. Les connaissances théoriques ont évolué principalement au cours de la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, puis au début du XX^{ème} siècle la théorie de la cinétique électrochimique va être développée. Après la seconde guerre mondiale de nombreux travaux ont été réalisés conduisant à la connaissance actuelle des processus électrochimiques.

L'électrochimie permet d'analyser les liens qui existent entre la chimie et l'électricité.

Elle traite des réactions où interviennent un ou plusieurs électrons, en particulier les réactions d'oxydoréduction.

La connaissance des caractéristiques fondamentales d'une réaction électrochimique se fait au moyen de la mesure des variations du courant en fonction du potentiel appliqué aux bornes d'une cellule d'électrolyse (system hors équilibre). La détermination expérimentale

de la relation entre le courant et le potentiel d'électrode se traduit par l'obtention des figures appelées voltampérogrammes. Elle est l'objet de la voltampérométrie [59].

III-1-7-2-1- Techniques électrochimiques voltampérométriques

Les méthodes voltampérométriques les plus anciennes et les plus simples sont celles à balayage linéaire, le potentiel de l'électrode de travail variant de 2 à 5 mV par seconde, le courant de l'ordre du microampère, est simultanément enregistré sous forme d'un voltampérogramme qui est un graphique du courant en fonction de potentiel appliqué à l'électrode de travail [60], la voltampérométrie à balayage linéaire s'effectue dans un appareil appelé potentiostat illustrée dans la **figure III-1-6**.



Figure III-1-6: Montage de teste électrochimique.

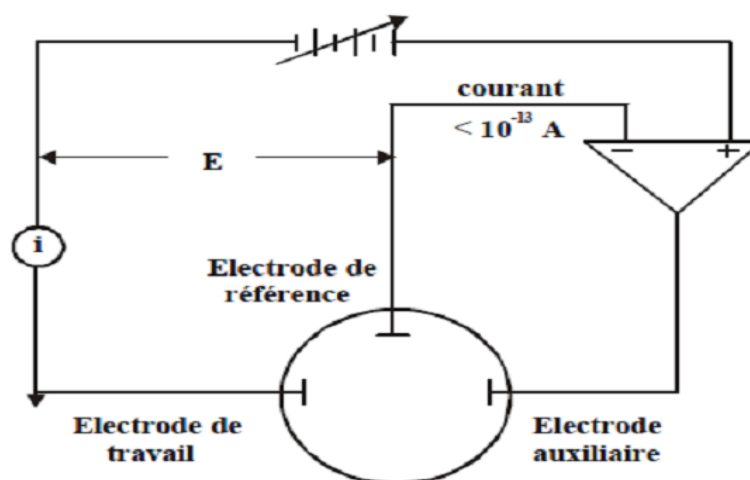


Figure III-1-7: Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat [61].

III-1-7-2-2- Les électrodes

✓ **L'électrode de travail**

Est une microélectrode de petite surface d'ordre de cm^2 dont la surface sert de site pour la réaction de transfert d'électrons et est donc le cœur de tous systèmes voltammétriques.

L'électrode tournante : animée d'un mouvement de rotation, dans le but de se placer dans les conditions expérimentales d'un régime de diffusion.

La nature de l'électrode de travail sera choisie principalement en fonction de son domaine de polarisation, la fenêtre de potentiel dans laquelle l'oxydoréduction d'un composé est mesurable [59].

✓ **L'électrode de référence**

Est le deuxième composant-clé de toute cellule voltammétriques. Cette électrode possède un potentiel spécifique et constant, ce qui permet d'imposer un potentiel précisément défini à l'électrode de travail. Ceci est important, étant donné que le potentiostat ne permet de contrôler que la différence de potentiel imposé entre deux électrodes. Notons également que de ce fait il est indispensable de mentionner la nature de l'électrode de référence utilisée pour toutes mesures voltammétriques [61].

✓ **L'électrode auxiliaire (contre électrode)**

Elle permet d'assurer le passage du courant dans le système trois électrodes et sa mesure. Elle est formée d'un matériau inerte chimiquement et est dotée d'une surface suffisante pour ne pas limiter le passage du courant [62].

III-1-7-2-3- La solution

La solution contient le solvant (eau), un électrolyte inerte en grande concentration pour assurer le flux de courant dans la solution par transport de ses ions, et le (ou les) composé(s) à analyser (aussi appelé dépolariser) qui subit la réaction redox à la surface de l'électrode de travail [59].

III-1-7-2-4- Composants et principes de la Voltampérométrie linéaire**• Principe**

La méthode voltampérométrique de dosage consiste à appliquer une différence de potentiel variable entre une électrode de référence et une électrode indicatrice, souvent appelée électrode de travail au contact de laquelle va se produire une réaction de type :



Lorsque le potentiel de l'électrode de travail atteint une valeur telle qu'une espèce (le dépolarisant) présente dans la solution étudiée, est réduite ou oxydée, l'intensité qui passe dans le circuit extérieur à cette cellule comprenant les deux électrodes croît brusquement. Dans la pratique, afin qu'aucun courant ne transite par l'électrode de référence, on utilise un montage comportant une troisième électrode appelée électrode auxiliaire, en métal noble ou en carbone et un électrolyte inerte (électrolyte support) pour rendre le milieu conducteur. La microélectrolyse ainsi réalisée pendant le dosage est de courte durée.

En résumé, en réalisant un balayage en tension, croissante ou décroissante, sur une plage où on attend la réduction ou l'oxydation du (ou des) analytes recherchés, on obtient une courbe intensité-potentiel, $I = f(E)$, ou voltampérogramme, qui va permettre d'identifier les espèces concernées et de calculer leurs concentrations. Cette électrolyse ne modifie pas de manière appréciable les concentrations des analytes dans le volume de la solution [63].

• Composants

Les unités de base d'un analyseur voltammétriques sont :

- Une cellule basée sur un système à trois électrodes immergées dans la solution à analyser.

Les trois électrodes sont:

- Une électrode de travail (parfois aussi appelée électrode indicatrice) : électrode de carbone vitreux (0.07cm^2) ;
- Une électrode de référence : ECS (électrode au calomel saturé);
- Une électrode auxiliaire (parfois aussi appelée contre-électrode) : électrode de platine ;
- Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant (**Figure III-1-6**).

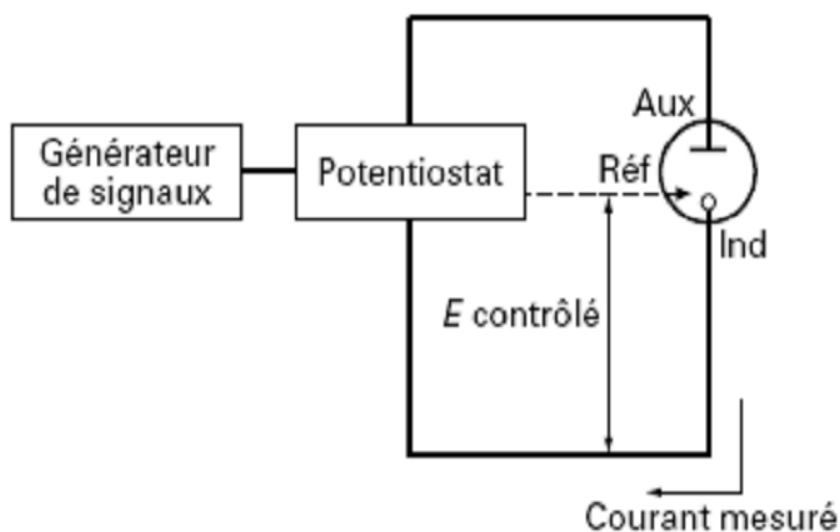


Figure III-1-8: Dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé [61].

❖ Test électrochimique

• Principe

Dans l'une d'entre elles, on agite vigoureusement la solution qui est en contact avec une microélectrode immobile où l'on fait tourner cette microélectrode dans la solution à une vitesse élevée et constante [60].

Elle consiste à imposer une rampe linéaire en potentiel avec une vitesse de balayage positive ou négative, et à enregistrer l'intensité du courant. Le montage généralement utilisé est un montage à trois électrodes.

Le balayage des potentiels s'effectue de façon linéaire à vitesse Cte, après avoir balayé vers les potentiels anodiques et réaliser une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel pour effectuer une exploitation vers les potentiels cathodiques et réaliser une réduction.

➤ Mode opératoire

L'étude des propriétés antioxydantes de l'extrait en milieu NaCl (0,1M) a été effectuée sur une plage de potentiel allant de -200 à 1800 mV/s.

On effectue 2 tests d'électrochimiques avec les solutions suivantes :

- Solution de NaCl saturée d'O₂ et dans ce cas la concentration d'O₂ initial est 7, 23 mg/l.

- Solution de NaCl + EEP de la propolis (60 mg/ml).

Le test est basé sur le degré de réduction d'O₂ en présence de l'extrait de la propolis.

Résultats
et
discussion

III-2- Résultats et discussion

Sous chapitre présente tous les résultats obtenus au cours des expériences effectuées ainsi que leurs interprétations et discussions.

III-2-1- Extraction

L'extraction n'est qu'une étape de transformation de la matière première (dans notre cas c'est la propolis) en un extrait. Toutes les étapes qui précèdent ou suivent l'extraction doivent être maîtrisées avec précision pour obtenir un produit final de qualité optimale. Dans cette optique, le découpage de la propolis a été réalisé de façon à pouvoir récupérer des morceaux très fins dans le but d'optimiser l'extraction [64].

La préparation de l'extrait, à partir de la propolis bien choisie, a été réalisée en utilisant le solvant éthanolique.

L'extrait organique (EEP) a été obtenu par macération répétée en utilisant un solvant à polarité croissante (EtOH). L'extrait obtenu a été conservés au réfrigérateur avant d'être analysés et caractérisé par sa couleur et son rendement, ces éléments sont présentés dans le **tableau III-2-1**.

Tableau III-2-1 Rendement et couleur de l'extrait EEP.

	La masse(g)	La couleur	Le rendement(%)
Propolis	20	Brune fonce	-
EEP	4,1	Châtaine	20,5

Le rendement a été déterminé par rapport au poids de la propolis sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage (%).

Dans le cas de notre étude, Le rendement obtenu avec l'éthanol soit 20,5%, est plus faible par rapport que celle obtenu par Losiane et Paviani et al [65]. Qui ont trouvé un rendement de 78% pour EEP brésiliennes vertes, néanmoins il est approximativement proche à celle de l'Argentine (pampeana 26,6 % à 75,8 %) [66].

Une étude sur l'extraction avec l'eau a indiqué des rendements de l'ordre 7,7% ; 3,2% et 9,6 % respectivement pour la propolis de Chine, du Pérou et du Brésil, ce qui signifie que le rendement de l'extraction aqueux est plus faible que l'éthanol [67].

Le rendement dans le cadre de la méthode Sox-EtOH [65], est 2,4 fois plus grande que nous avons obtenus par la méthode de macération, en raison d'une température élevée et recyclage du solvant dans la méthode Soxhlet, qui contribue à augmenter la solubilisation des composants de la matière première. Par contre, Sox-eau [65] a montré un rendement d'extraction plus faible 15,75%, bien que l'eau présente une polarité plus grande que tous les autres solvants utilisés dans le Soxhlet mais le rendement était plus faible, parce que la polarité n'est pas le seul facteur qui affecte l'efficacité d'extraction, et il est important de comprendre les différentes interactions entre soluté et solvant [68].

En plus de ces aspects quantitatives, quelque soit la méthode d'extraction appliquée elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bio-activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction [69].

A partir des études ont été réalisés sur l'extraction de la propolis, on peut déduire que les différents rendements d'extraction et les concentrations étaient probablement liés aux caractéristiques de la propolis premières, telles que la saison et la région de récolte, espèces d'abeilles, la flore régionale, les conditions de stockages ainsi que les conditions climatiques et le choix de solvant.

III-2-2- Dosage spectrophotométrique

III-2-2-1- Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux

Afin de caractériser l'extrait préparé à partir de la propolis, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydante de la propolis leur sont attribués.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin Ciocalteu selon Singleton et Rossi [70]. La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnages linéaire de la forme $y=ax$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium [51, 52].

Les concentrations des flavonoïdes sont déterminées à partir des droites d'étalonnage ($y = 0.0281x + 0.0102$, $R^2 = 0.9983$) tracées en utilisant comme standard la quercétine.

- La concentration est exprimée en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait).

Les résultats sont représentés dans le **tableau III-2-2** et les gammes d'étalonnages dans les **figures III-2-1, III-2-2**.

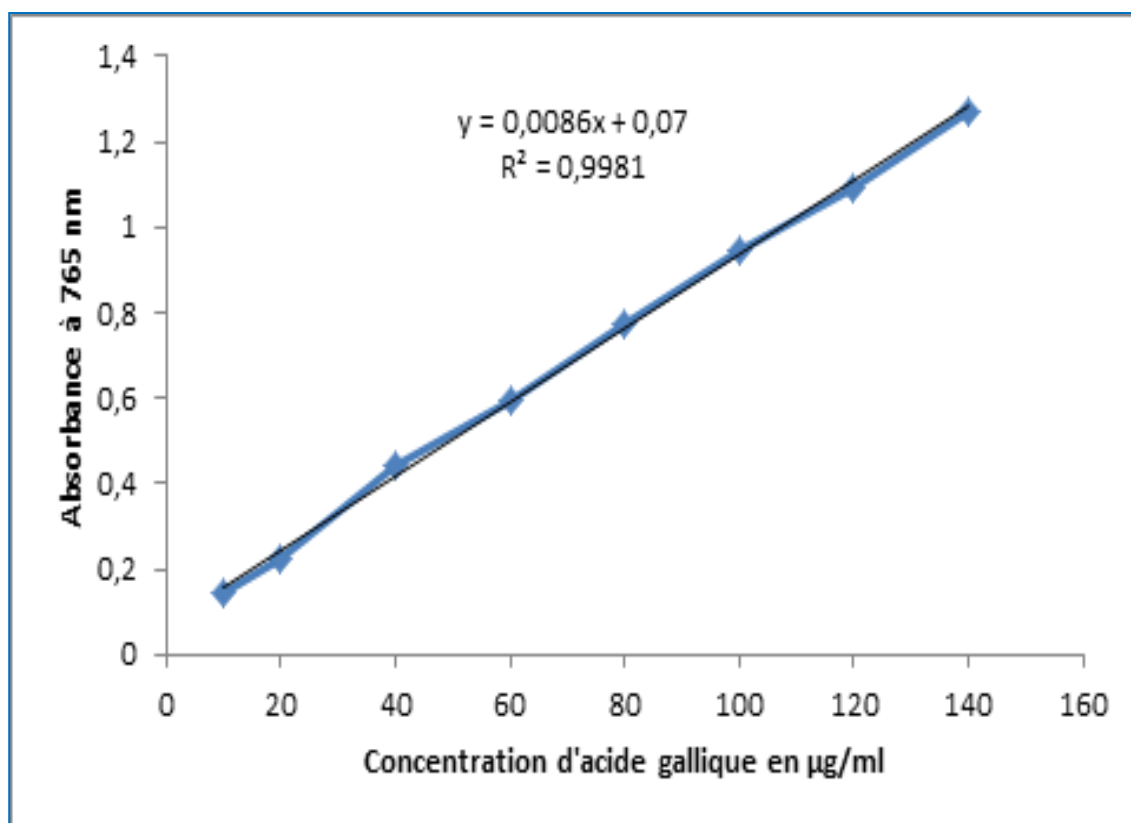


Figure III-2-1: Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

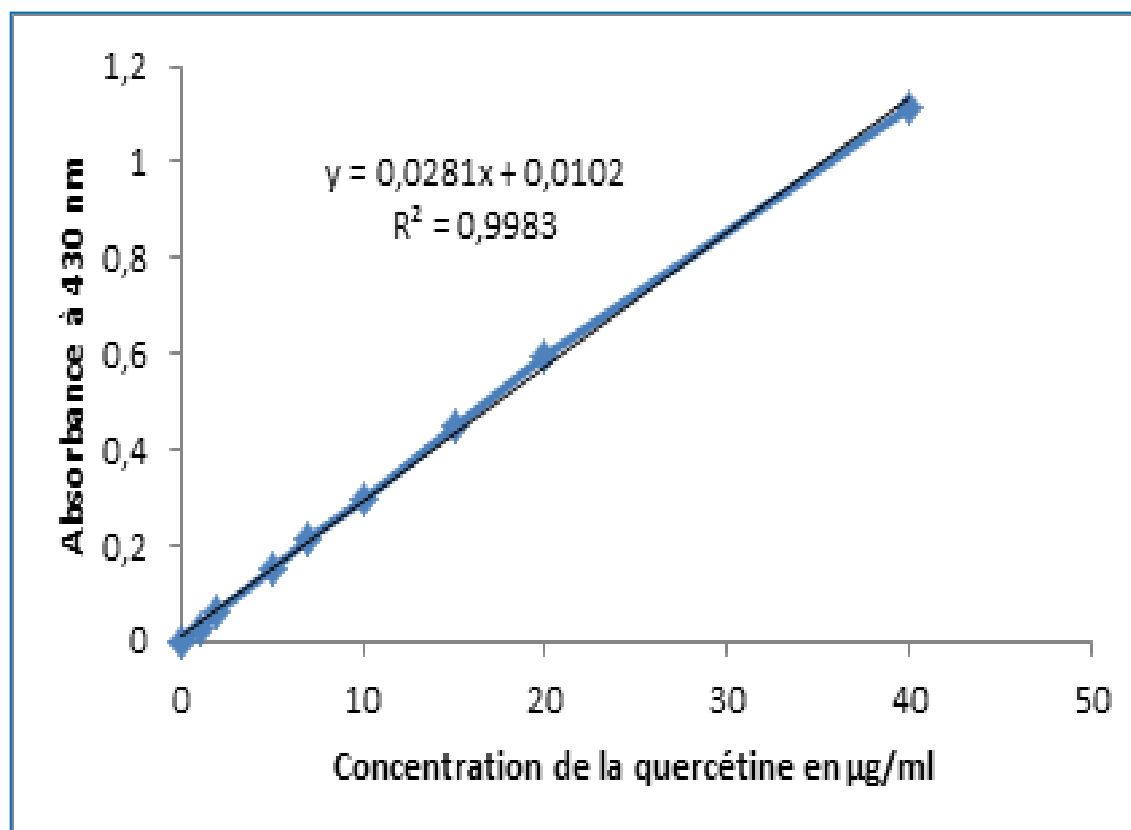


Figure III-2-2: Droite d'étalonnage de la quercétine.

Tableau III-2-2: Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux condensés dans l'extrait de la propolis

Extrait	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
EEP	113,44±0,0083	28,78±0,0069

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

(b) µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

Les méthodes de Folin-Ciocalteu et la coloration $AlCl_3$, pour déterminer les polyphénols totaux et le contenu flavonoïde, respectivement, sont actuellement utilisés pour analyser les plantes et les matières alimentaires [71]. Dans la présente étude, ces méthodes ont été appliquées pour déterminer les polyphénols totaux et le contenu des flavonoïdes dans l'extrait de la propolis de la wilaya de Bouira.

Dans le dosage des polyphénols et les flavonoides on a remarqué la transformation de la couleur jaune vers le bleu et le transparent vers le brunet respectivement ce qui signifie l'existence des polyphénols et des flavonoides dans notre échantillon.

Le total des flavonoïdes et polyphénols contenus étaient similaires pour l'extrait et sont démontrés dans le **tableau III-2-2**. Sur la base des résultats obtenus, il est suggéré que la teneur en polyphénols dans un EEP de la wilaya de Bouira était environ de 3,9 fois de la teneur en flavonoïdes (**Figure III-2-3**).

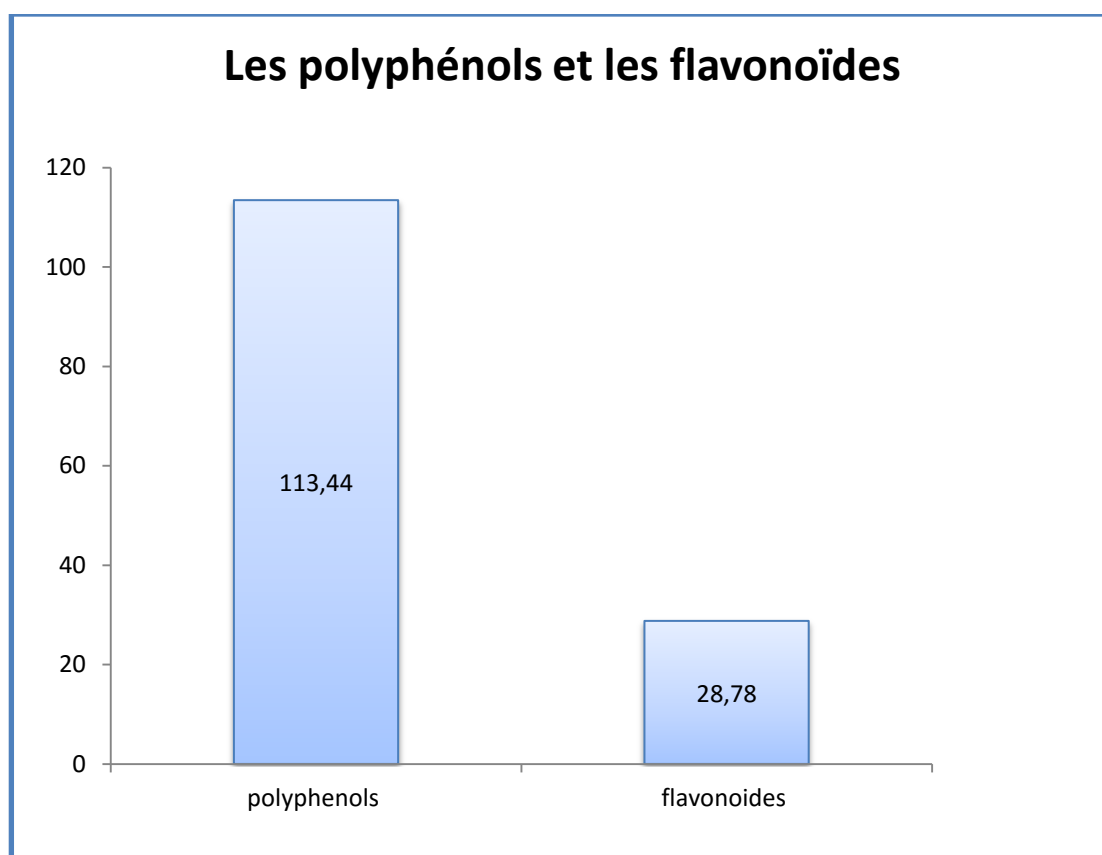


Figure III-2-3 : La quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans un mg d'EEP.

Le dosage des polyphénols montrent que l'extrait éthanolique de la propolis de Bouira contient $113,44 \pm 0,0083$ mg EAG/g d'extrait. En comparant avec les résultats de [72] Sur EEP-rouge de Brésil (215,44 mg EAG / g), on remarque que l'EEP de Bouira est moins riche en polyphénols que celui de Brésil (EEP rouge), cependant EEP vert Brésilienne (138,59 mg GAE / g), est voisine de la quantité des polyphénols contient dans notre extrait.

L'étude qu'est réalisée sur la propolis du Portugal, montre des tenures en polyphénols totaux qui oscillant entre 151,00 et 329,00 mg EAG/g de la propolis respectivement de la région de Fundao et Borne [73]. Ce qui signifie que la propolis de Portugal elle est riche en polyphénols comparativement avec notre propolis.

Des travaux ont été réalisé sur la propolis Iranienne, ont rapporté des tenures en composés phénolique de l'ordre de 8,46% ; 7,11% ; 3,08% de la propolis brute respectivement pour Tehran, Isfhan et Khorasan, ces valeurs sont inférieures à celles trouvées dans la présente étude (113.44mg EAG /g).

Si on compare les résultats du dosage avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en polyphénols de la propolis étudiée est situé dans l'intervalle de 31,2 à 299 mg GAE / g EEP, rapportée pour la propolis de plusieurs régions du monde [74].

En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes par la méthode au trichlorure d'aluminium, il convient de noter que le procédé d'évaluation des flavonoïdes est la formation d'une couleur complexe avec $AlCl_3$, permet la détermination de flavones et flavonols [75].

L'évaluation quantitatives des flavonoïdes (la quercétine sert un standard) montre une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2=0,9983$ (**Figure III-2-2**).

D'après Gabriela .V-B et al [76], les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de la propolis dans le pays de Chili de deux régions Buin et Caleu sont respectivement 10,9 % et 3,1 %, ceux –ci significativement plus élevés que le contenu en flavonoïdes élaborer par la propolis de la wilaya de Bouira.

A la suite, les investigations qui sont rapportés par Chang et al [77], qui a résolu la composition en flavonoïdes dans six échantillons de la propolis : trois échantillons de Taiwan, l'un en origine du Brésil et deux en source de Chine. Par rapport à nos résultats ($28,78 \pm 0,0069$ mg EQ/g c-à-d. 2,878%), le plus grand contenu était dans l'un des échantillons Chinois, 7,8%, et le plus bas contenu correspond à l'échantillon de Taïwan 2,3%.

D'après des recherches, Les composés phénoliques sont généralement trouvés dans les plantes comestibles et non comestibles, et ils ont été signalés à avoir de multiples effets biologiques, telle que l'activité antioxydante. La propolis contient une large variété de composés phénoliques, principalement des flavonoïdes, variation de la teneur en flavonoïdes de la propolis est principalement attribuable à la différence de la flore régionale préférée par les abeilles. Les flavonoïdes totaux et d'autres substances phénoliques ont été suggérés pour jouer un rôle préventif dans le développement du cancer et les maladies cardiaques [78].

Dans la présente étude, on a précisé deux méthodes pour quantifier les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

- La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes :
 - ✓ C'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité ;
 - ✓ la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée ;
 - ✓ la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré ;
 - ✓ c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde [79].
- Le mode d'emploi de la coloration $AlCl_3$ a été fixé pour les flavonoïdes.

III-2-3- Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire

III-2-3-1- Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH

Le test au DPPH (1,1 -diphényle-2-picrylhydrazyle) choisi dans cette étude est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne la décoloration de ce dernier [80]. La couleur violette foncée de DPPH se transforme en jaune, ce qui est remarqué au cours de réalisation de ce teste.

La méthode est rapide et commode à mettre en œuvre, elle s'effectue à température ambiante, permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules testées.

Ce teste consiste à mettre le radical DPPH en présence de molécules dites «antioxydants» afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. La forme réduite n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde [80].

Les activités antiradicalaires des extraits de la propolis et du témoin positif BHT ont été déterminées par la méthode au DPPH. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau III-2-3**

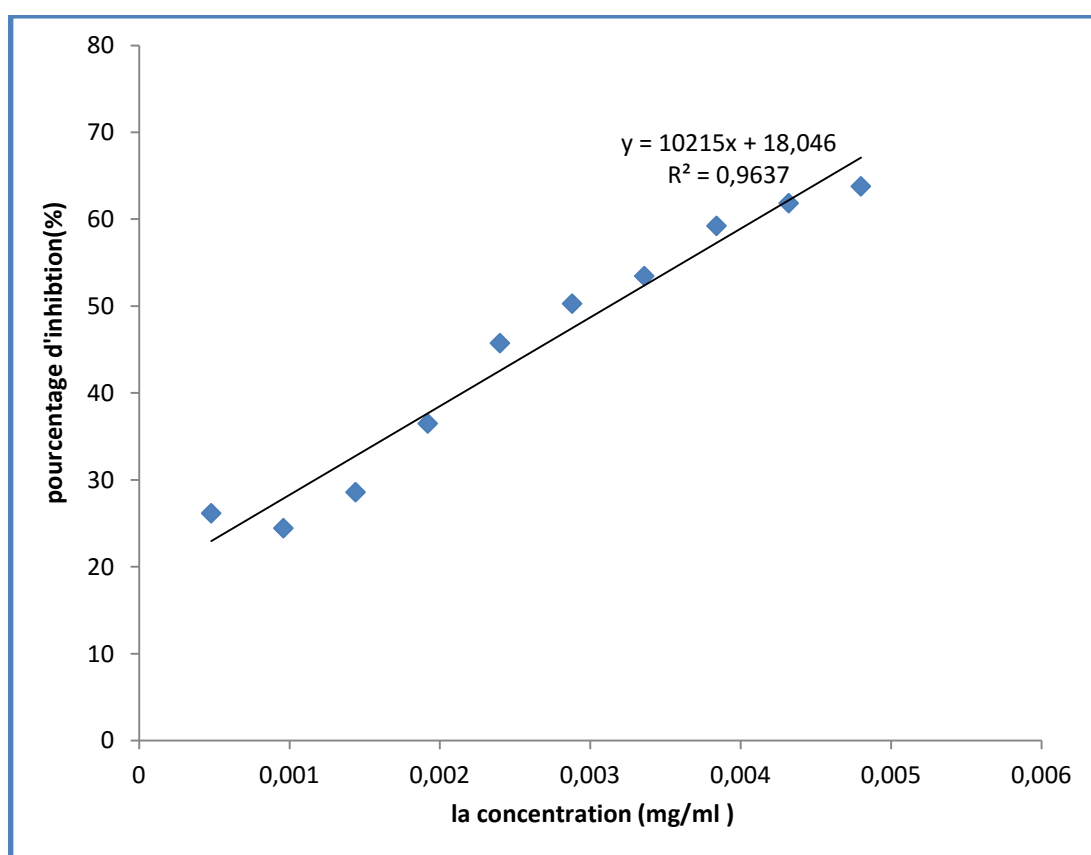


Figure III-2-4 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.

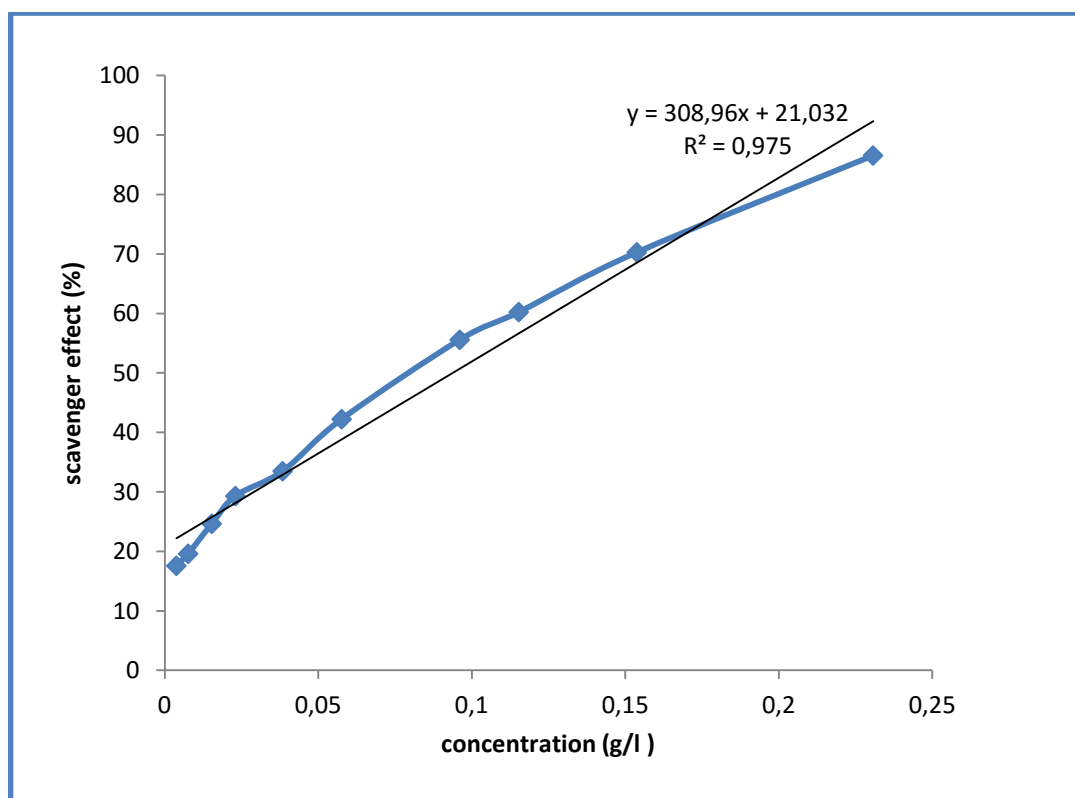


Figure III-2-5 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration du BHT.

Tableau III-2-3 : Valeurs d'IC₅₀ d'EEP et le BHT.

	EEP (mg/ml)	BHT (mg/ml)
IC ₅₀	0,0031	0,0865

Ces IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes (Figure III-2-4 et III-2-5) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Selon les équations suivantes:

Extrait d'éthanol : $Y = 10215x + 18,046$ $R^2 = 0,9637$;

BHT : $Y = 308,96x + 21,032$ $R^2 = 0,975$.

L'activité antiradicalaire de notre extrait est exprimée en IC₅₀ comme étant la concentration de substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Pour EEP la IC_{50} est déduite de la droite d'étalonnage correspondante.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus (**III-2-3**), l'antioxydant standard BHT a montré une activité antioxydante avec une IC_{50} de l'ordre de 0,0865 mg/ml. L'extrait éthanolique de la propolis de la wilaya de Bouira représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de l'ordre de 0,0031mg/ml, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique est supérieure à celle du BHT.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'existence de molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort dans l'EEP.

Selon une étude réalisée sur l'activité antioxydante de la propolis Algérienne de différentes régions (**Tableau III-2-4**), on distingue un écart remarquable comparativement avec nos résultats qui ont un pouvoir antiradicalaire plus important.

Tableau III-2-4: les différentes valeurs d' IC_{50} pour le pouvoir réducteur [7].

Echantillons		IC_{50} (mg/ml)
Montagne	Dellys	1,8
	Bouzgen	1,1
Plaine	Isser	2,2
	Mitidja	1,6
Steppe	Sahara	1,7
	Laghouat	1,2

On remarque aussi que le pouvoir antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration, ce qui a été remarqué avec le pouvoir réducteur des extraits éthanoliques ainsi que dans l'étude réalisé sur les extraits éthanolique de la propolis provenant du Portugal a montré que les valeurs obtenus d' IC_{50} sont de l'ordre de 0,006 mg/ml et 0,052 mg /ml respectivement pour la propolis de Bornes et Funddao [73].

Ces résultats, supérieurs à ceux trouvés dans notre étude, en conséquence la propolis de l'Algérie typiquement de Bouira a un pouvoir antiradicalaire plus important que les échantillons dérivent de Portugal.

À la suite des testes effectuée sur cette activité, on constate que plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

III-2-3-2- La méthode électrochimique

Méthode électrochimique de la Voltamétrie linéaire, les mesures du pic de l'oxygène prises par Voltamétrie linéaire en absence et en présence de notre extrait ont été enregistrées sous forme de voltamogrammes : Pour notre extrait ont a superposé le voltamogramme d'une seule concentration sur celui de la solution DMF seule (sans extrait) pour montrer d'une manière claire la diminution de l'O₂⁻.

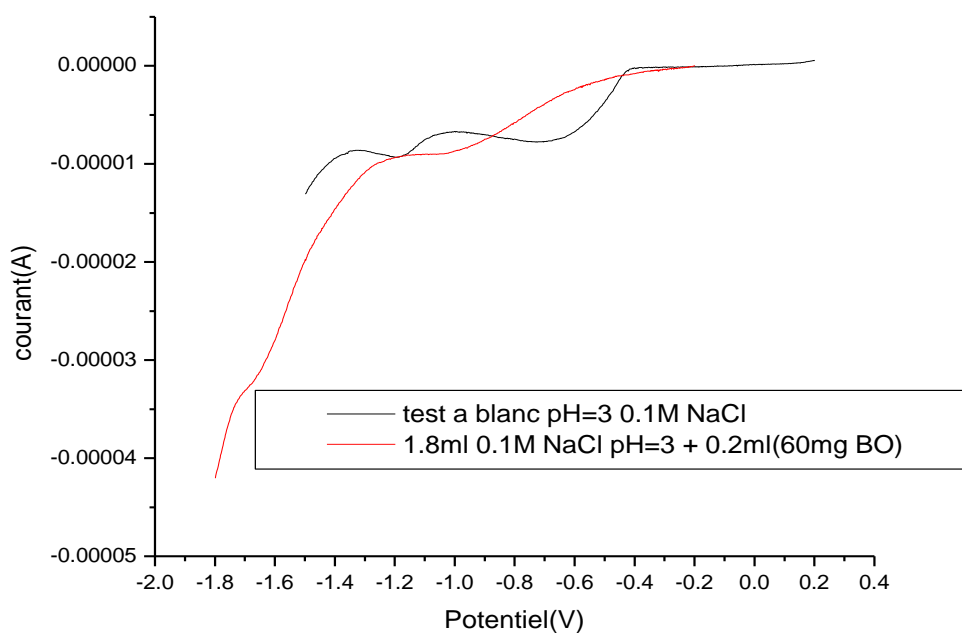


Figure III-2-6 : Voltampérogrammes linéaire de l'extrait éthanolique de la propolis a 60mg/ml.

Le domaine d'étude est limité entre -200 à -1800 mV/s pour pouvoir observer le couple redox O_2/O_2^- . On trace la courbe $I=f(E)$ du côté cathodique en fonction de la vitesse de balayage (50 mV/s), jusqu'à l'apparition clair du pic de réduction de l' O_2 , ce qui signifie que nous sommes en présence d'un transfert de charge (réaction électrochimique) démontré par une intensité de courant.

Le voltamogramme a été obtenu dans une solution saturée en O_2 qui montre l'apparition d'un pic cathodique a -200 mV/s (**Figure III-2-6**) attribué a la réduction d' O_2 (saturation avec l' O_2).

Après l'ajout de 60 mg/ml de l'extrait et en présence d' O_2 ; le courant du pic cathodique diminue. Donnant une importante diminution du pic de réduction de l'oxygène (**Figure III-2-6**). La diminution de l'intensité de courant en fonction de la concentration de l'extrait confirme l'inhibition de la réduction de l' O_2 . Ce résultat montre le caractère antioxydant de la propolis dans l'extrait.

*Conclusion
générale*

Dans le domaine de la protection biologique, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche des nouveaux traitements à base des plantes, l'étude de leurs éléments d'efficacité et la compréhension de leur mode d'action. Au cours des travaux réalisés durant ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur la propolis l'un des produits les plus complexes de la ruche.

Après une première partie consacrée aux données de la littérature concernant les structures chimiques des composés phénoliques et leurs activité antioxydante, nous nous sommes intéressés dans la partie expérimentale à la mise au point de l'extraction des composés phénoliques, la quantification de ces composés dans leurs extraits, et enfin la mesure de l'activité antioxydante des extraits par deux méthodes : la méthode de réduction de radical libre DPPH et par voie électrochimique. Pour le premier test les résultats ont montré que l'oxydation est efficacement inhibée par l'extrait testé. En effet, la capacité antioxydante est la plus élevée avec $IC_{50}=0,0031$ mg/ml, et le test par voie électrochimique, pour confirmer l'existence de l'activité antioxydante dans notre extrait.

L'étude de la quantification des composés phénolique (polyphénols et flavonoïdes) a confirmé les propriétés puissantes que possède l'extrait éthanolique de la propolis de Bouira.

Cette étude préliminaire nous confirme que la propolis est une source importante pour les antioxydants. Ces résultats nous encouragent à poursuivre les études sur les autres propriétés de la propolis.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque propolis se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de la propolis, doués d'une activité antioxydante.

Conclusion Générale

- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.

Enfin, L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue que la recherche des substances d'origine naturelle biologiquement active et d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes des extraits de la propolis.

Référence
bibliographique

- [1]: F.N. Muanda, 2010, « Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques », Thèse de doctorat, Université de Metz, France.
- [2]: J.A. Djossou¹, F.P. Tchobo¹, H. Yedomonhan, A.G. Alitonou, M.M. Soumanou¹, 2013, « Evaluation des caractéristiques physico-chimiques des miels commercialisés à Cotonou », *Tropicultura*, 31, 3, 163-169.
- [3]: F.D. Marquele, A. R.M. Oliveira, P. S. Bonato, M. G. Laraa, M. J. V. Fonseca, 2006, « Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC », *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis* 41 461–468.
- [4]: A. G. Hegaz, 1998, « Propolis an overview », *Journal bee informed*, vol 5.
- [5]: Y. Donadieu, 2008, « la propolis », édition dagles, p 96, Paris.
- [6]: Société de médecins et chirurgienne, 1820, « Dictionnaires des sciènes médicales », éditeur C.L.F panckoucke, p 418, Paris.
- [7]: F. Ferhoum, 2010, « Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis*) », Mémoire de magister, Université M'hamed Bougara Boumerdès.
- [8]: Apimondia, standing commission of apitherapy *Traité d'Apithérapie*, 2001, « La médecine par les abeilles », Produit par Api-Ar International SARL Brussels, Roumanie.
- [9]: P .Jean-Prost, 2005, « Le conte apiculteur, Connaître l'abeille, conduire le rucher », 7^{ème} édition, Tec et Doc Lavoisier, p 698.
- [10]: M. A. Cuvillier, 2015, « Miel, Propolis, Gelée royale : Les abeilles alliées de notre système immunitaire », Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Lille 2, France.
- [11]: N. Housseini, 2013, « Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire », Thèse pour le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire, Université de Nantes, Paris.
- [12]: JM .Philippe, 2007, « Le guide de l'apiculteur », édition edisud, France.

- [13]: N. Segueni, 2011, « Contribution a l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis », Thèse de Doctorat, Université de Mentouri de Constantine.
- [14]: M. Mutsaers, H. V. Blitterswijk, V. Leven, J. Kerkvliet, J. V. De waerdt, 2005, « Produits de l'apiculture : propriétés, transformation et commercialisation », 1^{ère} édition, p 57-58, Pays-Bas
- [15]: S.I. Domingues, 2013, « Chemical composition of Portuguese propolis bioactive properties », Thesis of the requirements for the degree of doctor, University of Porto, France.
- [16]: J. Nicolaÿ, 2014, « Perspectives d'avenir en Apithérapie à l'officine », Thèse Pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Angers, France.
- [17]: D. Richard, 2013, « la bible de l'apiculteur : abeilles, miels, et autres produit », Paris.
- [18]: M.Biri, 2010, « Tous savoir sur les abeilles et l'apiculteur », 7^{ème} édition, p 96-97.
- [19]: N. Bradbear, 2010, « Le rôle des abeilles dans le développement rural », FAO, p 137, Rome.
- [20]: F. Lacharme, 2011, « Les produits cosmétiques biologiques : labels, composition et analyse critique de quelques formules », Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie, Université Joseph Fourier, France.
- [21]: M .A. Grandsagne, « Histoire naturelle de Pline », p 87, Paris.
- [22]: A .D. Razafindrazaka, 2010, « Potentialités et contraintes de la filière apicole dans le district de manakara région vatovavy fitovinany », Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies en sciences de la vie, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- [23]: R. Krell, 1996, « Value-edded products from beekeeping », FAO of the United Nations Rone, Bulletin, n°124.
- [24]: W. Król, V. Bankova, J. M. Sforcin, E. Szliszka, Z. Czuba, A. K. Kuropatnicki , 2013, « Propolis: Properties, Application, and Its Potential », edition torial, ecam 807578.pdf.
- [25]: N. Pujirahayu, H. Ritonga, Z. Uslinawaty, 2014, « Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis », International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 6, Issue 6.

- [26]: A. Drancy, 2015, « Le Tao du Pollen et L'Art des aiguilles et du Feu », Mémoire de fin d'études, Centre Imhotep.
- [27]: M. Juminer, « La propolis verte du Brésil », Mémoire fin de cycle 1 Apithérapie.
- [28]: M. Gharbi, 2011, « Les produits de la ruche : origines - fonctions naturelles – composition propriétés thérapeutiques apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire », Thèse de doctorat, Université Claude-Bernard - Lyon I, France.
- [29]: E. Nkhili, 2009, « Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant », Thèse de doctorat, Université de Marrakech, Maroc
- [30]: M.I .Benslimane, M. T .Bouras, 2010, « Quantification des principes actifs et évaluation du pouvoir antioxydant de L'Acacia arabica », Mémoire de fin d'étude pour l'obtention de diplôme d'ingénieur d'état, Université Kasdi Merbah Ouaregla.
- [31]: A. Zine el abidine, 2009, « Caractérisation pharmacotoxicologique et étude photochimique de : Centaurea dimorpha », Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de magister, Université Mentouri Constantine.
- [32]: N. Eon, 2011, « De la fleur a l'abeille, da l'abeille au miel, de miel a l'homme : Miel et autres produits de la ruche », Thèse de doctorat, Université de Nantes, France.
- [33]: M. Guillon-Legendre, 2010, « L'Apithérapie », Hypocratus formation conseillère en phyto aromatique, 81160 Saint Jury.
- [34]: M. Blanc, 2010, « Propriétés et usage médical des produits de la ruche », Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université de Limoges, France.
- [35]: M. Marcucci, 1995, « Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity », Brazil.
- [36]: S. Bogdanov, 2015, « Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review », article propolis book review.
- [37]: J-L.Fargier, 2011, « l'Apithérapie », Université d'été des biosciences, Toulouse.
- [38]: P. Premratanachai, C. Chanchao, 2014, « Review of the anticancer activities of bee products », Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, journal homepage.

- [39]: A. A .Hemmati, N .Sistani Karampour, L. Hadisi , N .Tavakolbekhoda, 2013, « Effect of propolis hydroalcoholic extract on formalin- induced inflammation in male rat paw », Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences ,Volume 4 Issue 3 .
- [40]: N. Cardinault, M.-O. Cayeu, P. Percie du Sert, 2012, « Biothérapie la propolis : origine, composition et propriétés », DOI 10.1007/s10298-012-0733-y Article de synthès. *Phytothérapie* 10:298–304.
- [41]: K. Ghedira, P. Goetz, R. Le jeune, 2009, « Propolis. *Phytothérapie* », 7: 100 105.
- [42]: A. Derevici, A. Popesco, N. Popesco, 1964, « recherches sur certaines proprietes biologiques de la propolis », Laboratoire central de contrôle des produits alimentaires, Bucarest (Romanie), 7 (3), p.191-200.
- [43]: F. Arianne, 2010, « Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp, un champignon pathogène en aquaculture », Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science en Microbiologie et Immunologie , Université de Montréal, France.
- [44]: E. Strehl. Volpert, E, F. Elstner, 1994, « Biochemical activities of propolis extract », *Z, Naturforsch C*, 49(1-2): 39-43.
- [45]: W .Krol , Z .Czuba , S. Scheller , J. Gabrys , S. Grabiec and J. Shani , 1990, « Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence ce oxidation of luminal », *Biochem Int* , 21(4): 593 .
- [46]: SN .Jeng, MK .Shih, CM .Kao, TZ .Liu, SC. Chen (2000), « Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens », *Food Chem Toxicol*, 38, 893-7.
- [47]: A .Hartwich, J. Legutko, J. Wszolek, 2000, « Propolis: its properties and administration to patients treated for some surgical diseases », *Przegl Lek*, 57, 191-4.
- [48]: H. Abdessemed, 2010, « Etude de l'activite biologique des extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. », Mémoire de magister, Université Al –hadj Lakhedar Batena.
- [49]: N. Zeghad, 2009, « Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne », Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister, Université Mentouri Constantine.

- [50]: S. Maamri, 2008, « Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens », Mémoire de magister, Université de Boumerdès.
- [51]: A .Djeridane, M.Yous, B.Nadjemi, D.Boutassouna, P.Stocker, N. Vidal, 2006, « Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds», Food Chem. 97: 654 -660.
- [52]: K. Boudiaf, 2006, « Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti - radicalaires des extraits des graines de Nigella sativa », Mémoire de magister, Sétif.
- [53]: S .Athman, 2009, « Etude quantitative des flavonoides des graines de cuminum cyminum et les feuilles de rosmarinus officinalis et l'évaluation de l'activité biologique », Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de magister, Université El-hadj Lakhdar-Batna.
- [54]: J. Javanmardi, C. Stushnoff, E.Locke, J. M. Vivanco, 2003, « Antioxidant activity and total phenol content of Iranian Ocimum accession », Food Chemistry, 101: 410 – 550.
- [55]: F. Marc, A. Davin, L. Deglene-benbrahim, C. Ferrand, M. Baccaunaud, P. Fritsch, 2004, « Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments », Médecine/sciences, 54, 458 – 63.
- [56]: Z .Hadbaoui, 2007, « Etude de l'activité antioxydante des fraction lipidique, protéique et phénolique des graines de sogho local », Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de magister, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [57]: C. Boubekri, 2014, « Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques », Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences, Université Mohamed Khider Biskra.
- [58]: V. Bondet, W.Brand-williams, C. Berset, 1997, « Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method », Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie /Food Science and Technology, 30, 609e615.
- [59]: W.Boussebaa, 2012, « Contribution à l'étude antioxydante et l'étude de structure-activité de quelques dérivés dithioliques », Mémoire Présenté pour l'obtention du diplôme de magister, Université Kasdi Merbeh Ouargla.

- [60]: J. Holler, A. Douglas, Skoog, M .Donald, F .West, « Chimie analytique», 7^{ème} édition, American, p 462.
- [61]: T. Midoun, 2011, «Extraction des composés phénoliques et étude leurs activités antioxydantes par la voltamétrie cyclique », Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [62]: Y. Dandeville, 2012, « Analyse thermique et électrochimique de supercondensateurs carbone-MnO₂ en milieu aqueux », Université de Nantes, France.
- [63]: F. Rouessac, A. Rouessac, 2004, « Analyse chimique », 6^{ème} édition, © Dunod, Paris.
- [64]: B. Monpon, B .Lemair, P. MengaL, M .Surbled, 1996, « Extraction des polyphénols : de laboratoire à la production industrielle », In « polyphénols 96 », édition Inra Bordeaux, France.
- [65]: L. C. Paviani, G. Fiorito, P. Sacoda, F. A Cabral, 2013, «Different solvents for extraction of Brazilian green propolis: composition and extraction yield of phenolic compounds », III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia).
- [66]: A .Tosi enzo, M.C Ciappini, Cazzolli, F .Ampelio, Tapiz, M .Luis, 2006, « Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina) », APIACTA 41 ,p110-120, Argentine.
- [67]: A.H Banskota, Y. Tezuka , I .Ketut adnyana, K. Midorikawa, Katsushige, D. Message, A.A.Huertas, S.Kadota , 2000,« cytotoxique,hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China », Journal of Ethnopharmacology 72 (200) 239 – 246.
- [68]: N.Mezzomo, S. R. Ferreira, 2012, « Extraction of Mentha spicata L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition », Food and Bioprocess Technology.
- [69]: A .Meziti, 2009, « Activité antioxydante des extraits des graines de Nigella sativa Étude in vitro et in vivo », Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister, Université El-haj Lakhdar Batna.
- [70]: V .L. Singleton, J .A. Rossi,1965 ,« Colorimetry of total phenolics with phosphomolydic- phosphotungstic acid reagents, University of California, Davis, CA, Amer, Journal .Enol.Viticult.16 : 144-58.

- [71]: F. D. Marquele, V. M. Di mambro, S. R. Georgette, R. Casagrande, Y M. Valim, M- J V. Fonseca, 2005 , « Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 455–462.
- [72]: L. Paviania, P. Sacodaa, E. Saitoa, F. Cabrala, « Extraction techniques of red and green propolis: extraction yield of phenolic compounds », *Departament of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, Brazil*.
- [73]: Leandro M, Luis G, Diase, José Alberto Pereira, Leticia Estevinho, « Antioxydant properties, total phenol and pollen analysis of propolis samples from Portugal », *Food and Chemical toxicology* 46 (2008) 3482 – 3485, 2008.
- [74]: N. Kalogeropoulos, S. J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou, V.T.Karathanos, 2009,« Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus » , *Food Chemistry*116 452–461 *Journal homepage* .
- [75]: M .Popova , V. Bankova , D. Butovska, V. Petrov, B. Nikolava-damyanova, A.G Sabatini, G.L Marcazzan, S. Bogdanov , 2004,« Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis », *Phytochem. Anal*, 15, 235–240.
- [76]: G. Valenzuela-barra, C. Castro, C. Figueroa , A. Barriga , X. Silva , B. Delas heras , S.Hortelano , C. Delporte ,2015 ,« Anti inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile », *Journal of Ethnopharmacology* 168 37–44.
- [77]: C. Chia-chi, Y.Ming-hua , W. Hwei-mei, C. Jiing-chuan, 2002, « Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods », *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 3, p 178-182.
- [78]: A. Mok-ryeon , S. Kumazawa , Y. Usui , J. Nakamura , M. Matsukab , F. Zhu , T. Nakayama , 2006, « Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China» ,*Food Chemistry* 101 1383–1392 .
- [79]: D. Huang, B. OU, R.L. Prior, 2005, « The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841-1856.

Référence Bibliographique

[80]: P. Molyneux, 2004, « The use of the stable free radical diphenyl picryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakarín », *Journal of science technology*, 26 (2): 211- 219.

Résumé

La présente étude porte sur la caractérisation physico-chimique de la propolis locale, cette fameuse matière est très précieuse à cause de ses propriétés thérapeutiques qui sont liées directement à sa composition.

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante par le biais de deux méthodes : La méthode au DPPH et la méthode électrochimique, de l'extrait (EPP) de la propolis de la wilaya de Bouira.

Nous avons tout d'abord procédé aux dosages quantitatifs colorimétriques par un spectrophotomètre UV -Vis des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols.

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ ont révélé la richesse de la propolis en polyphénols ($113,44 \pm 0,0069$ mg EAG/g d'EEP) et en flavonoïdes ($28,78 \pm 0,0083$ mg EQ/g d'EEP).

L'expression des résultats de l'activité antioxydante a montré que l'extrait de la propolis était plus actif, comme agents antioxydants. Dans le pouvoir antiradicalaire au DPPH l'extrait EEP a montré l'activité anti-oxydante la plus élevée a $IC_{50}=0,0031$, a présenté une activité anti-radicalaire plus élevée que celle du BHT ($IC_{50}= 0,0865$), et le test électrochimique a confirmé l'activité antioxydante.

Mots clés : Propolis de Bouira, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante.

Abstract

The aim of this study is the physicochemical characterization of the Algerian propolis, this famous product which is very valuable because of its therapeutic properties directly related to its composition.

This work aims at evaluating the antioxidant activity of a propolis of Bouira by the means of two assays: The DPPH assay and the electrochemical assay.

First, we carried out colorimetric quantification by the spectrophotometer UV-Vis of total polyphénols as well as the flavonoids being the most important class of the family of polyphénols.

The quantification of total polyphénols using the Folin-Ciocalteu method and of the flavonoids using the $AlCl_3$ method revealed the richness of the propolis in polyphénols ($113,44 \pm 0,0069$ mg EAG/g of EEP), and in flavonoides ($28,78 \pm 0,0083$ mg EQ/g of EEP).

The expression of the results of the antioxidant activity showed that the extracts of the propolis were more active as antioxidant agents.

In the DPPH test, the EEP of the propolis displayed a very high antioxidant activity ($EC_{50}=0,0031$), have shown a radical -scavenging activity overpassing that of the BHT ($EC_{50}= 0,0865$), and the electrochemical test, confirmed the antioxidant activity.

Key words: Propolis of Bouira, polyphénols, flavonoides, radical -scavenging activity.

المخلص

يتميز العكبر (propolis) بخصائصه العلاجية الفعالة و التي لها علاقة مباشرة مع مكوناته الكيميائية المتعددة. ان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المتأكسد بواسطة طريقتين: الطريقة النشاطية الازاحية تجاه جذر DPPH والطريقة الكهروكيميائية لمستخلص الايثانول للعكبر لولاية البويرة. قمنا أولا بإجراء تقدير كمي بواسطة مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية للفينولات وكذلك الفلا فونويدات على أساس أنها أهم قسم من العائلة الفينولية. التقدير الكمي للفينولات بواسطة طريقة folin-ciocalteu و الفلا فونويدات بواسطة طريقة $AlCl_3$ بينت غنى العكبر بالفينولات ($113,44 \pm 0,0069$ mg EQ/g d'EEP), وكذلك بالفلا فونويدات ($28,78 \pm 0,0083$ mg EAG/g d'EEP). نتائج النشاط المضاد للتأكسد أوضحت أن مستخلص الايثانول للعكبر كانت فعالة كعامل مضادة لتأكسد. طريقة النشاطية الازاحية تجاه جذر DPPH بينت أن مستخلص الايثانول للعكبر تميز بنشاط مضاد للأكسدة ($EC_{50}=0,0031$) أعلى من BHT ($IC_{50}= 0,0865$) وفي ما يخص الطريقة الكهروكيميائية فقد استعملناها للتأكيد علي وجود النشاط المتأكسد في مستخلص الايثانول للعكبر.

الكلمات الدالة: العكبر, الفينولات, الفلا فونويدات, طريقة النشاطية الازاحية.