

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
Et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel  
Faculté des Sciences  
Département de microbiologie et biochimie

118-14/04

01  
03

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme  
D' études Supérieures en Biologie  
Option : Microbiologie

Thème



Etude de l'activité  
antibactérienne de la propolis

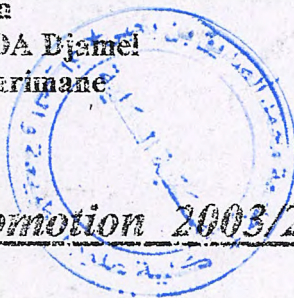
Membres de jury :

Président : M<sup>me</sup> ROULA Sadja  
Examinateur : M<sup>or</sup> BOUDJERDA Djamel  
Encadreur : M<sup>elle</sup> SEGUENI Narimane

Réalisé par :

BENASKEUR Naima  
BOUMELTA Fatima zohra  
BOUTEMINE Radia

Promotion 2003/2004



## **\*\* REMERCIEMENT \*\***

*Nous remercions dieu qui nous a donné du courage et de la volonté*

*D'avoir réussi dans nos études.*

*Nous tenons à remercier toute personne qui a contribué de loin ou de près à*

*la réalisation de ce mémoire, plus particulièrement :*

*Notre encadreur M<sup>elle</sup>. SIGUENI NARIMANE qui nous a proposé ce*

*sujet de recherche, et qui nous a encadrée et soutenue par*

*ses conseils, sa compréhension, sa gentillesse, ses*

*encouragements et sa bibliographie.*

*Nous remercions également l'équipe du laboratoire de biologie pour*

*Leur aide et leur soutien.*

*Nous remercions les membres des jurys de bien vouloir examiner et critiquer*

*le contenu de notre mémoire.*

*Enfin notre respect à tous les enseignants de l'institut de biologie de*

*l'université de Jijel.*

*ainsi Razika et son frère*

# Introduction

# Sommaire

Introduction ..... 01

## I-Analyses bibliographique

1-La propolis .....	02
1-1-Définition .....	02
1-2- Origine .....	03
1-3- La récolte de la propolis .....	03
1-3-1- par l'abeille .....	03
1-3-2- par l'apiculteur .....	03
1-4- Propriétés physico – chimiques.....	04
1-5- Propriétés Pharmacologiques et biologiques.....	05
1-5-1- Propriétés antibactériennes .....	05
1-5-2- Propriétés antifongiques .....	06
1-5-3- Propriétés antivirales .....	06
1-5-4- Propriétés antigermenatives .....	06
1-5-5 - Propriétés antioxydantes .....	06
1-5-6- Propriétés immunitaires. ....	07
1-5-7- Propriétés canticancéreux .....	07
1-5-8- Propriétés cicatrisantes .....	07
1-5-9- Propriétés Anesthésiques.....	07
1-5-10- Propriétés cardiovasculaires .....	07
2-Les flavonoides .....	09
2-1- Définition .....	09
2-2- Origine .....	09
2-2-1- Origine végétale .....	09
2-2-2-Origine animale .....	10
2-3- Structure générale .....	10
2-4-Clasification .....	10
2-5-La Biosynthèse .....	12
2-6- Intérêt des flavonoides .....	14
2-6- 1- Intérêt biologique .....	14

* Pouvoir Pathogène .....	21
* Caractères biochimiques .....	22
<i>II- Matériels et méthodes</i> .....	23
1- Etude du profil chimique .....	23
1-1-Extraction .....	23
1-2-Séparation des flavonoides .....	23
1-2-1- Chromatographie sur papier .....	24
* Relation fluorescence-structure .....	24
* Relation RF-structure .....	25
1-2-2- Chromatographie sur couche mince .....	26
2- Etude de l'activité antibactérienne .....	26
* Préparation des disques .....	27
* Réalisation de l'antibiogramme .....	27
<i>III – Résultats et discussions.</i> .....	29
<i>III -1- Résultats</i> .....	29
1- Etudes du profil chimique .....	29
1-1-Extraction .....	29
1-2-Séparation des flavonoides .....	29
2- Evaluation de l'activité antibactérienne .....	30
2-1- Souches de références .....	31
2-2- Souches pathogènes .....	35
<i>III- 2-Interprétation</i> .....	39
1-Etude du profil chimique .....	39
* Chromatographie sur papier .....	39
* Chromatographie sur couche mince .....	39
2-Etude de l'activité antibactérienne .....	41
* Souches de référence .....	41
* Souches pathogènes .....	41
<i>Conclusion</i> .....	43

Références Bibliographiques .

Annexe .

* Rôle attractif.....	14
* Rôle protecteur.....	14
2-6-2- Intérêt pharmacologique.....	14
* Activité antibactérienne.....	14
* Activité antifongique .....	15
* Activité antivirale .....	15
* Activité antioxydant .....	16
* Activité antitumorale.....	16
* Activité anti-inflammatoire .....	16
* Activité antidiabétique.....	16
2-6-3- Intérêts physiologiques.....	17
3-Les germes testés.....	18
3-1-Formes bacillaires .....	18
3-1-1- <i>Escherichia -coli</i> .....	18
* habitat .....	18
* Pouvoir Pathogène .....	18
* Caractères biochimiques.....	18
3-1-2- <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	19
* habitat .....	19
* Pouvoir Pathogène .....	19
* Caractères biochimiques .....	19
3-1-3- <i>Enterobacter</i> .....	19
* habitat .....	19
* Pouvoir Pathogène .....	20
*Caractères biochimiques .....	20
3-1-4- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ... ..	20
* habitat .....	20
* Pouvoir Pathogène .....	20
* Caractères biochimiques .....	21
3-2- Formes coccoides .....	21
3-2-1- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
* habitat .....	21

## ***Introduction :***

A l'origine , le mot antibiotique désigne toute substance produite par un micro-organisme (bactérie ou champignon) ou obtenue par synthèse chimique, capable d'inhiber la croissance ou de détruire d'autres micro-organismes [36 ].

Les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur toutes les espèces bactériennes.

Le spectre d'activité d'un antibiotique est une notion théorique qui dépend de la résistance naturelle des souches dites " sauvage " . Mais diverses variations génotypiques peuvent entraîner une résistance acquise de ces souches dont la fréquence peut augmenter considérablement avec l'usage abusif des antibiotiques.

La découverte d'un nouveau antibiotique peut se faire soit par la voie chimique (synthèse organique) soit par la voie biologique (phytochimie et test de l'activité biologique).

Beaucoup de chercheurs dans le monde entier sont retournés vers la nature pour la découverte de nouveaux principes actifs moins toxique comme les huiles essentiels , les alcaloïdes , et les flavonoïdes .

De nombreux travaux ce sont intéressés à la propolis. Cette substance essentiellement composé de flavonoïdes est étudiée scientifiquement pour déterminer ses vertus dans le cadre de la santé.

De nos jours les flavonoïdes , substances d'origine animale ou végétale sont largement étudiés dans le domaine médical ou on leurs reconnaît plusieurs activité pharmacologique : activité antibactérienne , activité antivirale , activité antifongique et activité antioxydante.

Notre étude a été réalisé sur des propolis provenant de deux régions de Jijel : Djerna et kaous .

Nous nous sommes intéressés aux profil chimique et à l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces propolis .

# **ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# La propolis



## 1-La propolis:

### 1-1-Définition:

La propolis est une substance résineuse , gommeuse balsamique translucide et très collante , recueillie par les abeilles sur certaines parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certaine arbre [46] . C'est une substance essentielle à la vie de la ruche que les abeilles utilisent à de nombreux fins :

- Pour construire une véritable barrière de défense située en arrière du trou de vol destinée à contrôler l'arrivée d'éventuels ennemis , et à laquelle la propolis doit son nom .

- Pour colmater et obstruer fentes et fissures , afin de rendre la ruche bien hermétique avec la meilleure isolation thermique possible .

- Pour réduire de façon plus ou moins importante l'ouverture du trou de vol en fonction des variations climatiques.

- Pour réparer les rayons en mauvais état et consolider en général tout ce qui paraît aux abeilles d'une solidité douteuse .

- Pour vernir l'ensemble des surfaces intérieures de la ruche afin d'en supprimer les aspérités.

- Pour recouvrir d'une très fine pellicule les nouveaux rayons ainsi que l'intérieur des cellules avant que la reine ne vienne y pondre , ce qui constitue une désinfection efficace ( sorte de stérilisation) .

- Enfin pour enduire et recouvrir totalement , combinée avec de la cire , les petits animaux ou insectes ayant pénétré dans la ruche et qui , après avoir été tués ne peuvent pas être évacués au dehors par les abeilles , véritable embaumement qui s'oppose à tout processus de décomposition putride qui mettrait la vie de la ruche en grand danger [ 41].

## 1-2-Origine :

La propolis a pour origine principale certains arbres. Les principales essences d'arbres connues pour être productrices de cette substance sont représentées par différents conifères : plusieurs espèces de peupliers qui semblent être la source la plus importante [ 43 ].

Les différentes origines de la propolis expliquent sa grande variabilité de couleur et d'odeur ainsi que l'inconstance de son activité biologique [ 8 ].

## 1-3-La récolte :

### 1-3-1-Par les abeilles :

Au niveau de la ruche, la récolte de la propolis est faite par un nombre relativement restreint d'abeilles ouvrières butineuses spécialisées sans cette activité. Elle a lieu au début du printemps , mais le plus souvent à l'approche de l'automne ou la colonie commence ses préparatifs d'hivernage . Il faut cependant que les journées soient encore chaudes , et c'est au moment où le soleil et le plus chaud que les abeilles l'exploitent le plus car la propolis est alors tendre et malléable .

La butineuse attaque d'abord cette substance avec ses mandibules, puis étire la particule saisie jusqu'à la rompre , et elle constitue progressivement une petite pelote de propolis légère qu'elle entasse dans ses pattes postérieures (3<sup>ème</sup> paire) puis elle la ramène à la ruche où des abeilles magasinères vont la stocker ou l'utiliser immédiatement s'il y a nécessité de le faire [ 45 ].

### 1-3-2-Par l'apiculteur :

On peut produire expérimentalement de la propolis en introduisant une planche non rabotée dans la ruche. La récupération s'effectue facilement en raclant le bois avec un couteau à mastic . Il est préférable d'opérer par température assez basse , la propolis se détachant et se cassant plus facilement . Ce procédé a pour inconvénient de fournir une propolis souillée qu'il faut purifier par la suite .

On peut aussi récolter la propolis en utilisant différents dispositifs ( grilles moulées en matière plastique souple ou en bois par exemple ) qui permettent une récolte facile de propolis pauvre en cire et en impuretés , donc de bien meilleure qualité [ 4 5 ].

#### **1-4-Propriété physico-chimique :**

La couleur de la propolis est très variable selon sa provenance , elle varie du jaune claire au noir avec tous les intermédiaires de bruns : brun – jaune , brun –vert , brun –rouge ...etc. Son odeur est variable selon son origine ; en général agréable et douceâtre , mélangée à celui du miel , de la cire et d'autres produits ( cannelle de vanille). Sa saveur est souvent acre , parfois amère [ 44 ].

Le point de fusion de la propolis est variable. Il se situe vers 60-70°C en moyenne mais peut atteindre 100° et plus . A 15 °c , la propolis est dure , friable et très malléable. Aux alentours de 30°C elle devient gluante.

La structure microscopique de la propolis est maintenant assez bien connue grâce à un récent et important travail de Collette JEANSON et Philippe MARCHENAY , réalisé au microscope électronique à balayage à sonde , et portant sur des échantillons en provenance de la France entière. leurs résultats montrent que l'on retrouve toujours les même microstructures cela prouve d'après ces auteurs , le rôle très important des abeilles ouvrières dans la formation de la structure de cette substance .

La propolis est insoluble dans l'eau mais un mélange approprié de solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants. Les solvants les plus utilisés sont : l'éther , l'éthanol , L'ammoniaque , l'acétone , le benzène et le trichloréthylène

Les constituants de la propolis solubles dans les solvants organiques se divisent en matière cireuses (en moyenne 30% )et en brunes et huiles essentielles (en moyenne 60%) [8 ].

La composition chimique de la propolis est très variable , mais elle présente tout de même qualitativement des éléments stables et constants, constance vérifiée et confirmée par des travaux d'analyse chromatographique effectuée par POPRAVKO. SA sur de très nombreux échantillons [41].

La majorités de ces composants se trouvent dans le tableau -1.

**Tableau-1: Composition chimique de la propolis [44].**

<i>Composition en ordre</i>	<i>Composition par groupes</i>	<i>Quantité</i>
Résines	Flavonoïdes , acides phénoliques et esters	45-55%
Cire et acide gras	Cire d'abeille et de plantes	25-35%
Huiles essentielles	Composés Volatils	10%
Pollen	Protéines ( 6 acides aminées libre > 1%) Arginine et proline jusqu'à 46% du total	5%
Autre composées et minéraux	-14 traces de minéraux , silice et zinc sont les plus communs - cétones, lactones, quinones, stéroïdes , acide benzoïque , vitamines et sucres	5%

### **1-5-Propriétés pharmacologiques et biologiques :**

La propolis possède un large spectre d'activité biologique, son action pharmacologique prédominante est sans conteste l'action antimicrobienne.

#### **1-5-1-Propriétés antibactériennes :**

Kilvakina (1948) et Hambleton (1956) ont mis en évidence les propriétés antibactériennes de la propolis. Vergé (1951) dans ses travaux a démontré la grande sensibilité des staphylocoques blanc et doré, du bacille pyocyaniques de bacillus subtilis alvei , et de bacillus prodigiosus pour la propolis .Cette dernière ne semble avoir aucune action contre toute une série de salmonelles et d'Escherichia.

Plusieurs travaux ont démontré que l'activité antibactérienne de la propolis dépend de son origine [5].

### **1-5-2- Propriétés antifongiques :**

Cizmark et Trupl ont étudié l'action de la propolis sur différentes levures. Il ressort des résultats de cette étude que la propolis exerce une nette inhibition sur le développement de ces levures ainsi que les moisissures ( pénicilline , pericystis apis ) [ 5 ].

### **1-5-3- Propriétés antivirales :**

Jusqu'à présent peu de travaux ont été publiés sur les propriétés antivirales de la propolis. Néanmoins des expériences intéressantes ont été réalisées par V.Bojnansky et V. Koslja-Rova en 1972 sur des virus pathogènes de plantes.

Les premières expériences ont porté sur trois espèces de virus : virus de la mosaïque du concombre provenant de *Phytolacca americana* , virus des taches du tabac et celui de la nécrose du tabac provenant d'*Evonymus europaea* qui semble être le plus sensible [ 8 ].

### **1-5-4- Propriétés antigerminatives :**

De nombreuses expériences ont montré l'action inhibitrice de la propolis sur la germination de certains végétaux et tout spécialement sur le chanvre, la laitue et la pomme de terre. Propriété qui pourrait bien avoir un jour ou l'autre des prolongements dans le cadre de l'alimentation [ 5 ].

### **1-5-5- Propriétés antioxydantes :**

Les flavonoïdes concentrés dans la propolis ont un énorme pouvoir antioxydant, et ils sont capables de détruire les anti-radicaux en protégeant les lipides et autres substances comme la vitamine C [44].

### **1-5-6-Propriétés immunitaires :**

La propolis possède des propriétés qui semblent influencer favorablement certains processus immunologiques par stimulation directe en favorisant la phagocytose et la formation d'anticorps, et indirecte en augmentant la résistance globale du terrain biologique vis – à – vis de l'agression en générale [41].

### **1-5-7-Propriétés anticancéreuses :**

L'extrait de la propolis est capable de transformer les cellules humaines de l'hépatite et du carcinome mais aussi de les inhiber. Cette substance a également démontré une activité cytotoxine et cytostatique chez les rats infectés de cellules cancéreuses des ovaires et de tumeur du sarcome [ 44].

### **1-5-8-Propriétés cicatrisantes :**

La propolis possède un effet stimulant sur le métabolisme cellulaire, la circulation , et la formation du collagène et au même temps répare l'épiderme abîmé par la régénération des tissus . Ces propriétés sont dues à la présence de l'arginine (flavonoïdes) dans la propolis [44].

### **1-5-9- Propriétés Anesthésiques :**

Prokopovich a étudié l'action anesthésique locale de la propolis sur la cornée de lapin. Cette étude a démontré que cette résine est trois fois plus anesthésique que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine [8].

### **1-5-10-Propriétés cardiovasculaires :**

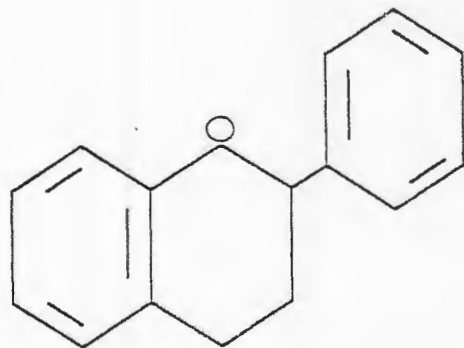
Les concentrations importantes d'extrait de la propolis diminuent la tension sanguine et produisent un effet sédatif en maintenant le niveau du glucose dans le sang .Les dihydro flavonoides , contenus dans la propolis renforcent les capillaires et produisent une activité antihyperlipidique [ 45].

De plus la propolis possède des propriétés anti-inflammatoires,

antirhumatismales , une action sur le métabolisme des neurones , un effet sur les maladies dentaires et certaines maladies broncho-pneumopathiques. La propolis comme tous les produits élaborés ou récoltés par l'abeille est utilisée en cosmétologie [ 41 ].



# Les flavonoïdes



## 2- Les flavonoïdes

### 2-1-définition:

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels de la famille des polyphénols [ 17 ].

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux presque toujours hydro- solubles .Ils sont responsables de la coloration des fleurs des fruits et parfois des feuilles. Les flavonoïdes peuvent être de couleur jaune (chalcones, aurones , et flavonols), rouge (anthocyanosides) , bleu ou violette . Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigmentants, comme les flavones et flavonols incolores qui pigmentent et protègent 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 d'assurer le transport du pollen, condition nécessaire à la survie de l'espèce végétale [ 4 ].

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifier. Ces substances issues du métabolisme des plantes sont intéressantes à étudier du fait de leurs petits poids moléculaires et de leurs accumulations en quantités extrêmement faibles [ 34 ].

### 2-2-Origine :

#### 2-2-1- Origine végétale :

Les flavonoïdes sont présents d'une manière générale dans toute les plantes vasculaires (végétaux supérieurs) . Ils sont localisés dans divers organes racines, tiges, feuilles ,bois, pollens, nectar, écorce , graines, fleurs et fruits[16 ].

Les anthocyanes qui sont des flavonoïdes glycosides sont retrouvés dans les baies des fruits rouges (cassis ) myrtilles , mures , raisins noirs . Enfin la présence de flavonoïdes chez les algues n'a pas été démontrée [3].

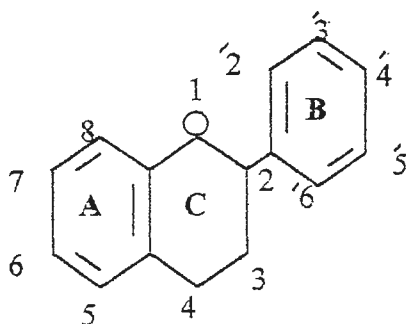
### 2-2-2- Origine animale :

Le monde animale est très concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, la quercétine et la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa, le sapin, le saule, l'orme, et la modifient par leurs enzymes salivaires [16].

Ils peuvent également se trouver dans les glandes à sécrétion odoriférante du castor [27].

### 2-3 – Structure générale :

Quelques années après la découverte des flavonoïdes, les progrès de la biochimie permettaient de décrire leurs structures moléculaires. Ces composés possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en  $C_6$  (A et B) relié par une chaîne en  $C_3$  (C) représenté dans La figure -1 -

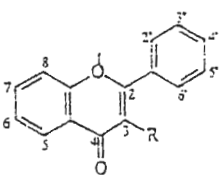
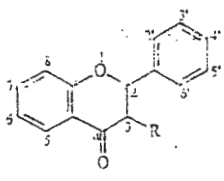
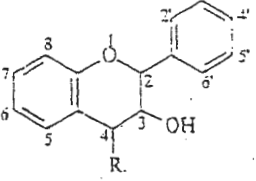
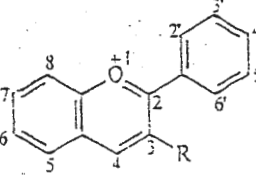
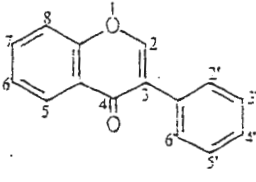
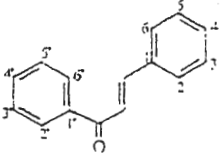
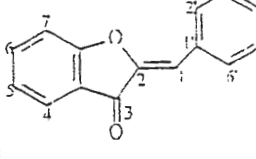


*Figure 1 : Structure générale des flavonoïdes [29].*

### 2-4 – Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances très répandues à l'état naturel. Les différentes classes des flavonoïdes sont représentées dans le tableau -2 -

**Tableau (2) : Les différentes classes des flavonoïdes [26].**

DIFFERENTES CLASSES		PRINCIPALES SUBSTANCES		
DERIVES	STRUCTURE	NOM DE FAMILLE	HYDROXYLATION	NOM
Phényl-2 chromones		R=H Flavone	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apéginine Luteoline
		R=OH Flavonol	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Kaempférol Quercétine
		R=H Flavanone (dihydroflavone)	5, 7, 4' 7, 3', 4'	Naringénine Butine
		R=OH Flavanonol (dihydroflavonol)	7, 3', 4' 5, 7, 3', 4'	Fustine Taxifoline
Phényl-2 chromanes		R=H Catechine (flavanol-3)	5, 7, 3', 4', 5' 5, 7, 3', 4'	Gallocatechine Catechine
		R=OH Leucoanthocyanidine (flavandiol-3,4)	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Leucocyanidine Leucodelphinidine
Flavyliums		R=H Flavylium (Anthocyane)	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'	Apigénidine Luteolidine
		R=OH Anthocyanidine	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'	Cyanidine Delphinidine
Phényl-3 chromone		Isoflavone	7, 4' 5, 7, 3', 4'	Daidzéine Croboï
Chalcone		Chalcone	2', 4', 3, 4	Butéine
			2', 3', 4', 3, 4	Okanine
Aurone		Aurone	6, 3', 4'	Sulphurétine
			6, 7, 3', 4'	Maritimétine

## **2-5- biosynthèse des flavonoïdes :**

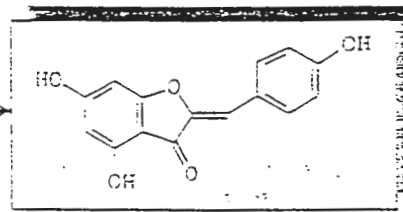
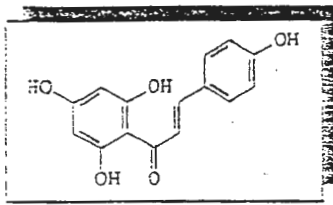
Malgré leur variabilité structurale , les flavonoïdes dérivent tous de la même voie de biosynthèse dont les étapes sont les mieux connues tant du point de vue biochimique que du point de vue moléculaire. Leur synthèse fait intervenir des voies communes [ 37].

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone synthétase de trois molécules de malonyl – COA , avec un ester du co-enzyme A et un acide hydrocyanomique , en générale le P-coumanoyl –COA. Le produit de la réaction est une chalcone de couleur jaune (la tetrahydroxychalcone ). Cette dernière est considérée comme le point de départ pour synthétiser les différentes classes de flavonoïdes : flavonone, aurone, flavonol, flavone, anthocyanidine, catéchine. Des étapes ultérieurs surtout de glycosylation et d'acylation amènent les flavonoïdes a la forme définitive dans laquelle ils se trouvent in vivo. La biosynthèse de ces composés est démontrée dans la figure –2 [ 3].

Phénylalanine + 4-coumaryl-CoA

1) phénylalanine ammoniylase (PAL)

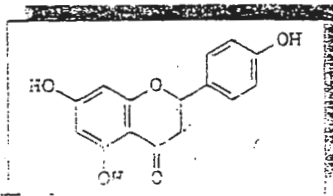
2) chalcone-synthase (CHS)



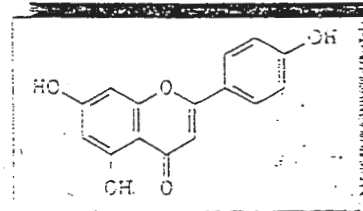
2, 4, 6, 4'-tétrahydroxy chalcone

aurone

Chalcone-isomérase (CHI)



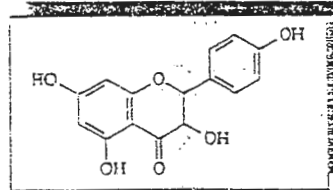
flavone-synthase



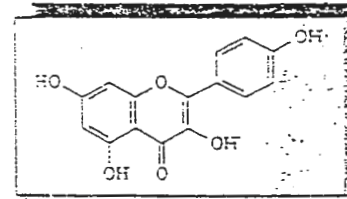
flavanone

flavone

(2S)-flavanone 3-hydroxylase (F3H)



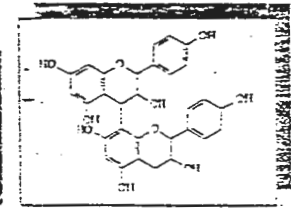
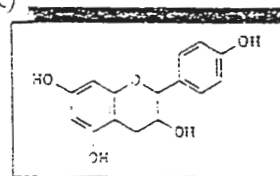
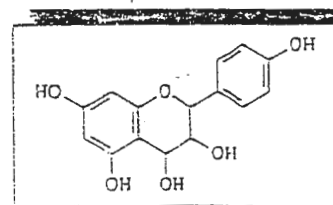
flavonol-synthase



flavonol

flavonol

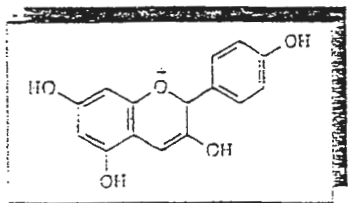
dihydroflavonol 4-réductase (DFR)



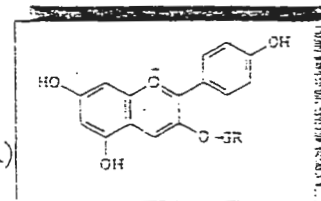
catechine

Proanthocyan

leucoanthocyanidine



uridine flavonoïdes  
3-O-glucosyl transférase (UGFR)



anthocyanidine

anthocyan

Figure (2) : Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes [3].

## 2-6- Intérêt des flavonoïdes:

Les flavonoïdes possèdent des caractéristiques particulières qui font d'eux des marqueurs de choix dans l'étude et la compréhension de l'organisation hiérarchique du monde végétal .

Ce sont des métabolites secondaires . Ils constituent des molécules chimiques stables et facile d'accès.

Enfin , ils présentent une extraordinaire diversité structurale ( Plus de 4647 structures flavoniques répertoriées à ce jour ) [ 14].

### 2-6-1- Intérêt biologiques :

#### *\* Rôle attractif :*

La variation de couleurs des fleurs est due à l'accumulation dans les cellules de pigments capables d'absorber sélectivement la lumière visible. Dans d'autres cas les pigments des végétaux peuvent jouer un rôle répulsif vis-à-vis de pollinisateurs. Par exemple les abeilles préfèrent les fleurs bleues et jaunes , les papillons préfèrent le rose et le blanc [ 14 ].

#### *\* Rôle protecteur :*

Les flavonoïdes qui imprègnent le bois de cœur , ont des propriétés fongicides, bactéricides et insecticides qui protègent l'arbre contre l'intrusion de champignons ou d'insectes. Ils jouent aussi un rôle de photo-protection contre les rayons ultraviolets de la lumière solaire [21].

### 2-6-2- intérêt pharmacologiques :

#### *\* Activité antibactérienne :*

Une des fonctions incontestées des flavonoïdes et des polyphénols est leurs rôles dans la protection contre l'invasion bactérienne [11]. La présence naturelle d'un groupe phénolique dans un flavonoïde serait supposer fournir une activité antibactérienne. L'addition des groupes phénoliques supplémentaires peut augmenter cette activité. Les composés les plus inhibiteurs sont les

structures proches des flavones et flavonones. Ces composés sont actives à 1 et 5 ppm respectivement [27].

Le tableau-3 rassemble quelques flavonoïdes possédants une activité antibactérienne.

**Tableau-3 : Flavonoïdes et activité antibactérienne.**

Composés flavonoïques antibactériens	Bactéries	Références
<i>Retrochalcone lincochalcone (4, 4<sup>h</sup> dihydroxy 2<sup>e</sup> methoxy -3<sup>e</sup>- prényl)</i>	* <i>Saphylococcus aureus</i>	[ 12]
<i>5.7.2.6 tétrahydroxy lavandulyl 4<sup>e</sup> methoxyflavanone</i>	Inhibition complète de <i>Staphylococcus aureus</i>	[ 25]
<i>5.7 dihydroxy 3.8 dimethoxy flavone</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	[ 18]

### **\*Activité antifongique :**

De nombreux travaux ont été entrepris pour évaluer le potentiel antifongique des flavonoïdes contre : *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarium*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*. Beaucoup d'études montrent que les flavones non substitués constituent le plus actif des composés testés (flavonoïdes). Les flavanones le sont moins. Enfin, les flavonols et le 7-hydroxyflavone sont peu intéressants [40].

### **\*Activité antivirale :**

Une propriété supplémentaire des flavonoïdes qui a fait l'objet de beaucoup d'études est l'activité antivirale, plus particulièrement anti-HIV [23]. Quelques flavonoïdes paraissent avoir une activité inhibitrice sur ce virus.

D'autres flavonoïdes sont des inhibiteurs des enzymes nécessaires pour la reproduction virale comme la quercétine-3-(2-galloyl)-binopyranoside [24].



### ***\*Activité antioxydante :***

Les flavonoïdes agissent comme étant des fixateurs d'espèces variées oxydantes, c'est à dire l'anion super oxyde  $O_2^-$  et les radicaux peroxydes.

Des chercheurs ont montré [7] qu'un groupe carbonyle à la position  $C_4$  et une double liaison entre les carbones  $C_2$  et  $C_3$  sont aussi caractéristiques et importants pour la grande activité antioxydante chez les flavonoïdes.

La buteine et 3.4 dihydroxychalcone sont plus actifs [9]. Une étude récente a permis d'identifier huit nouveaux composés phénoliques parmi lesquels trois composés ont une forte activité contre la peroxydation lipidique testés dans le cerveau du rat [28].

### ***\*Activité antitumorale :***

Les flavonoïdes réduisent l'apparition de tumeurs expérimentales chez l'animal notamment pour le cancer de la peau, du colon, et du sein. On pense que les flavonoïdes seraient responsables de lésions au niveau de la phase de promotion, en inhibant la croissance de nombreuses lignées cellulaires, et en phase de progression en inhibant la vascularisation des tumeurs [6].

### ***\*Activité anti-inflammatoire :***

Les flavonoïdes ont une propriété anti inflammatoire grâce à leur capacité de réagir contre l'histamine et d'autres médiateurs d'inflammation [6].

### ***\*Activité antidiabétique :***

Les flavonoïdes (quercetine) peuvent inhiber l'enzyme qui transforme le glucose en sorbitol. Ce dernier est relié aux complications diabétiques. Ils peuvent également améliorer la sécrétion de l'insuline et protéger les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres [17].

Ces composés présentent plusieurs autres activités pharmacologiques à savoir une activité sur les maladies cardio-vasculaires, inhibition de la sécrétion

plaquettaire, activité antiallergique, activité oestrogénique. Ils possèdent aussi une action sur la perméabilité capillaire [ 3] .

### ***2-6-3- Intérêts physiologiques***

Les flavonoïdes s'attachent facilement à la surface des enzymes grâce aux groupements hydroxyles. Ce sont des inhibiteurs puissants de plusieurs systèmes enzymatiques :

-Inhibiteurs de la hyaluronidase ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire.

-Inhibiteurs de la phosphodiesterase de l'AMPC ce qui pourrait expliquer leur activité anti -agrégant plaquettaire [3 ].

-Le kœmpferol active l'ascorbate-oxydase tandis que le quercétol l'inhibe. Le kœmpferol et la quercétine sont utilisés comme régulateurs de croissance des différents organes de la plante [10].

### 3- Les germes testés

#### 3-1-Formes bacillaires

##### 3-1-1-Escherichia coli :

###### **\* Habitat :**

*Escherichia coli* est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux (intestin) .La présence de *Escherichia coli* dans l'eau est le témoin d'une contaminations fécale récente [2].

###### **\* Pouvoir pathogène :**

*Escherichia coli* peut provoquée plusieurs types d'infections avec des syndromes polymorphes ;

- Les infections abdominales : suppuration péritoneales (péritonite)
- Les infection bactériennes : Elles sont dues au pouvoir invasif et leur résistance a la phagocytose et à l'action du complément .
- Méningites du nouveau né ou nourrisson et les syndromes diarrhéiques [ 38].

###### **\* Caractères biochimiques :**

Les caractères biochimiques d'*E. coli* sont représentés dans le tableau-4.

**Tableau-4** : caractère biochimiques d' *E.coli* [ 20].

Les caractères Biochimiques	Uréase	Indole	Glu	Lact	Sacch	H2S	Gaz	Citrate	Mannitol	O.N.P.G	RM	Gélatine	V
E-coli	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-

O.N.P.G : Ointerophenyl-p- galagtopyranoside .

R M: Rouge de méthyle .

V P : Voge proskauer.

### 3-1-2- Klebsiella pneumoniae :

#### **\* Habitat :**

Les Klebsielles sont des Enterobacteriaceae. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol, et des végétaux, de la flore fécale de l'homme. Elles sont souvent commensales de la peau des muqueuses et des voies respiratoires [2].

#### **\* Pouvoir pathogène :**

*K - pneumoniae* est de loin la plus souvent rencontrée. Elle est isolée principalement dans des broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës mais aussi dans des infections urinaires, hépatobiliaires ou à partir de pus divers.

En raison du terrain débilisé sur lequel elles se développent, les septicémies à *K- pneumoniae* ont un pronostic très sévère [2].

#### **\* Caractères biochimiques :**

Les caractères biochimiques de *K- pneumoniae* sont représentés dans le tableau-5.

**Tableau-5 :** caractères biochimiques de *K- pneumoniae* [ 20].

Les caractères biochimiques	Uréase	Indole	Glu	Lact	Sacch	H <sub>2</sub> S	Gaz	Citrate	Mannitol	O.N.P.G	RM	Gélatine	V
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+

### 3-1-3-Enterobacter :

#### **\* Habitat :**

Les Enterobacters appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Ces germes sont commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau, et les muqueuses. Ce sont des bactéries souvent rencontrées dans le milieu hospitalier [ 2].

### **\* Pouvoir pathogène :**

Ces bactéries pathogènes opportunistes peuvent être responsables de septicémies , de méningites, d'infections urinaires néonatales et de suppurations diverses [2].

### **\* Les caractères biochimiques :**

Les caractères biochimiques d'*Enterobacter- sp* sont représentés dans le tableau -6.

**Tableau-6** : caractères biochimiques d'*Enterobacter - sp* [ 20].

Les caractères biochimiques	Uréase	Indole	Glu	Lact	Sacch	H <sub>2</sub> S	Gaz	Citrate	Mannitol	O.N.P.G	RM	Gélatine	V
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	÷	-	+	÷	-	÷	-	d	-

d : différents types biochimiques

### **3-1-4-Pseudomonas aeruginosa :**

#### **\*Habitat :**

Les bactéries d'espèce *Pseudomonas - aeruginosa* sont essentiellement saprophytes de l'eau , du sol humide ou sur les végétaux .

Ces bactéries peuvent vivre en commensaux dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux [ 33].

#### **\*Pouvoir pathogène :**

*P- aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie pathogène opportuniste .

Il est impliqué dans les infections cutanées , broncho-pneumopathies, les infections oculaires et digestives surtout chez les sujets ayant été traités par des antibiotiques pour une longue durée [2 ].

### \* *Les caractères biochimiques :*

Les caractères biochimiques du *P- aeruginosa* sont représentés dans le tableau-7.

Tableau-7 : caractères biochimiques du *P- aeruginosa* [ 20].

Les caractères Biochimiques	Uréase	Indole	Glu	Lact	Sacch	H <sub>2</sub> S	Citrate	RM	VP	Lécithinase
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+

### 3-2-Formes coccoïdes :

#### 3-2-1- Staphylococcus aureus :

##### \* *Habitat :*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie très répandue dans la nature aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau .Ces germes sont des commensaux extrêmement fréquents de la peau et des cavités naturelles de l'homme et des animaux [ 33].

##### \**Pouvoir pathogène :*

Chez l'homme *S. aureus* est responsable de pathologies très diverses du point de vue clinique :

- Infections de la peau et des muqueuses .
- Septicémies qui correspondent à la multiplication et la dissémination dans la circulation sanguine .
- Infections viscérales (ostéomyélite , pneumonie, méningite , abcès conjonctif , endocardite ) .
- Certains syndromes sont dues a des Staphylocoques qui produisent une ou plusieurs toxines comme les syndromes du choc toxique et les intoxications alimentaires dues à des souches productrices d'entérotoxines [ 38].

**\*Identification :**

**- Le milieu d'isolement :**

Le milieu utilisé est le Chapman de couleur jaune. Inhibiteur : Na CI haute concentration. Les *Staphylococcus aureus* donnent des colonies jaunes après 24 h d'incubation à 37 c° (mannitol+) [ 20].

**- Recherche de la catalase :**

L'observation des bulles d'air Lors du contact de la colonie avec la goutte d'eau oxygénée indique que la catalase est plus [ 20].

**-La recherche de la coagulase libre :**

La Détection de la coagulase s'effectue en mettant du plasma de lapin et la souche *Staphylococcus aureus* dans un tube à 37C° .L'apparition d'un coagulum de couleur blanchâtre indique la présence d'une coagulase libre [ 20].

# **Matériel et méthodes:**



## II- Matériels et méthodes :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de l'institut de biologie de l'université de Jijel . Notre étude comporte deux parties :

- Etude du profil chimique de la propolis.
- Etude de l'activité antibactérienne des extraits de propolis.

### 1-Etude du profil chimique :

#### 1-1-Extraction :

La propolis a été collectée durant le printemps 2004 des deux régions de Kaous et Jamaa . La propolis brute a été conservée dans des bocaux fermés hermétiquement et placée à l'abri de la lumière et de la chaleur , puis placée au congélateur quelques jours à -4C° pour faciliter sa manipulation .

Les deux propolis 1 et 2 (Kaous et Jamaa ) ont été extraites par plusieurs concentrations d'alcool éthylique : 60% , 70% , 80% ,95 % pour 1g et 2g de la propolis de chaque région . L'extraction est réalisée selon la méthode de Park.K.Y et al (1998) .

Le mélange est laissé pour macération pendant une semaine avec agitation de temps en temps . Après macération le mélange est chauffé (bain-marie ) à 70°pendant 30 minutes puis filtré . Après filtration sur du papier filtre,l'extrait obtenu est appelé : extrait brut ou teinture mère ou EEP ( Extrait Ethanolique de Propolis ).

#### 1-2-Séparation des flavonoïdes :

La séparation des produits flavoniques auxquels on attribue les propriétés biologiques de la propolis a été essentiellement réalisée par des méthodes chromatographiques : chromatographie sur papier et sur couche mince.

### 1-2-1-Chromatographie sur papier :

C'est une chromatographie liquide-liquide qui correspond à une suite de transferts dans la quelle l'une des phases est fixe , l'autre est mobile .

La phase fixe est dite phase stationnaire . Elle imprègne un support solide .

La phase mobile se déplace par gravité ou par capillarité .

Les produits flavoniques sont recherchés et séparés. Le support utilisé est le papier wattman N° 3. Les deux propolis sont testées simultanément. Le système solvant utilisé est l'acide acétique à 15%. Après séparation , les taches des différents produits sont révélées sous une lumière UV (lumière de Wood 3660A°). Cette méthode permet de déterminer la couleur des taches et de mesurer le rapport frontal (RF) des différents composés existants dans chaque extrait .

#### *\*Relation fluorescence – structure :*

L'examen en lumière ultraviolette est certainement le procédé le plus utilisé pour la détermination de la structure. En dehors des isoflavonones pratiquement tous les autres composés de la famille des flavonoïdes apparaissent en UV sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents . La relation structure- fluorescence est résumée dans le tableau-9 [26.27.39].



**Tableau-9** : relation structure- fluorescence .

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5,6,7 tri-OH libres Flavonols 5,7,8 tri-OH libres
Brun-noir	3- OH absent ou 3- OH substitué
Violet	Flavones 5- OH et 4-OH Flavones 3-OR et 5-OH ;4-OH Flavones 6- ou 8-OH Chalcones , isoflavones , dihydroflavonoles , flavanones
Bleu-clair (Fluorescent )	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
Jaune terne ,jaune fluorescente orangée	Flavones 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavones avec 3-OH libre Aurones , chalcones , flavanones
Jaune pâle	Dihydroflavonols

**\*Relation RF –structure :**

Il a été établis par Bate -Smith et Westall qu'en utilisant une CCM la valeur du RF dans un solvant lipophile diminue quand augmente le nombre d'hydroxyles libres de la molécule .

La valeur RF est définie comme suit :

$$RF = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

- **Préparation de l'inoculum** : Il est impératif de travailler sur des souches pur et jeune .On fait une dilution des bouillons nutritifs contenant les germes en mettant une goutte de celui-ci dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau distillé à l'aide d'une pipette pasteur. On homogénéise pour obtenir une suspension limpide.
- **Ensemencement par inondation** : Les boites sont inondées par 2 à 4 ml de l'inoculum . A l'aide d'une pipette pasteur ,on aspire le surplus . Puis on sèche pendant 15 minutes à 37 c°.
- **Dépôt des disques chargé** : Les disques chargés sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile.
- **Pré-incubation** : Les boites sont laissées pendant 30 minutes à température ambiante pour une meilleure diffusion des solution testées .
- Incubation** : à l'étuve pendant 18 à 24 heurs à 37c°.
- Lecture** : Pour chaque disque , on mesure le diamètre de la zone d'inhibition en (mm) à l'aide d'une règle .

# Résultats et discussions

### III- Résultats et discussions :

#### III-1- Résultats :

##### 1-Etudes du profil chimique :

###### 1-1-Extraction :

La couleur de la propolis dépend de son origine. La propolis 1 (kaous) est de couleur brune rougeâtre et la propolis 2 (Jamaa) est de couleur jaune foncée.

L'intensité de la couleur des extraits augmente en fonction du pourcentage d'alcool utilisé et de la concentration de la propolis testée ( 1 ou 2 g).

###### 1-2-Séparation des flavonoïdes :

La chromatographie a permis de séparer plusieurs produits flavoniques . Les valeurs des RF et la fluorescence des deux propolis (1) et (2) sont représentés dans les tableau 11 et 12.

**Tableau-11** : Chromatographie sur papier des propolis 1 et 2.

Propolis	fluorescence	RF
Propolis (1)	Jaune terne	0.026
	Jaune fluorescent	0.078
	Jaune fluorescent	0.29
Propolis (2)	Jaune fluorescent	0.052
	Violet	0.21

On remarque que les deux propolis contiennent des taches de couleur jaune fluorescent. Le chromatogramme de la propolis (2) contient une tache violette.

**Tableau-12** : Chromatographie sur couche mince des propolis 1 et 2.

Propolis	fluorescence	RF
Propolis (1)	Jaune terne	0.27
	Brun-noir	0.31
	Jaune-fluorescent	0.35
	Violet	0.56
	Bleu-clair	0.71
Propolis (2)	Brun-noir	0.17
	Jaune-terne	0.21
	Brun-noir	0.26
	Bleu-clair	0.71

On remarque que les deux propolis testées présentent les même taches avec des FR différents.

### **2-Evaluation de l'activité antibactérienne :**

Les résultat obtenus à l'issue du test de diffusion sur gélose des extraits des propolis (1) et (2) sur les différentes souches sont représentés ci-après.

\* L'activité de l'EEP (1) :

- pour 1 g de propolis:

Tableau(13) : Diamètres d'inhibition de EEP (1) (Extrait Ethanolique de la Propolis 1).

Les concentrations, les souches testées	EEP (1) à 60%						EEP (1) à 70%						EEP (1) à 80%						EEP (1) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i> ATCC 25922	8	10	12	14	14	14	8	10	14	14	14	16	10	12	12	14	14	16	10	12	14	14	16	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	8	10	8	10	10	8	10	10	10	12	12	10	10	12	12	12	12	10	10	10	12	12	12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	20	20	20	20	20	18	20	20	22	24	26	18	20	22	22	26	28	18	20	20	20	26	28

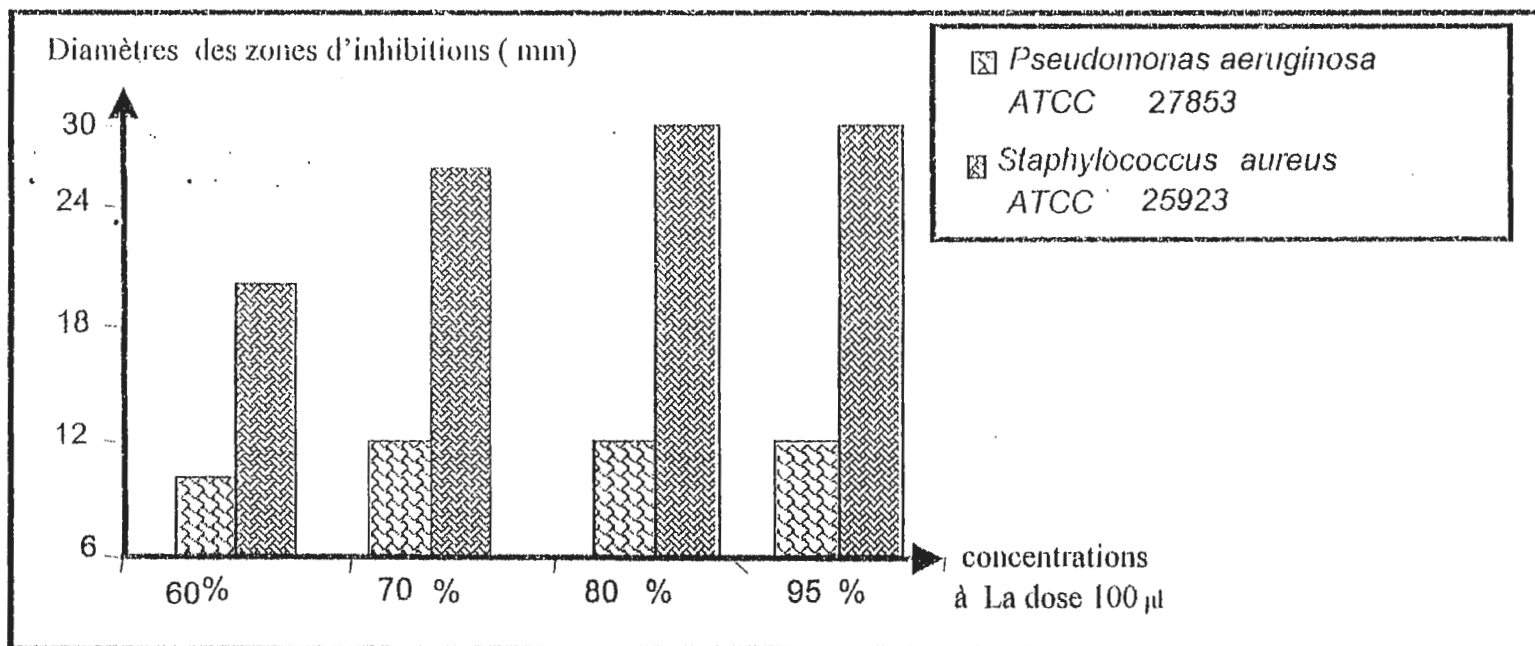


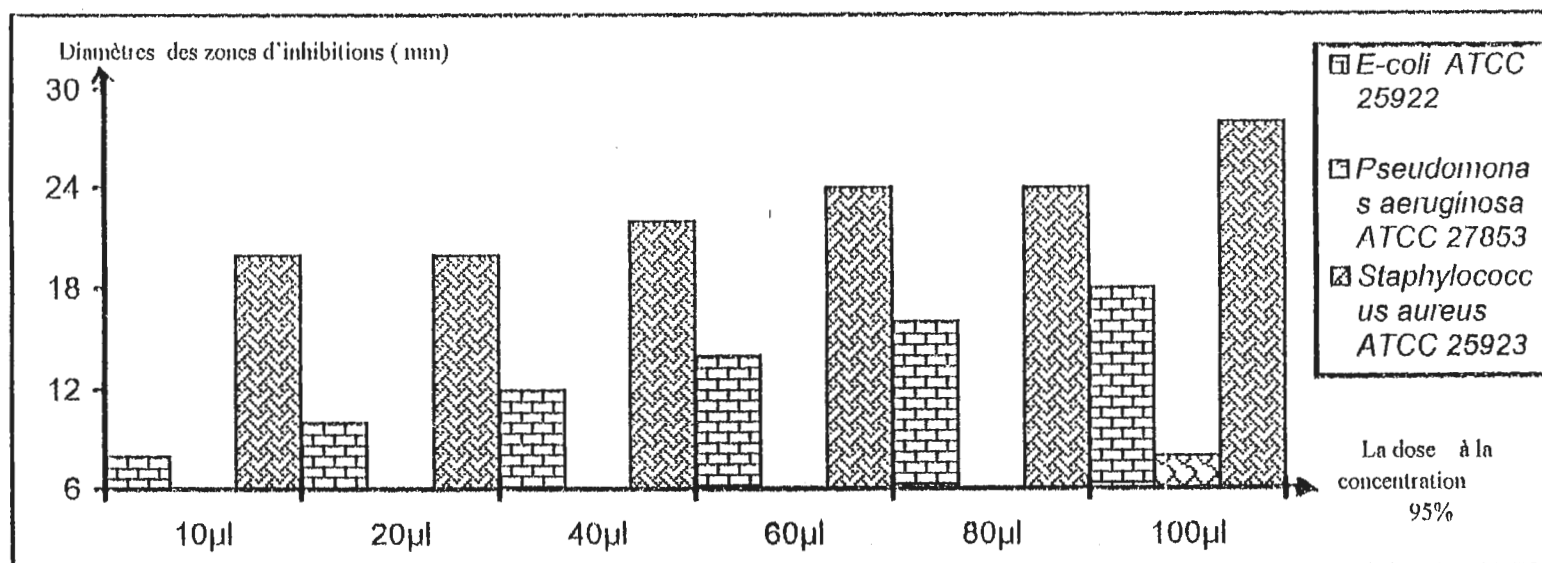
Figure 3 : Activité de L' EEP (1) sur *S- aureus* et *P- aeruginosa*

On remarque une activité intéressante de l'extrait de la propolis (1) sur les *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. *S-aureus* est plus sensible à cet extrait.



**Tableau (14) : Diamètres d'inhibition de EEP (2) (Extrait Éthanolique de la Propolis 2).**

Les concentrations Les bouches testées	EEP (2) à 60%						EEP (2) à 70%						EEP (2) à 80%						EEP (2) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i> ATCC 25922	8	10	12	12	12	14	8	10	12	12	14	14	10	12	12	14	14	16	8	10	12	14	16	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC: 27853	<6	<6	8	8	8	8	<6	<6	8	8	8	10	<6	<6	8	8	8	10	<6	<6	<6	<6	<6	8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	20	22	22	22	12	20	20	22	24	24	24	18	20	22	22	24	28	20	20	22	24	24	28



**Figure 4 : Activité de L' EEP (2) sur E-coli , P-aeruginosa et S-aureus.**

L'extrait brut de la propolis (2) montre une grande activité sur *Staphylococcus aureus* et *E-coli*. *Pseudomonas aeruginosa* à une faible activité vis -à - vis de cet extrait .

-pour 2g de propolis.

Tableau(15) : Diamètres d'inhibition de L' EEP(1).

Les concentrations Les souches testées	EEP (1) à 60%						EEP (1) à 70%						EEP (1) à 80%						EEP (1) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i> ATCC 25922	10	12	14	14	14	10	10	12	14	14	16	16	10	12	12	14	16	18	10	14	14	14	16	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8	8	10	10	10	12	8	8	10	10	12	14	10	10	10	10	12	14	8	10	10	12	12	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18	20	22	24	24	24	20	22	26	28	28	28	20	20	22	24	28	30	20	22	24	24	28	30

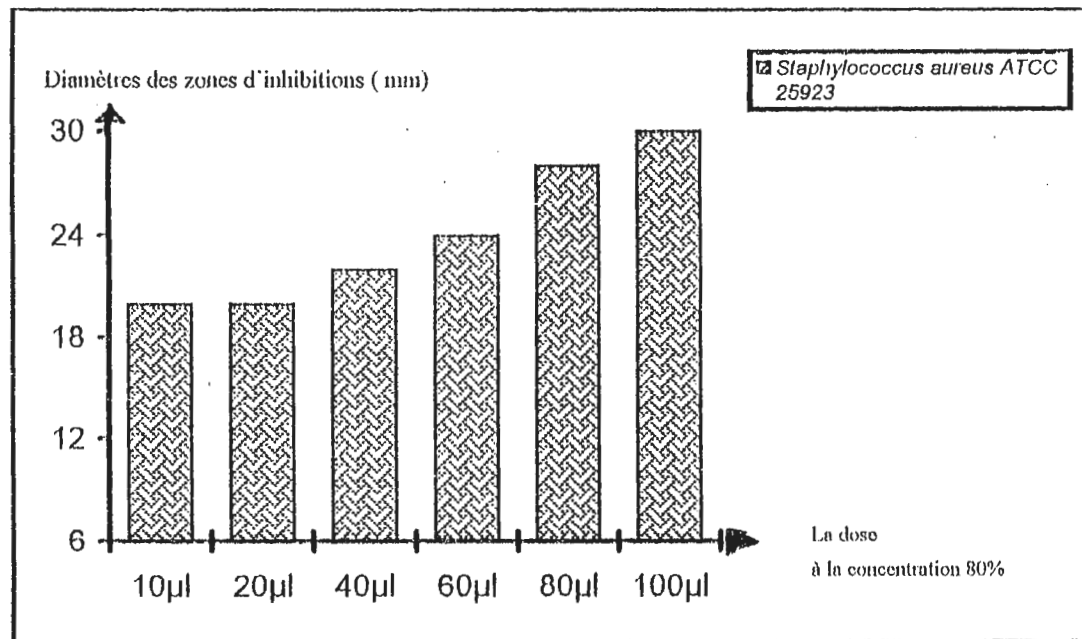


Figure 5 : Activité de L' EEP(1) sur S-aureus.

*S-aureus* ATCC 25923 est plus sensible à L' EEP(1) à 80% d'éthanol . Les diamètres les plus grand sont obtenus par la dose 100 µl .

Tableau (16) : Diamètres d'inhibition de L' EEP (2).

Les concentrations Les souches testées	EEP (2) à 60%						EEP (2) à 70%						EEP (2) à 80%						EEP (2) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli ATCC' 25922</i>	10	10	10	10	12	14	10	12	12	14	14	16	10	12	14	14	16	18	10	12	14	16	18	18
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC' 27853</i>	8	8	8	10	10	10	8	8	10	10	12	12	8	10	10	10	12	12	8	10	10	12	12	12
<i>Staphylococcus aureus ATCC' 25923</i>	20	20	22	22	24	26	20	20	22	26	26	28	20	22	22	26	30	30	20	22	24	26	28	30

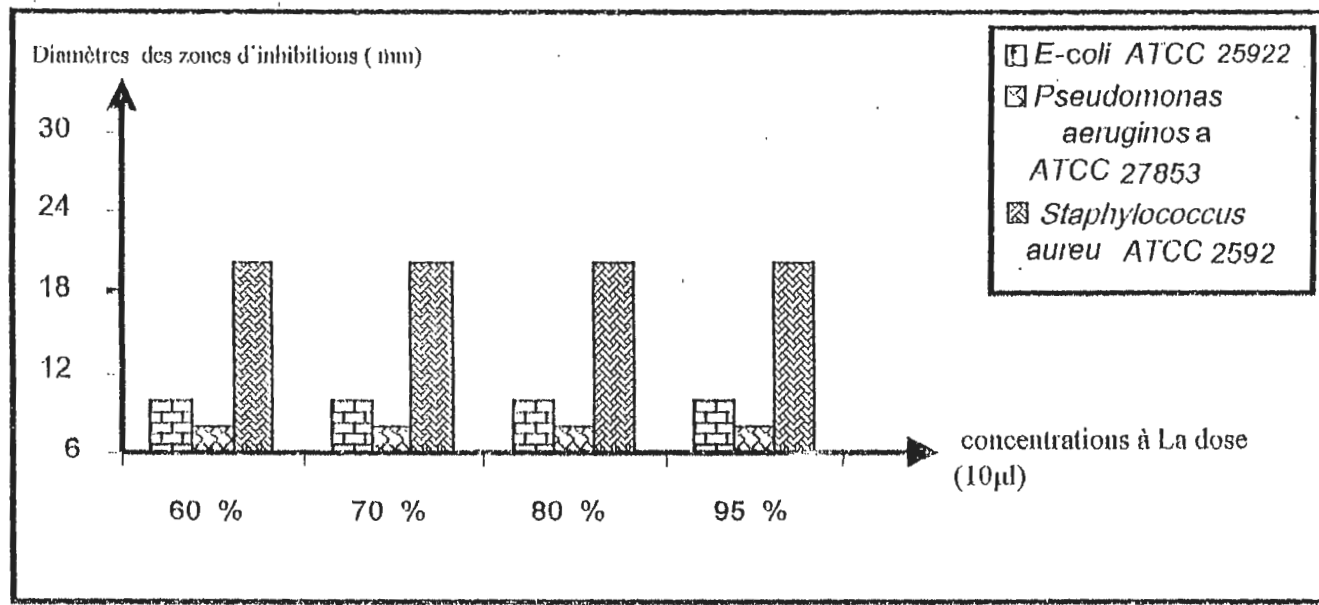


Figure 6 : Activité de L' EEP (2) sur les souches de référence.

Chaque souche représente un diamètre stable à la dose 10 µl pour chaque concentration .

\* Les Souches pathogènes:

- pour Ig de propolis :

Tableau( 17) : diamètres d 'inhibition de L'EEP (1) .

Les concentrations	EEP(1) à 60%						EEP (1) à 70%						EEP (1) à 80%						EEP (1) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i>	8	10	10	12	12	12	10	10	10	12	14	14	10	10	12	12	14	14	10	10	12	14	14	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	18	20	20	20	20	16	18	18	20	22	22	16	18	20	20	24	24	16	18	18	22	24	24
<i>K lebsiella pneumoniae</i>	8	8	8	8	8	8	8	8	10	10	10	10	8	10	10	10	10	12	8	8	10	10	12	12
<i>Enterobacter sp</i>	10	10	10	10	10	12	10	10	10	12	12	12	10	10	10	12	14	14	10	10	12	12	14	14

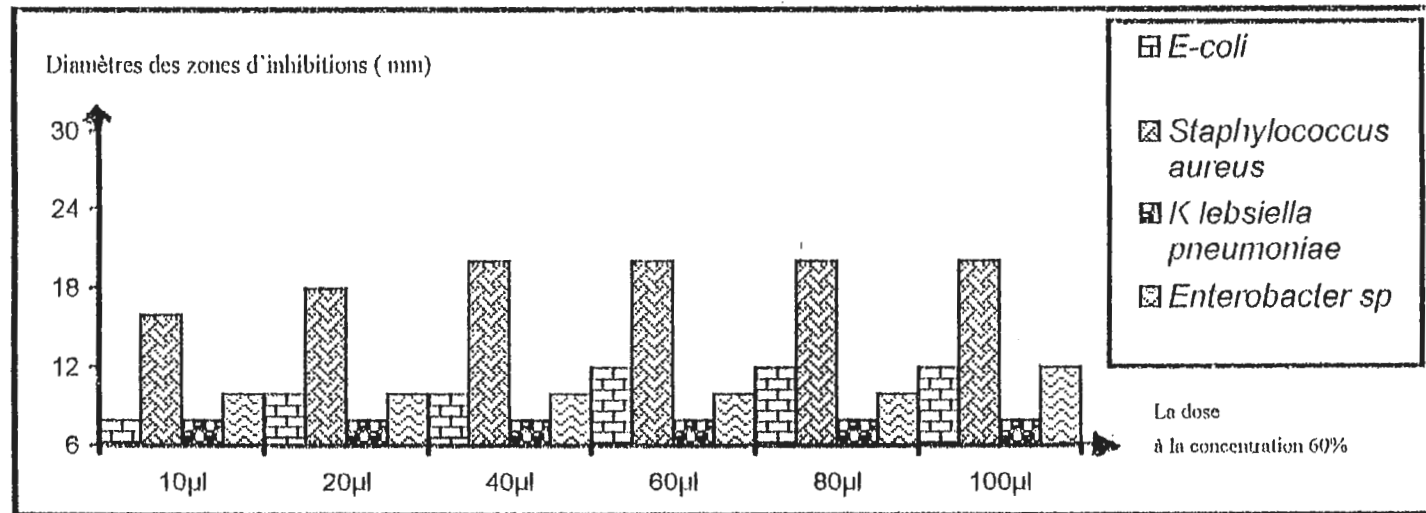


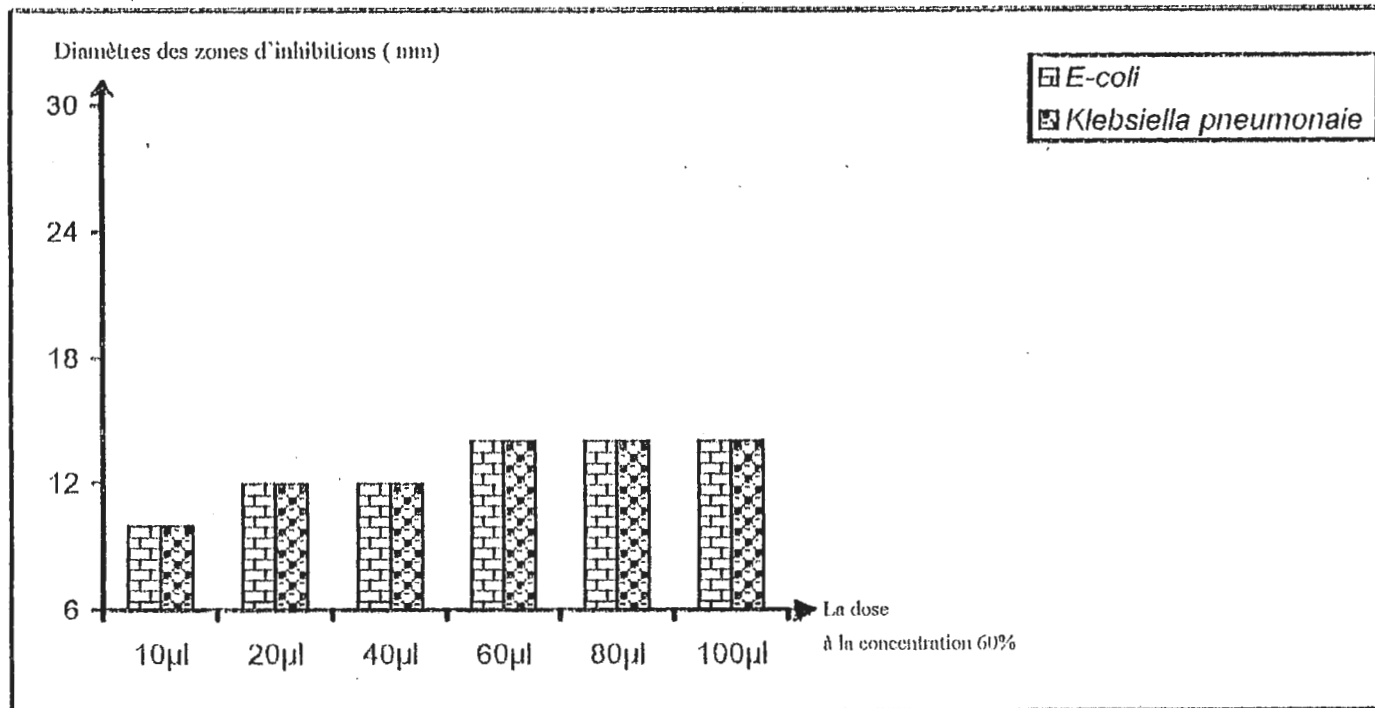
Figure7 : Activité de L' EEP(1) sur les souches pathogènes.

On note :

- une moindre sensibilité pour E-coli et Enterobacter sp .
- K-pneumoniae est peu sensible à cet extrait .

**Tableau (18) : diamètres d'inhibition de L'EEP (2).**

Les concentrations Les souches testées	EEP (2) à 60%						EEP (2) à 70%						EEP (2) à 80%						EEP (2) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i>	8	10	10	12	12	12	10	10	10	12	12	14	10	12	12	12	14	14	10	12	12	14	14	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	16	18	18	20	20	18	20	20	20	22	24	18	20	20	22	24	24	20	22	24	24	26	26
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	10	10	10	10	10	10	10	12	12	12	12	10	10	12	12	12	14	10	12	12	14	14	14
<i>Enterobacter sp</i>	10	10	10	10	12	12	10	12	12	12	12	14	10	14	14	16	16	16	12	14	14	14	16	16



**Figure 8 : Activité de L'EEP(2) sur les souches pathogènes.**

L'extrait ethanologique de la propolis (2) à 95 % donne les mêmes diamètres d'inhibition en fonction de la dose sur les souches de *klebsiella pneumoniae* et *E-coli*.

Tableau (19) : diamètres d'inhibition de L' EEP (1) .

Les concentrations Les souches testées	EEP (1) à 60%						EEP (1) à 70%						EEP (1) à 80%						EEP (1) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i>	10	12	12	14	14	14	10	12	14	14	14	16	10	12	14	14	14	16	10	12	14	14	16	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	18	20	20	20	22	18	18	20	22	22	24	18	20	20	22	24	26	18	22	22	24	26	28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	10	12	12	12	12	8	10	12	12	12	14	10	12	12	12	14	14	10	12	12	14	14	14
<i>Enterobacter SP</i>	10	10	12	12	12	14	10	10	12	12	14	14	10	12	14	14	14	16	12	14	14	16	16	18

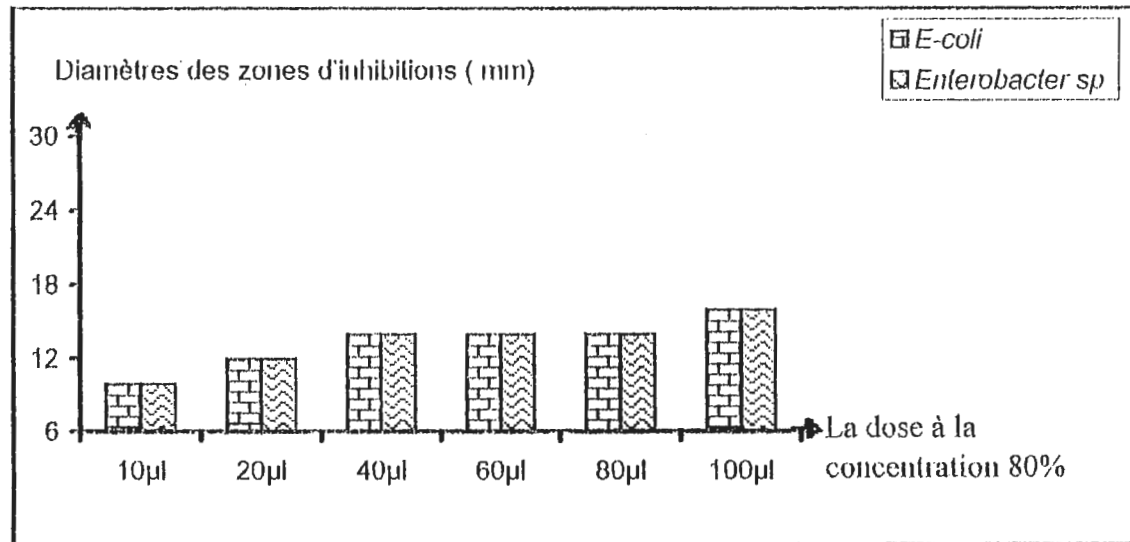
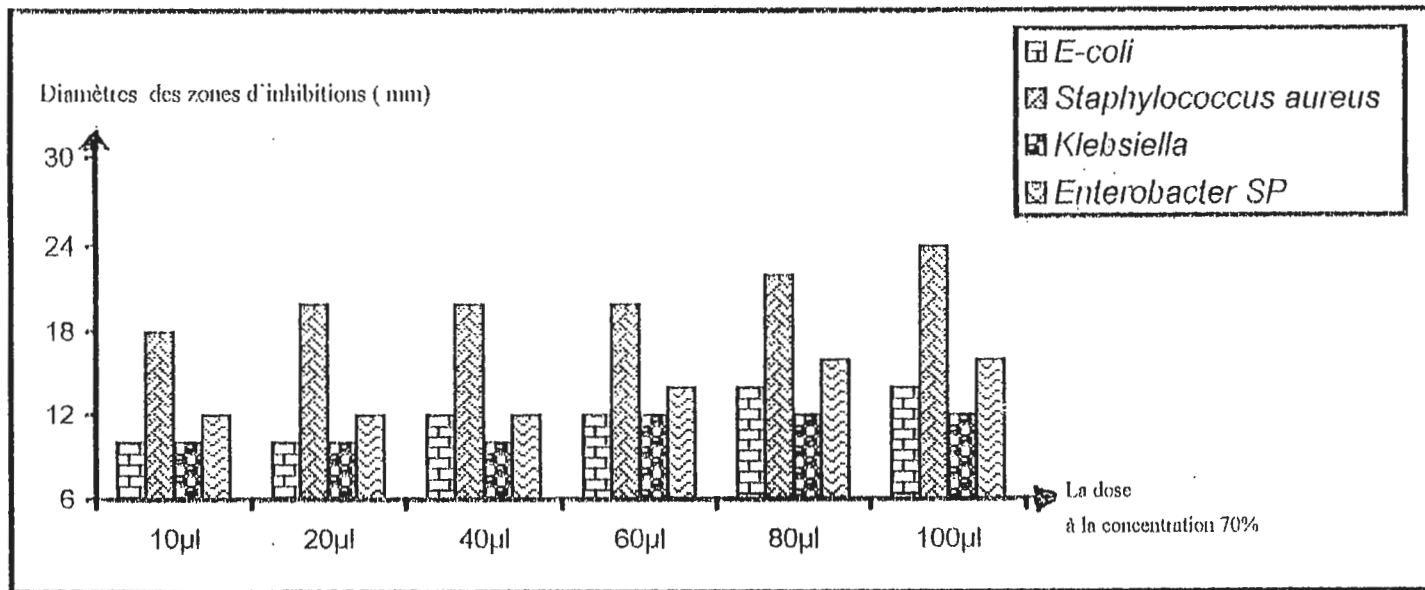


Figure9 : Activité de L' EEP(2) sur les souches pathogènes.

On remarque que *E-coli* et *Enterobacter sp* présentent un même diamètre pour chaque dose testée à la concentration 80% .

**Tableau (20) : diamètres d'inhibition de L' EEP (2) .**

Les concentrations Les souches testées	EEP (2) à 60%						EEP (2) à 70%						EEP (2) à 80%						EEP (2) à 95%					
	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl	10µl	20µl	40µl	60µl	80µl	100µl
<i>E-coli</i>	10	10	10	12	12	12	10	10	12	12	14	14	10	12	12	14	14	14	10	12	12	14	14	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	18	20	20	20	20	18	20	20	20	22	24	18	20	20	24	26	28	20	22	24	26	28	28
<i>Klebsiella</i>	8	10	10	10	12	12	10	10	10	12	12	12	10	10	12	12	14	14	10	12	12	14	14	16
<i>Enterobacter SP</i>	12	12	12	14	14	14	12	12	12	14	16	16	12	14	14	16	16	16	12	14	14	16	18	18



**Figure10 : Activité de L' EEP(2) sur les souches pathogènes.**

*S-aureus* est plus sensible à l'extrait ethanolic de la propolis (2) que *E-coli*, *Enterobacter sp* et *K-Pneumoniae*.

### III-2-Interprétation :

#### 1-Etude du profil chimique :

##### *\*Chromatographie sur papier :*

###### *- Propolis (1) :*

- Une fluorescence jaune terne avec une valeur de RF de 0.026 est en faveur d'une structure flavonol aglycone .
- Une tache de couleur jaune fluorescente avec une valeur de RF de 0.078 est probablement en faveur d'une structure flavonol aglycone.
- Un RF de 0.29 avec une couleur jaune fluorescente nous oriente vers une structures flavonol, aurone, chalcone ,ou flavanone de nature glycosidique

###### *- Propolis (2) :*

- Une tache jaune fluorescente de RF égal à 0.052 traduit une structure flavonol, aurone ,chalcone ou flavanone de nature aglycone.
- Un RF de 0.21 avec une fluorescence violette est probablement en faveur d'une structure flavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavonol ou flavanone de nature glycosidique.

##### *\*Chromatographie sur couche mince :*

###### *- Propolis (1) :*

- Une fluorescence jaune terne avec un RF de 0.27 nous oriente vers une structure flavonol de nature glycosidique.
- Une couleur brun-noir avec une valeur de RF de 0.31 peut correspondre à une structure flavanol de nature glycosidique.
- Un RF de 0.35 avec une couleur jaune fluorescente est en faveur d'une structure flavanol , aurone , chalcone ou flavanone de nature glycosidique.



- Une tache violette et un RF à 0.56 est probablement en faveur d'une structure flavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavanol ou flavanone de nature glycosidique.
- Une fluorescence bleu-clair avec une valeur de RF de 0.71 est en faveur d'une structure flavone, flavanol de nature glycosidique.

**- Propolis(2) :**

- Un RF égale à 0.17 avec une couleur brun-noir peut correspondre à une structure flavanol de nature glycosidique.
- Une fluorescence jaune terne de RF de 0.21 traduit une structure flavanol de nature glycosidique.
- Une fluorescence brun-noir et un RF de 0.26 peuvent correspondre à une structure flavanol de nature glycosidique.
- Une valeur de RF de 0,32 avec une fluorescence violette traduit une structure flavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavone ou flavanone de nature glycosidique.
- Une fluorescence bleu-claire et un RF égale à 0,71 est en faveur d'une structure flavone ou flavanol de nature glycosidique.

On remarque que les deux propolis testées présentent des taches similaires avec des valeurs de RF différentes. La propolis (2) possède de plus une tache de couleur violette (chromatographie sur papier). Nos résultats montrent que la propolis de Jijel est très riche en composés flavoniques. Ces composés peuvent être de nature flavone, isoflavone, chalcone, dihydroflavanol. Ils peuvent être de nature aglycone ou glucoside.

## 2-Etude de l'activité antibactérienne :

### *\* Souches de référence :*

Toutes les souches de références présentent une sensibilité vis-a-vis des extraits des deux propolis testées. Cette sensibilité varie en fonction de la concentration, de la charge du disque et de l'origine de la propolis.

Nos résultats montrent que :

-*S. aureus* ATCC 25923 est plus sensible aux EEP (1) et (2) à 95%. Les diamètres les plus grand sont obtenus par la dose 100  $\mu$  l. Les deux propolis testée présentent des diamètres similaires de 30 mm à concentration 0.2g/ ml.

-*E-coli* ATCC 25922 est sensible pour les extraits éthanoliques des deux propolis (1 et 2). Elle présente un diamètre de 14 mm pour les propolis 1et 2. Elle est plus sensible pour les EEP éthanol à 95%. Elle présente des diamètre de 16 mm pour la propolis 1 et 18 mm pour la propolis 2 à concentration 0.1g/ml et des diamètres de 18 pour les EEP (1 et 2) à concentration 0.2 g /ml

-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est peu sensible à l'EEP (1) à concentration 0.1g/ml. Il présente un diamètre de 14 mm à 70%,80%, et 95% d'éthanol à concentration 0.2 g/ml. Cette bactérie est peu sensible à l'EEP (2) pour les deux concentration 0.1g/ml et 0.2g/ml.

### *\* Souches pathogènes :*

Les souches pathogènes testées des différents prélèvements ont donné les résultats suivants :

-*S. aureus* est plus sensible aux propolis (1) et (2) à 95%. Les diamètre les plus grands sont obtenus pour la dose 100  $\mu$  l. Pour la concentration 0.2g/ml un diamètre de 28 mm est obtenu.

-*E-coli* est sensible pour les EEP des deux propolis (1) et (2) à 60%. Elle présente un diamètre de 12 mm pour les propolis testées à concentration 0.1g/ml. Elle est

plus sensible pour les EEP à 95%. Elle présente des diamètre de 16mm pour la propolis (1) et 14 mm pour la propolis (2) à concentration 0.1g/ml. Elle présente un diamètre de 16 mm pour les deux extrait éthanoliques à concentration 0.2g/ml.

-*K. pneumoniae* est peu sensible aux extraits des deux propolis testées à 60%. Elle présente un diamètre de 8 mm pour la propolis (1) et 10mm pour la propolis (2) à concentration 0.1g/ml. Elle est sensible pour les EEP à 95% . Elle présente un diamètre de 12 mm pour la propolis (1) et 14 mm pour la propolis (2) à concentration 0.1 g/ml . Elle présente un diamètre de 14 mm pour la propolis (1) et 16 mm pour la propolis (2) à concentration 0.2g/ml.

-*Enterobacter sp* est peu sensible aux propolis étudiées à 60% . Les diamètres les plus faibles sont obtenus par la dose 10<sup>6</sup> l . Ce germe est sensible pour l'EEP (1) éthanol à 95 % . Il présente un diamètre de 14 mm pour la propolis (1) et 16 mm pour la propolis (2) . Les deux propolis testées présentent des diamètres similaires de 18 mm à concentration 0.2g/ml.

On remarque que la propolis de Jijel possède une activité antibactérienne sur les deux types de souches testées . Cette activité est plus grande sur les souches de référence. Les diamètre les plus grands sont obtenus par *Staphylococcus aureus*. Les diamètre les plus faibles sont obtenus par *Pseudomonas aeruginosa*.

**CONCLUSION**

## *Conclusion*

La propolis (produit de la ruche) présente les qualités essentielles qui lui permettent d'entrer dans la liste des thérapeutiques naturelles.

Notre étude sur la propolis de Jijel nous a permis d'évaluer son activité antibactérienne sur deux types des souches :

Les souches des références : *Escherichia coli* ATCC 25922,  
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 .

Les souches pathogènes : *E-coli*, *S- aureus* , *Klebsiella pneumoniae*,  
*Enterobacter sp.*

Notre étude montre que la propolis possède une activité antibactérienne. Cette activité dépend de : l'origine de la propolis, de la dose testée, de la concentration étudiée et de la souche testée.

L'étude du profil chimique des deux propolis de Jijel montre la richesse de ces produits en flavonoïdes diverses. Ces flavonoïdes sont considérés comme étant les principes actifs de la propolis.

Plus d'études concernant d'autres souches bactériennes sont nécessaires pour déterminer le spectre d'action de la propolis ainsi que ses concentrations minimales inhibitrice et bactéricide..

# BIBLIOGRAPHIE

## Bibliographie:

1. AMERHEIN. N et ZENK. M. H; 1977. Metabolism of phenyl propanoid compounds, Z. Pflanze: physiol..
2. AVRIL. J. L , DABERNAT.H, DENIS.F et MONTEL.H ;1992. Bactériologie clinique . Edition MARKETING Paris, (2<sup>ème</sup> édition ).
3. BRUNETON .J ;1993. Pharmacognosie et phytochimie des plante s médicinales (2<sup>ème</sup> Edition).
4. BRUNETON.J ; 1999. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Edition :TEC et DOC (3<sup>ème</sup> édition).
5. CHAUVIN . REMY;1968 .Traité de biologie de l'abeille . Edition :Masson ET C<sup>ie</sup> , Paris .
6. CLERMENT .F ; 2001. Absorption et métabolisme splanchnique des flavonoïdes chez le rat .
7. DAS .N .P et PEREIRA .T .A ; 1990 . Effects of flavonoïds on thermal antioxidation of Palm oil : structure activity relationships .Journal of American Oil Chemists Society . Vol 67 .
8. DEBUYSER . E ; 1986 . La propolis , thèse de doctorat en pharmacie .
9. DZIEDZIC .S .Z et HUDSON .B .J .F ; 1983 .Hydroxyisoflavones as antioxidants for edible oils .Vol 11 .
10. GALSTON . A . W ;1969 . In perspective in phytochemistry .Editor Academic Press New York .
11. GRAYER .R.J, HARBORNE .J .B, KIMMINS .E .M et STEVENSON .F .C; 1994 . Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown plant hopper *Nilaparvata Lugens* .Acta Horticulturae .Vol 381 .
12. HARAGUCHI . H , TANIMOTO . K , TAMIRA .Y , MIZUTANI . K et KINOSHITO . T ;1998 . Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*.. Phytochemistry.Vol 48
13. HARBORNE . J .B , MABRY .T .J et MABRY . H ; 1975 . The flavonoïds , Tome 1 , 2 , Edition: Chapman and Hall . London .
14. HARBORNE .J .B et BAXTER .H ;1999 . The Handbook of Natural Flavonoïds . Vol 2, Wiley , Chicheter .
15. HARBORNE .J.B ; 1993. The flavonoïds :Advances and Research since 1986,

Edition: Chapman and Hall. London .

16. HASLAM .E; 1989.plante polyphénols. Végétal tannis.
17. HERTOGE .M . G ; 1997 .Antioxydants flavonols .
18. INIESTA . S . E , BARBERAN .F . A . T , GUIRADO . A , LORENTS . F . T ; 1990. Antibacterial flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H – italicum* .*Planta Medica* .Vol 56 .
19. JOHNSON.IAM ; 1999. Antioxydants et anticancéreux, *Bio Futur* N°186.
20. JOUY. H, PESTRE. A. M et NICOLAS. A ; 1975. Techniques bactériologiques appliquées à l'études des liquides organiques et des produits pathologiques. MALOINE S. A éditeur. Paris (3<sup>ème</sup> édition).
21. KUKNAY.J; 1991.The flavonoïd class of semi-essential food compound, their role in Ruman nutrition. *Wod Reu diet*.
22. LAHOUESNA .A .S ; 2002 . Effets biologiques des polyphénols extrait de plantes médicinales (*Rnunculus repens* et *Thymus hirytus* ) sur l'activité de micro organismes responsables de certains pathologies , magister en biologie animale (Constantine ) .
23. LI .B .Q , FU . T ,YAN . Y .D , BAYLOR .N .W , RUSCETTI . F .W et KUNG. H F ; 1997 . Inhibition of HIV by baicalain .*Cellular Molecular Biological Research* . Vol 39 .
24. LIN .Y .M , ANDERSON .H , FLAVIN .M .T et PAI .Y .H .S ;1997 . In vitro anti -HVV activity of biflavonoids from *Rhus succedanea* .*Journal of natural products* .Vol 60 .
25. LINUMA . M , TSUCHIYA .H , SATO . M , YOKOYAMA . J , OHYAMA . M , OHKAMA . Y et TANAKA . T ; 1994 . Flavonones with antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *Journal of pharmacy and pharmacology* . Vol 46 .
26. MARBY. T. J , MARKHAM. K.R et THOMAS . M.B; 1970.The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag. New York.
27. MARKHAM. K.R ; 1982. Technique of flavonoïd identification. Academic press, London.
28. MIAYSE .T , SANO .M et NAKAI .H ;1999 . Antioxydants from *Lespedeza homoloba* . (1) . *Phytochemistry* . Vol 52 .
29. NUTR . J ; 1996 .Flavonoïds , chemistry , cardioprotectrice , effet antidirectary ,



source , biochem. Vol 7.

30. Park. Y. K., Ikegaki.M. ; 1998. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. Biosc. Biotechnol. Biochem .Vol 62.
31. Park. Y. K., Matias of Alencor.S et AGUIAR .Cloudio. L ; 2002 .Estado da composicao de meis E propolis oriundos of masma colmèia. Mensagem Doce: 68.
32. PICMAN.A .K , SCHNEIDER .E .F , PIEMAN .G ;1995 . Effect of flavonoïds on mycelial growth of Verticillium albo- atrum .Biochemical Systematics and ecology .Vol 23 .
33. PILET.C , BOURDON. J. L,TOMA.B, MARCHAL.N, BALBASTRE.C ; 1986.Bacteriologie médicale et vétérinaire : Systématique bactérienne. Dion éditeur .Paris (2<sup>ème</sup> édition).
34. PUPPO.A; 1992 . Phytochemistry.
35. REMEZY. Christian, PHILIPPE. Gangrenons et LATOUR. Raulin ;1998. Impact Médecin Hebdo N°403.
36. SINGLTON.P ; 1999. Bactériologie . Edition: Dunod (4<sup>ème</sup> edition)..
37. STAFFORD.H.A ;1975 The metabolit of aromatique compounds, Ann. Rev. Plant Physiol.
38. SUTRA. L, FEDERICHI. M et LOUIS J;1998. Manuel de bactériologie alimentaire . Paris.
39. VOIRIN. B ; 1970.Thèse de doctorat , Université de Lyon.
40. WEIDENBORNER .M ;1999 . Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain ,pestic .sci .Vol 38 .

#### *Sites Internet*

41. [http://www.01sante.com/version.1/toutes\\_therapeutiques/produits\\_ruche/propolis.htm](http://www.01sante.com/version.1/toutes_therapeutiques/produits_ruche/propolis.htm)
42. <http://www.apisite.free.fr/donadieu1.htm>
43. <http://www.apisite.free.fr/propolis1.htm>
44. <http://www.propolis-virtualave.net/français/fr-propolis.htm>
45. [http://www.docteur-nature.com/toutes\\_therapeutiques/produit-ruche/propolis.htm](http://www.docteur-nature.com/toutes_therapeutiques/produit-ruche/propolis.htm)
46. [http://www.biogassendi.iffrance.com/toutes\\_therapeutiques/produit\\_ruche/propolis.htm](http://www.biogassendi.iffrance.com/toutes_therapeutiques/produit_ruche/propolis.htm)

# **ANNEXES**

### ANNEXE1: Milieu de MULLER-HINTON :

Infusion de viande de bœuf.....	300g
Hydrolysate de caseine.....	75.5g
Amidon .....	1.5g
Gélose.....	10g

### ANNEXE2: Gélose HECTOEN

Peptone.....	12g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Saccharose.....	12g
Salicine.....	2g
Citrate de fer III .....	1.5g
Désoxycholate.....	9g
Fuchsine.....	40g
Na cl.....	5g, 5g
Agar.....	13,5g
Eau.....	1dm

### ANNEXE3: Bouillon nutritif

Extrait de viande.....	5g /l
Peptone pancréatique.....	10g
Chlorure de sodium.....	10g

**ANNEXE4: Gélose de Chapman**

Peptone ou tryptone.....	10g
Extrait de viande.....	1g
Mannitol.....	10g
Na cl.....	75g
Eau.....	1dm
Agar .....	15g

## Erratum

Page	Erreur	Correction
1	Essentiellement composé	essentiellement composée
1	plusieurs activité pharmacologique	plusieurs activités pharm acologiques
1	aux profil chimique	au profil chimique
2	de certaine arbre	de certains arbres
2	ayant pénétré	ayant pénétrés
3	Sans cette activité	dans cette activité
4	Propriétés physico-chimique	Propriétés physico-chimiques
4	tous les intermédiaires	tout les intermédiaires
7	en brunes	en brumes
10	Différents classes	différentes classes
12	Malonyl- COA	malonyl- COA
12	a la forme définitive	à la forme définitive
14	Intérêt des flavonoïdes	Intérêts des flavonoïdes
14	Intérêt biologiques	Intérêts biologiques
14	Intérêt pharmacologiques	Intérêts pharmacologiques
17	Ce sant des inhibiteurs	Ce som des inhibiteurs
18	Caractère biochimiques d' <i>E.coli</i>	Caractères biochimiques d' <i>E.coli</i>
19	Elles se développement	elles se développent
21	Du <i>P aeruginosa</i> sont représentes	du <i>P aeruginosa</i> sont représentés
21	Productrices d'entrotoxines	Productrices d'entérotoxines
23	a 70° c	à 70° c
24	les produits flavoniques sont recherches	les produits flavoniques sont recherchés
27	facile a mesurer	facile à mesurer
28	Dépôt des disques chargé	dépôt des disques chargés
36	La dose à la concentration 60 %	La dose à la concentration 95 %
40	des taches similaires	des taches similaires
40	Nos resultat montre	Nos résultats montrent
42	des diamètre	des diamètres
42	deux extrait éthanoliques	deux extraits éthanoliques
42	aux propolis étudis	aux propolis étudiées
43	les souches des références	les souches de référence
43	sont nécessaire	sont nécessaires



### Thème : Etude de l'activité antibactérienne de la propolis

#### ملخص

منذ أن عرف الإنسان العسل وخصائصه و ذلك في شمال الهند و البرونزي كمادة علاجية ، فقد استخدمت و طرد الإصابات ، و قد انتقلت منذ الإمبراطورية الرومانية إلى يومنا هذا .  
 أما في الألفية الرابعة ، بدأ الأوروبيون في استخدام مواد فعالة ضد البكتيريا ، هذه المواد هي البروبوليس .  
 في سنة 1960 ، بدأ علماء الأحياء في دراسة البروبوليس كمنشط طبيعي (فيتامين ، قانور) و كمنشط طبيعي .  
 في سنة 1970 ، بدأ علماء الأحياء في دراسة البروبوليس كمنشط طبيعي .  
 في سنة 1980 ، بدأ علماء الأحياء في دراسة البروبوليس كمنشط طبيعي .  
 في سنة 1990 ، بدأ علماء الأحياء في دراسة البروبوليس كمنشط طبيعي .  
 في سنة 2000 ، بدأ علماء الأحياء في دراسة البروبوليس كمنشط طبيعي .

#### مقدمة

Depuis l'existence de l'abeille les hommes ne sont pas sans faire un usage thérapeutique des produits de la ruche . Le miel et la propolis ont été utilisés comme médicaments antiseptiques , antiparasitaires ou analgésiques . Les usages courants de la médecine se sont étendus à nos jours .  
 Les recherches scientifiques ont montrés que la propolis contient des substances bioactives . Ces substances sont des flavonoïdes qui possèdent une large activité biologique .  
 Dans notre travail , nous avons étudié le profil chimique de deux propolis provenant des deux régions de Kabes et Janaa (Hjel) , ainsi que l'évaluation de leur activité antibactérienne sur des souches de référence et des souches pathogènes .  
 Nos résultats ont démontrés que l'activité antibactérienne de la propolis dépend de son origine et de la souche testée .

#### نتائج

Since the existence of bees man used as therapy the honey or products of the hive . The honey and the propolis have been used like antiseptic substances , antiparasitic uses or analgesics . These uses spread in medicine transmitted themselves besides until our days .  
 The scientific research showed that the propolis contains substances bioactives . These substances are flavonoïdes that possess a large biologic activity .  
 In our work we studied the chemical profile of two propolis coming from the two regions of Kabes and Janaa (Hjel) , as well as the assessment of their antibacterial activity on stumps of references and stumps pathogèneses .  
 Our results show that the antibacterial activity of the propolis depends on his/her/its origin and the stumps test ed .

#### Mots Clés :

Propolis , activité antibactérienne , Flavonoïdes