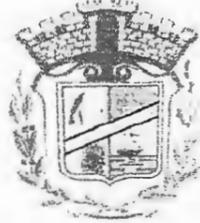


République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université de Jijel
Faculté des Sciences
Département de Biochimie- Microbiologie



*Mémoire en vue de l'obtention du diplôme
d'études supérieurs en Biologie
Option : Microbiologie*

Thème :

*Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis
vis- à- vis des différentes souches bactériennes*



Membres du Jury :

Président : M^{ELLE} Laggoune Souheilla
Examineur : M^F Boudjerda Djamel
Encadreur: M^{ME} Roula Sagia

Réalisé Par :

**Krid Rima
Ghoubiche Sihem
Gres Hanane**

Promotion 2005-2006



﴿ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَن يَشَاءُ ﴾

وَيَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ

وَاللَّهُ يُلِّقُ شَيْءٌ عَلِيمٌ ﴿﴾



Remerciements

Nous remercions dieu qui nous a donné du courage et de la volonté d'avoir réussi dans nos études.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur :

M^{me} **Roula Sagia** qui nous a encadrée et soutenue par ses conseils, ses encouragements et sa compréhension.

Nos remerciements vont également à :

M^r **Ruikha Youcef** et M^r **Laieb Said** pour leur aide et leur bibliographie.

L'équipe du laboratoire de biologie surtout **Wazina**, pour les services qu'ils nous ont offert le long de nos études.

La promotion de magistère de cette année surtout **Lilia** et **Widad** pour leur gentillesse et leur conseil.

Nos vifs remerciements vont aux membres de jury pour avoir accepté de jurer ce modeste travail.

En fin, notre respect à tous les enseignants de l'Institut de biologie de l'Université de Jijel.

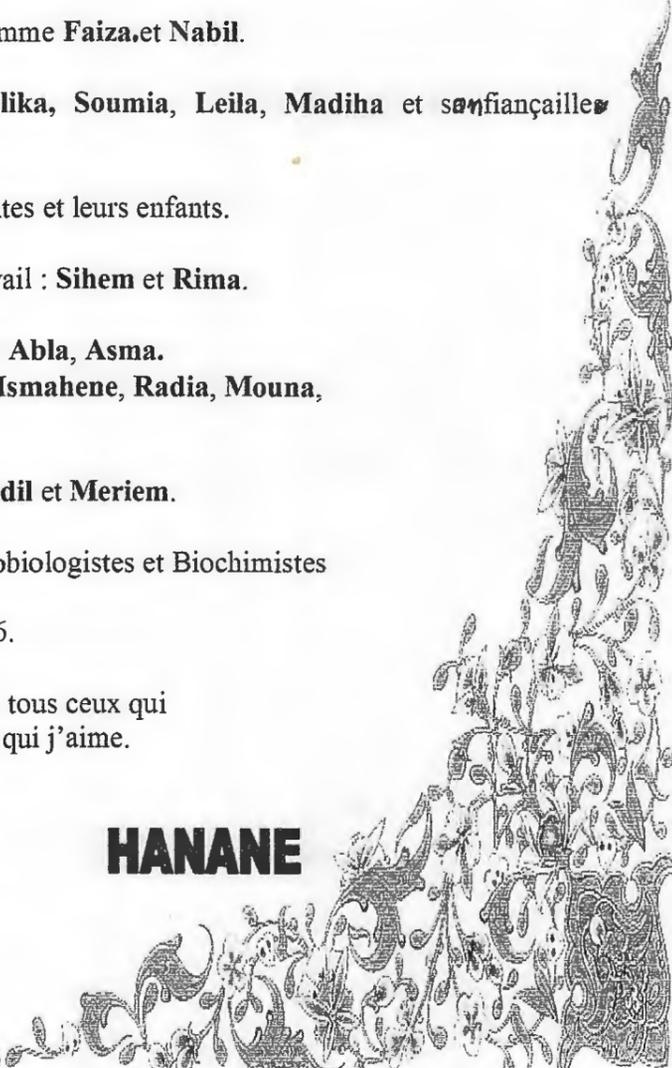
Rima* Sihem* Hanane



Dédicace

Avec mon grand Amour et mes profonds Sentiments. Je dédie ce modeste travail :

- A **ma très chère mère**, symbole de tendresse, mélodie d'amour qui est à l'origine de mon espoir infini dans mes études et dans ma vie.
- A **mon père** qui m'a toujours encourager pour continuer mes études et réaliser mes butes.
- A mes frères : **Salah** et sa femme **Faiza**.et **Nabil**.
- A mes chères sœurs : **Malika, Soumia, Leila, Madiha** et ~~son~~ fiançailles **Ammar**.et **Roufia**.
- A tous mes oncles et mes tantes et leurs enfants.
- A mes collègues dans ce travail : **Sihem** et **Rima**.
- A mes chères amies : **Nabia, Abla, Asma**.
- A mes amies : **Amel, Leila, Ismahene, Radia, Mouna, Lamia, Nadira** et **Salim**.
- A les deux petites roses : **Hadil** et **Meriem**.
- A tous mes collègues Microbiologistes et Biochimistes
de la promotion 2005-2006.
- Enfin, je dédie ce mémoire à tous ceux qui m'aiment et surtout à tous qui j'aime.



HANANE

Dédicace

Avec mon grand amour et mes profonds sentiments je dédie ce modeste travail :

- A ma très chère mère (ma grande mère), symbole de tendresse, mélodie d'amour, qui est à l'origine de mon espoir infini dans mes études et dans ma vie «que dieu me la garde et la protégé».
- A mon père qui m'a toujours encourager pour continuer mes études et réaliser mes butes.
- A ma mère **Mofida**, pour son amour et ses encouragements.
- A mes seuls frères **Sabri** et **Adel**, je souhaite à mon petit frère le réussir dans ses études
- Au personne le plus proche a moi et qui personne ne peut le remplacé **Larbi**, sans oublié sa famille.
- A mes amies qui n'ont accompagné pendant mes études spécialement : **Sihem, Hanane, Abla, Mouna, Asma, Nabia.**
- A mes chères amies qui je ne jamais les oublié : **Yasmina, Assia, Massika, Faiza, Souad, Nassira, Karima, Yamina, Nadjwa** et son marie **Mouhamed.**
- En fin, je dédie cette mémoire à mes collègues microbiologistes et biochimistes de la promotion 2005-2006.
-

Rima

Dédicace

Avec mon grand amour et mes profonds sentiments je dédie ce modeste travail :

• A **mon père** qui m'a toujours encourager pour continuer mes études et réaliser mes butes.

• A **ma très chère mère**, symbole de tendresse, mélodie d'amour, qui est à l'origine de mon espoir infini dans mes études et dans ma vie.

• Au Person le plus proche a moi et qui personne ne peut le remplacé, mon marie **Hichem**, sans oublié sa famille.

• A mes frères ; **Billel, Hamza, Abd el Djalile**.

• A ma seul sœur **Khaoula**.

• A mes amis : **Lamisse, Aida, Samira, Amel, Chourouk, Amira, SQouad, Akila, Naima, Abla, Safa, Hessna, Widad, Amina**.

• A toute ma famille; surtout **Saliha, Wassila**.

• A mes collègues microbiologistes et Biochimistes de la promotion 2005-2006, surtout **Abla, Asmia, Nabia et Mouna**.

• En fin, je dédie cette mémoire a mes collègues dans ce travail : **Hanane et Rima** et à tous ce qui m'aiment et surtout a tous qui j'aime.

Sihem

Sommaire

| Etude bibliographique : | Page |
|--|-------------|
| Introduction : | 1 |
| Chapitre I : la propolis | |
| I-1- Définition..... | 2 |
| I-2- Origine..... | 2 |
| I-3- La récolte..... | 2 |
| I-3-1- Par l'apiculteur..... | 2 |
| I-3-2- Par les abeilles..... | 3 |
| I-4- Propriétés biologiques..... | 4 |
| I-4-1- Propriétés antibactériennes..... | 4 |
| I-4-2- Propriétés antifongiques..... | 4 |
| I-4-3- Propriétés antivirales..... | 4 |
| I-4-4- Propriétés antioxydantes..... | 4 |
| I-4-5- Propriétés cicatrisantes..... | 4 |
| I-4-6- Propriétés immunitaires..... | 4 |
| I-4-7- Propriétés anticancéreuses..... | 5 |
| I-4-8- Propriétés anesthésiques..... | 5 |
| I-5- Usages thérapeutiques..... | 5 |
| I-5-1- Les affections respiratoires..... | 5 |
| I-5-2- Les affections digestives touchants le foie..... | 5 |
| I-5-3- Les rhumatismes..... | 5 |
| I-5-4- Les Affections cardio-vasculaires..... | 5 |
| I-5-5- Les affections de la peau et la cicatrisation des plaies..... | 6 |
| I-5-6- Les affections ophtalmiques..... | 6 |
| I-5-7- Les affections génito - urinaires..... | 6 |
| I-5-8- Les affections Gynécologiques et obstétriques..... | 6 |
| I-6- Autres utilisations de la propolis..... | 6 |
| I-7- Propriétés physico - chimiques..... | 7 |
| I-8- Conservation..... | 7 |
| I-9- Composition..... | 7 |
| I-10- L'extraction..... | 7 |
| Chapitre II : Les flavonoides | |
| II-1- Définition..... | 9 |
| II-2- Constitution chimique et classification..... | 10 |
| II-2-1- Genines..... | 10 |
| II-2-1-1- Flavones, Flovonols..... | 10 |
| II-2-1-2- Flavanones et dihydroflavonols..... | 10 |
| II-2-1-3- Biflvonoides..... | 10 |
| II-2-1-4- Chalcones, Aurones..... | 11 |
| II-2-2- Les oses..... | 11 |
| II-3- Biosynthèse..... | 11 |
| II-4- Propriétés Biologiques..... | 13 |
| II-5- Propriétés pharmacologiques..... | 13 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| II-6- Toxicité des flavonoïdes..... | 13 |
|-------------------------------------|----|

Chapitre III : Les bactéries

| | |
|--|----|
| III-1- Les bacilles Gram négatifs..... | 14 |
| III-1-1- Entérobacteriaceae..... | 14 |
| III-1-1-1- <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| • Habitat..... | 14 |
| • Pouvoir pathogène..... | 14 |
| • Caractères biochimiques..... | 15 |
| III-1-1-2- <i>Klebsiella</i> | 15 |
| • Habitat..... | 15 |
| • Pouvoir pathogène..... | 15 |
| • Caractères biochimiques..... | 15 |
| III-1-1-3- <i>Proteus</i> | 15 |
| • Habitat..... | 15 |
| • Pouvoir pathogène..... | 16 |
| • Caractères biochimiques..... | 16 |
| III-1-1-4- <i>Salmonella</i> | 16 |
| • Habitat..... | 16 |
| • Pouvoir pathogène..... | 16 |
| • Caractères biochimiques..... | 17 |
| III-1-2- Pseudomonadaceae..... | 17 |
| ❖ <i>Pseudomonas</i> | 17 |
| • Habitat..... | 17 |
| • Pouvoir pathogène..... | 17 |
| • Caractères biochimiques..... | 17 |
| III-2- Les cocci Gram positifs..... | 17 |
| III-2-1- <i>Staphylocoques</i> | 17 |
| • Habitat..... | 18 |
| • Pouvoir pathogène..... | 18 |
| • Caractères biochimiques..... | 18 |
| III-2-2- <i>Streptocoques</i> | 19 |
| III-2-2-1- Streptocoques pathogènes..... | 19 |
| • Habitat..... | 19 |
| • Pouvoir pathogène..... | 19 |
| III-2-2-2- Streptocoques fécaux..... | 19 |
| • Caractères biochimiques des Streptocoques..... | 19 |

Etude expérimentale

| | |
|--|----|
| I- Matériels et méthodes..... | 20 |
| I-1 Matériels..... | 20 |
| I-2 Méthodes..... | 22 |
| I-2-1- Méthodes de l'étude bactériologiques..... | 22 |
| I-2-1-1 Purification des souches bactériennes..... | 22 |
| I-2-1-2- Identification des souches utilisées..... | 22 |
| I-2-1-2-1- Identification morphologique..... | 22 |
| I-2-1-2-2- Identification biochimique..... | 23 |
| I-2-1-2-2-1- Métabolisme glucidique..... | 23 |

| | |
|---|----|
| A- Attaque du mannitol..... | 23 |
| B- Fermentation des sucres en milieux TSI..... | 23 |
| I-2-1-2-2-Etude de métabolisme d'acide organique..... | 24 |
| -Utilisation de citrate de simmons..... | 24 |
| I-2-1-2-2-3-Métabolisme protéique..... | 24 |
| A- Recherche d'uréase..... | 24 |
| B- Recherche d'indole..... | 25 |
| C- Dégradation des acides aminés..... | 26 |
| I-2-1-2-2-4-Recherche de nitrate réductase..... | 27 |
| I-2-2-Séparation des flavonoides constituants de la propolis..... | 28 |
| ❖ Chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 28 |
| • Relation fluorescence- structure..... | 28 |
| • Relation RF- structure..... | 29 |
| I-2-3-Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis..... | 30 |
| I-2-3-1-Préparation du dilutions de l'extrait éthanolique de la propolis | 30 |
| I-2-3-2-Préparation du milieu de culture..... | 31 |
| I-2-3-3- Préparation de l'inoculum | 31 |
| I-2-3-4-Ensemencement par inondation..... | 31 |
| I-2-3-5-Test de l'antibiogramme..... | 31 |
| II- Résultats | |
| II-1- Identification des souches d' <i>E.coli</i> | 32 |
| II-2 -Séparation des flavonoides par la Chromatographie sur couche mince..... | 33 |
| II-3-Evaluation de l'activité antibactérienne de l'EEP..... | 35 |
| • Sur les <i>Streptocoques</i> | 35 |
| • Sur les <i>Salmonelles</i> | 37 |
| • Sur les <i>Staphylocoques</i> | 38 |
| • Sur <i>Escherichia coli</i> | 40 |
| • Sur <i>Klebsiella</i> | 42 |
| • Sur <i>Proteus</i> | 43 |
| • Sur <i>Pseudomonas</i> | 44 |
| III- Discussion | |
| III-1- Séparation des flavonoides par la Chromatographie sur couche mince..... | 46 |
| III-2- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'EEP..... | 46 |
| Conclusion | 48 |
| Références bibliographiques..... | |
| Annexe..... | |

Liste des Abréviations

| | |
|----------------|------------------------------------|
| ADH : | Argénine dihydrolase |
| C : | Carbone |
| C° : | Degré sessus |
| C. Bio: | caractères biochimiques |
| CCM: | Chromatographie sur couche mince |
| Cit: | Citrate |
| CMI: | Concentration minimale inhibitrice |
| DO: | Densité optique |
| EEP: | Extrait Ethanolique de la propolis |
| Géla: | Gélatinase |
| Glu: | Glucose |
| H: | Heure |
| H: | Hydrogène |
| Ind: | Indol |
| Inos: | Inositol |
| Lac: | Lactose |
| LDC: | lysine décarboxylase |
| Lécit: | Lécitinase |
| Man: | Mannitol |
| mg/ml: | Milligramme par millilitre |
| min: | Minute |
| ml: | Milli litre |
| mm: | Milli mètre |
| Mob: | Mobilité |
| Nit: | Nitrate |
| nm: | nanomètre |
| O: | Oxygène |
| ODC: | Ornithine décarboxylase |
| Oxy: | Oxydase |
| pH: | Potentielle hydrogène |
| R: | Radical |
| RF: | Rapport frontal |
| Raff: | Raffinase |
| S: | Souche |
| Sacch: | Saccharose |
| T°: | Température |
| TDA: | Tryptophane désaminase |
| Urée: | Uréase |
| UV: | Ultra-violet |

Liste des tableaux

| | Page |
|---|------|
| Tableau 1 : Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i> | 15 |
| Tableau 2 : Caractères biochimiques de <i>klebsiella pneumoniae</i> | 15 |
| Tableau 3 : Caractères biochimiques de <i>proteus</i> | 16 |
| Tableau 4 : Caractères biochimiques de <i>salmonella</i> | 17 |
| Tableau 5 : Caractères biochimiques de <i>pseudomonas aeruagénosa</i> | 17 |
| Tableau 6 : Caractères biochimiques de <i>streptocoques</i> | 18 |
| Tableau 7 : Caractères biochimiques de <i>S.aureus</i> et <i>S.épidermis</i> | 19 |
| Tableau 8 : Relation structure- fluorescence..... | 29 |
| | : |
| Tableau 09 : Les différentes dilutions de la solution mère..... | 30 |
| Tableau 10 : Profils d'identification biochimiques d' <i>E. coli</i> | 32 |
| Tableau 11 : Chromatographie sur couche mince de l'EEP..... | 33 |
| Tableau 12 : Détermination de la CMI des souche de <i>streptocoques</i> | 35 |
| Tableau 13 : Détermination de la CMI des souche de <i>salmonelles</i> | 37 |
| Tableau 14 : Détermination de la CMI des souche de <i>staphylocoques</i> | 38 |
| Tableau 15 : Détermination de la CMI des souche d' <i>E. coli</i> | 40 |
| Tableau 16 : Détermination de la CMI des souche de <i>klebsiella</i> | 42 |
| Tableau 17 : Détermination de la CMI de la souche de <i>proteus</i> | 43 |
| Tableau 18 : Détermination de la CMI de la souche de <i>pseudamonas</i> | 44 |

Liste des figures

| | Page |
|--|-------------|
| Figure 1 : Récolte par l'apiculteur . | 3 |
| Figure 2 : Récolte par les abeilles | 3 |
| Figure 3 : Composition chimique de la propolis. | 7 |
| Figure 4 : Protocole de l'extraction des principes actifs de la propolis. | 8 |
| Figure 5 : Origine biosynthétique des flavonoïdes | 12 |
| Figure 6 : Les différentes dilutions de la solution mère | 30 |
| Figure 7 : Profil d'identification biochimique d' <i>E. coli</i> | 32 |
| Figure 8 : Chromatographie sur couche mince de l'EEP | 34 |
| Figure 9 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de <i>Streptocoques</i> en fonction de la souche et des dilutions | 35 |
| Figure 10: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 1 de <i>Streptocoques</i> isolée de l'eau et la souche 2 des <i>Streptocoques</i> isolée des mamelles de bovidés. | 36 |
| Figure 11 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 3 et 4 de <i>Streptocoques</i> isolées des mamelles de bovidés. | 36 |
| Figure 12 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de <i>Salmonelles</i> en fonction de la souche et des dilutions | 37 |
| Figure 13 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 3 de <i>Salmonelles</i> isolée des différentes organes des volailles | 38 |
| Figure 14 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de <i>Staphylocoques</i> en fonction de la souche et des dilutions | 39 |
| Figure 15 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 1 de <i>Staphylocoques</i> (<i>S. épidermis</i>) isolée de pus et la souche 3 de <i>Staphylocoques</i> (<i>S.aureus</i>). isolée d'un prélèvement vaginale. | 39 |
| Figure 16 : Diamètres des zones d'inhibition des souches d' <i>E.coli</i> en fonction de la souche et des dilutions | 40 |
| Figure 17 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 3 et 4 d' <i>E. coli</i> isolées des urines | 41 |

- Figure 18 :** Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 5 *d'E. coli* isolée de foie de volailles. 41
- Figure 19 :** Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Klebsiella* en fonction de la souche et des dilutions 42
- Figure 20 :** Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 1 et 2 de *Klebsiella* isolées de sperme. 43
- Figure 21 :** Diamètres des zones d'inhibition de la souche de *Proteus* en fonction de la souche et des dilutions 44
- Figure 22 :** Diamètres des zones d'inhibition de la souche de *Pseudomonas* en fonction de la souche et des dilutions 45

Introduction

Introduction :

Beaucoup de chercheurs dans le monde entier, se sont retournés vers la nature pour la découverte de nouveaux principes actifs moins toxiques comme : les flavonoides, les huiles essentielles et les alcaloides.

Les flavonoides sont des métabolites secondaires produits juste après la phase de croissance lorsque les conditions de la vie sont défavorables. Ils peuvent agir sur la croissance des germes en interférant avec leur métabolisme énergétique ou en inhibant la biosynthèse des composants cellulaires. [12] Ces produits peuvent être d'origine végétale ou animale.

Parmi les substances d'origine animale, on cite la propolis des abeilles [54].

Des études précédentes ont démontré, que cette substance naturelle est essentiellement composée des flavonoides qui lui donnent la propriété pharmacologique : propriété antibactérienne, propriété antivirale, propriété antioxydant et propriété antifongique [51].

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'activité antibactérienne de la propolis Algérienne provenant de la région de Kaous et de déterminer in-vitro, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait brut de cette propolis sur différentes souches bactériennes isolées de différents produits pathologiques.

Première partie

Etude bibliographique

Chapitre I

La population

I-La propolis :

I-1- Définition :

La propolis est un produit à ne pas négliger car son importance comme matière primaire, croît de jour en jour. Elle se définit comme un ensemble de matières résineuses, gommeuses, balsamiques et aromatiques, qui existe depuis que l'abeille est apparue sur terre, elle est employée à la 1^{ère} fois par les égyptiens, puis par les anciens grecs qui avaient sans doute constaté que certaines races d'abeilles réduisaient l'entrée de la ruche avec une résine végétale, pour défendre leur colonie et constitue une véritable barrière de défense située en arrière de trou de vol destiné à contrôler l'arrivée d'éventuels ennemis d'où le nom de la propolis : pro, qui signifie : en avant et de polis : la ville, communauté ou cité.

En outre, ce produit utilisé par les abeilles à de nombreux fins :

- Pour calfeutrer les fissures de la ruche et assurer son étanchéité à l'eau, fixer les cadres et consolider les cellules [7, 10, 16, 24, 38].
- Pour construire des sortes de chicanes à l'entrée de la ruche, elles permettent de barrer l'entrée aux rongeurs et en sphynx « tête-de-mort », gros papillon amateur de miel [24].
- Pour vernir l'ensemble des surfaces à l'intérieur de la ruche à fin d'en supprimer les aspérités [58].
- Pour réduire la largeur du trou de vol [7].
- Pour recouvrir d'une très fine pellicule les nouveaux rayons ainsi que l'intérieur des cellules avant que la reine devienne Y pondre, ce qui constitue une désinfection efficace et pour donner la coloration et l'odeur de la cire [36, 7].
- Enfin, la propolis est utilisée pour recouvrir les animaux qui auraient pénétrés à l'intérieur de la ruche et auraient été tués par les gardiennes. Comme elles n'ont pas la force de les transporter à l'extérieur, elles choisissent de les embaumer pour éviter la putréfaction des cadavres [7,24].

I-2-Origine :

L'origine de la propolis est complexe, elle peut être soit d'origine externe ; la récolte sur les bourgeons d'arbres : les bourgeons de bouleaux, ormes, aulnes, saules, chênes, marronniers d'inde, frênes et les écorces des épicéas, des pins, des sapins, et plusieurs espèces de peupliers, fournissent aux abeilles les meilleurs sources de propolis[11, 16]. Soit interne : régurgitation des substances résineuses provenant des pollens [16].

Les différentes origines de la propolis expliquent sa grande variabilité de couleur et d'odeur ainsi que l'inconstance de son activité biologique [27, 36, 44].

I-3-La récolte:

I-3-1- Par l'apiculteur :

L'apiculteur pour qui la propolis représente souvent un gêne dans son travail, se contente de gratter les têtes de cadres, parfois il prend la peine de la recueillir mais cette propolis de raclage n'est pas d'une qualité optimale, car elle contient de la cire, des particules de bois et de métal de plus, elle peut être assez vieille (très sombre) et partiellement dégradée. Pour une récolte systématique, il est recommandé d'utiliser une grille à propolis, constituée de nombreuses petites interstices que l'abeille va chercher à combler cette grille est placée sur la tête Des cadres souvent après la récolte. A ce moment la température sera diminuée et la propolis sera abondante et nouvelle.

Pour récolter il suffit d'enlever la grille et de la placer dans un réfrigérateur ou un surgélateur. Au froid la propolis devient cassante et la torsion de la grille décrochera les petits morceaux. Elle est donc utilisable et peut être commercialisée sous cette forme brute [24].

Figure 1

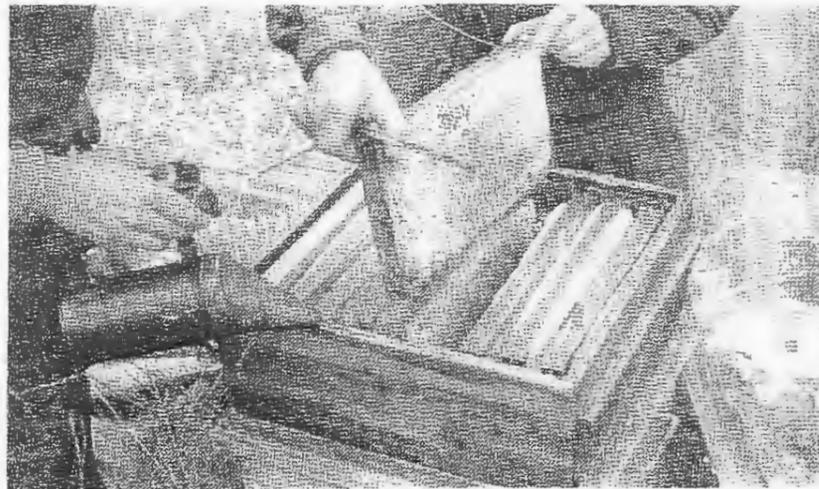


Figure 1 : La récolte par l'apiculteur [24]

I-3-2- Par les abeilles:

Les abeilles récoltent de la propolis ou tout au moins une certaine résine, sur les bourgeons des arbres, et transportent cette matière en boulettes dans les corbeilles de leurs pattes postérieures exactement comme pour le pollen [11, 16, 27, 38, 47]. Cette récolte de propolis a eu lieu aux moments les plus chauds de la journée ou le soleil est le plus chauds que les abeilles [16]. **Figure 2**



Figure 2 : La récolte par les abeilles [24]

I-4- Propriétés biologiques:**I-4-1- Propriétés antibactériennes:**

La propolis possède une activité antibactérienne étudiée par Kil VAKIMA (1984) et HAMBETON puis par Vergé. Leur travail a démontré un résultat positif sur *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus prodigiosus* et une grande sensibilité des staphylocoques blancs et dorés et des bacilles pyocyaniques. Au contraire il n'obtient pas d'action sur toute une série de *Salmonella*, une série d'*Escherichia* et trois *Proteus*, mais les recherches les plus intéressantes sur les antibiotiques de la propolis sont celles de deux Tchèques FEUCREIL et KRAVS (1985). Ces auteurs ont montré l'activité des divers extraits de cette substance sur plusieurs souches de bacilles de la tuberculose.

KARINOVA et RODIANOVA ont publié en 1963 un travail effectué à l'institut de médecine de l'état de Kazan sur l'effet de la propolis sur la tuberculose pulmonaire [16, 55], généralement les bactéries Gram (+) sont les plus sensibles de la propolis que les bactéries Gram (-) [3, 22, 23, 26].

I-4 -2- Propriétés antifongiques :

L'action de la propolis a été étudiée par LIZMART et TRUPL sur différentes levures. Les résultats de cette étude montrent que la propolis exerce une nette inhibition sur le développement de certaines levures ainsi que les moisissures (*Penicillium*, *Pericystis apis*) [13, 15, 40, 42].

Ces résultats étaient aussi vérifiés par DOBROWOLSKI et AL, qui ont observé son activité fongicide essentiellement contre les dermatomycoses [20]. LILENBAUM et BARBOSA observaient l'effet fongistatique et fongicide de la propolis surtout la susceptibilité des levures à ce produit [37].

I-4 -3- Propriétés antivirales :

La propolis possède une activité antivirale sur certaines espèces de virus pathogènes des plantes comme par exemples le virus des mosaïques du concombre provenant de *Phytolacca americana*, virus des taches du tabac et celui de la nécrose du tabac provenant de *Evoryms europea* qui semble être le plus sensible [1, 2, 13, 40, 50, 53].

I-4 -4- Propriétés antioxydantes :

L'activité antioxydante de la propolis liée à la concentration des flavonoïdes, dont ils sont capables de détruire les antiradicaux qui à leur tour protègent les lipides et autres substances comme la vitamine C [62].

I-4 -5 - Propriétés cicatrisantes :

La propolis possède une propriété cicatrisante par un effet stimulant le métabolisme cellulaire, la circulation et la formation du collagène. Les processus de prolifération de l'épithélium au sein du chancre de la peau brûlée et une régénération active de plaie [11, 62].

I-4 -6 - Propriétés immunitaires :

La propolis démontre une très grande activité immunitaire sur certains virus (MONOLOVA et AL 1987). Récemment, les chercheurs Japonais ont démontré que les extraits de la propolis sont responsables d'activation macrophagotique en activant les réponses immunitaires qui commencent à produire les cytosines, les résultats montrent que l'effet de la propolis empêche le développement des cellules tumorales [44, 62].

I-4 -7 - Propriétés anticancéreuses :

L'extrait alcoolique de la propolis est capable de transformer (in vitro) les cellules humaines de l'hépatite et de carcinome, et elle est capable de les inhiber (MASTSUONO, 1992), les substances isolées de la propolis qui ont cet effet cytotoxique sont la quercétine, l'acide caféique et la clérodance dytherpénoïque. Cette dernière montre une particulière et sélective toxicité sur les cellules des tumeurs [62, 43].

I-4 -8 - Propriétés anesthésiques :

La propolis avec ses composants est un très puissant anesthésique, les études ont démontré que cette résine est trois fois plus anesthésique que la cocaïne et 52 fois plus puissante que la procaine suivant les tests sur les cornées du lapin (RODE 1977, GHISALBERTI 1979).

L'effet anesthésique est due à la pinocembrine, l'acide caféique aux composants des esters de la propolis [16].

En outre, la propolis possède d'autres propriétés biologiques:
Anti-tumorales, anti-germinatives, anti-inflammatoires, anti-protazoaires
[9, 11, 16, 26, 38, 40].

I- 5 - Usages thérapeutiques :

La propolis est utilisée par les hommes avant tout par ses propriétés thérapeutiques, car ses composants possèdent une grande variété biologique et pharmacologique [62].

I-5-1 - Les Affections respiratoires :

Dans le traitement des affections broncho-pulmonaires et de la sphère ORL , la propolis a un vaste champ d'action , elle est un produit partiellement indiqué dans :

- Les affections respiratoires, notamment pour diminuer la fréquence et l'intensité des crises d'asthme
- Les traitements classiques de la tuberculose
- Les traitements contre les bronchites chroniques
- Les affections oto- rhino- laryngologiques [11].

I-5-2- Les affections digestives touchant le foie :

Par son activité antivirale, la propolis donne également d'excellents résultats dans le traitement de l'hépatite virale [11].

I-5-3- Les rhumatismes:

L'extrait de la propolis est doté de puissants effets anti-inflammatoires et analgésiques, qui peuvent soulager l'arthrite rhumatoïde.

- L'association propolis-cire prise par voie orale, donne également d'excellents résultats dans tous les types d'arthroses, maladies génératives des articulations[11].

I-5-4- Les affections cardio-vasculaires:

- Les effets croisés de la propolis, gelée royale et de pollen sont particulièrement bénéfiques contre l'hypercholestérolémie et la triglycéridémie.
- Un mélange a base de propolis, de pollen et de miel améliore le système antioxydant du sang, rééquilibre le métabolisme lipidique et restaure l'état neurologique général [11].

I-5-5- Les affections de la peau et la cicatrisation des plaies :

- Une pommade constituée d'un mélange de propolis, la cire et la gelée royale permet d'atténuer la sécheresse de la peau, favorise la cicatrisation des fissures et empêche l'épiderme de peler.

- Elle guérit les pyodermes profondes (infections cutanées avec formation de pus), Les mycoses cutanées, les furonculoses, ainsi que les escarres qui se développent chez les personnes alitées durant de longues périodes.

- Dans le cas des diabétiques, chez qui la cicatrisation des plaies est compliquée par ulcération chronique. La propolis est un remarquable "nettoyeur" aux vertus détersives, elle stoppe la suppuration, permet la régénération tissulaire et l'apparition de nouveaux vaisseaux, favorisant ainsi l'oxygénation des tissus et leur développement [11].

I-5-6 - Les affections ophtalmiques :

Pour ce type d'affection, la propolis est également recommandée en raison de son rôle protecteur dû à l'action des flavonoïdes. Les fortes myopies, blépharites, kératites microbiennes ou virales ainsi que les brûlures et les traumatismes oculaires seront efficacement combattus par l'onguent de propolis et solutions ophtalmiques à base de propolis [11].

I-5-7 Les affections génito-urinaires :*** Chez la femme :**

Les composés phénoliques très actifs de la propolis sont particulièrement utiles pour détruire les germes présentes dans certaines inflammations urinaires, et éliminer les cellules mortes de la surface des muqueuses et les remplacer par les cellules saines.

-La propolis soulage également les symptômes de la pyélonéphrite chronique, affection inflammatoire d'origine bactérienne [11].

*** Chez l'homme :**

Dans le cas d'infection, d'inflammation, d'hypertrophie bénigne ou dans l'adénome de la prostate, la propolis donne des résultats étonnants, grâce à ses propriétés immunostimulantes, anti-bactériennes, anti-inflammatoires, anesthésiques et régénératrices [11].

I-5-8 Les affections gynécologiques et obstétriques :

- On utilise la propolis pour traiter les colpites (inflammation du vagin), les endocervicites (inflammation de la muqueuse interne du col utérin), les pseudo érosions à l'extrémité vaginale du col de l'utérus.

-La propolis est également une arme idéale contre *Trichomonas vaginalis*, un parasite redoutable qui peut infecter la femme sexuellement mature [11, 6].

I-6 Autres utilisations de la propolis :

On utilise la propolis pour cacheter les bouteilles, pour cirer le matériel apicole, dans la fabrication des vernis pour l'instruments de musique, c'est un excellent produit antirouille. Elle est également utilisée pour la fabrication des produits cosmétologiques : lotions pour la peau, crème de beauté, savons (savon au miel et la propolis 250 g - parfum verneine). Champings, dentifrices, rouges à lèvres, chewing-gums, et même crèmes solaires [11, 24, 28, 40].

I-7 Les propriétés physico-chimiques :

La propolis est une substance résineuse , aromatique dont la température de fusion se situe autour de 64 - 69°C, insoluble dans l'eau , elle est soluble dans l'éther , dans l'alcool a chaud , l'ammoniaque l'essence de térébenthin et la potasse. Sa couleur dépend des plantes dont elle est issue : jaune rougeâtre, cendrée, verdâtre .

Lorsque les abeilles travaillent la propolis, elles ajoutent de la cire pour la rendre plus molle et plus malléable .la résine aromatique récoltée par les abeilles pour élaborer la propolis devient envieillissant, plus foncée et plus dure [7, 38].

I-8-Conservation:

Il est préférable de garder la propolis dans des récipients opaques bien fermés et a l'abri de la lumière et de la chaleur a une température qui varie entre 10–12°C . La lyophilisation maintient son activité anti-bactérienne [33, 38].

I-9 -Composition :

La composition chimique de la propolis est variable selon ses origines multiples, la zone géographique dans la quelle se trouve et selon l'espèce d'abeille et du temps de récolte. On y retrouve cependant toujours des résines (substances collantes et imperméables, des baumes, des huiles essentielles, de la cire, un peu de pollen et des éléments divers) [11, 33, 62]. **Figure 3**

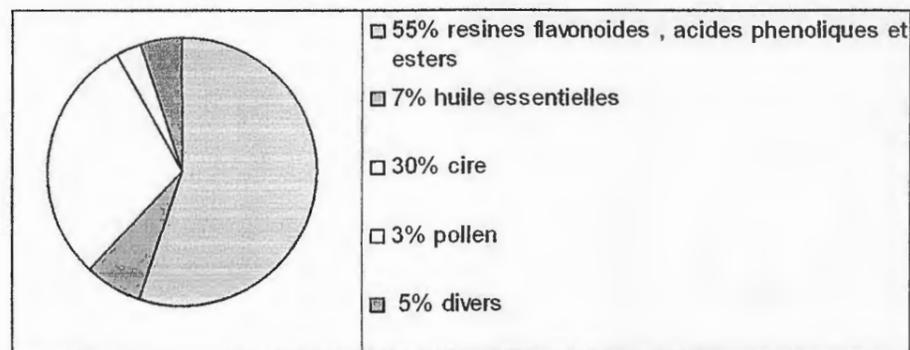


Figure 3: Composition chimique de la propolis[11]

Les composés de la propolis jouent un rôle important dans l'activité biologique. Les composants qui démontrent l'activité antibactérienne sont : la pinocembrine, galangine, acide caféique et l'acide férulique .

L'activité antifongique est démontrée par

la présence des substances comme : pinocembrine, pinobanksine, l'acide caféique, ester benzylique, sakuranetine, et le ptérosilbéne. L'activité antivirale de la propolis est due à la présence de l'acide caféique, du lutseoline, du la quercétine (schmidt et buchman) [62].

I-10- l'extraction :

La propolis est coupée en petits morceaux et mise ans un récipient. Si elle est trop molle, elle est placée au réfrigérateur pendant quelques heures puis coupée par la suite. On prend 30g de la propolis et la additionnée de 100 ml d'éthanol à 90° puis laissée pour macération pendant 07 jours, avec agitation de temps en temps. Le mélange est filtré sur papier filtre ou du coton (10 fois). Le filtrat est en suite évaporé en utilisant le rotavapeur. (Sforcin et al 1995). [52]

Enfin le filtrat est évaporé pour obtenir l'extrait brut. **Figure 4**

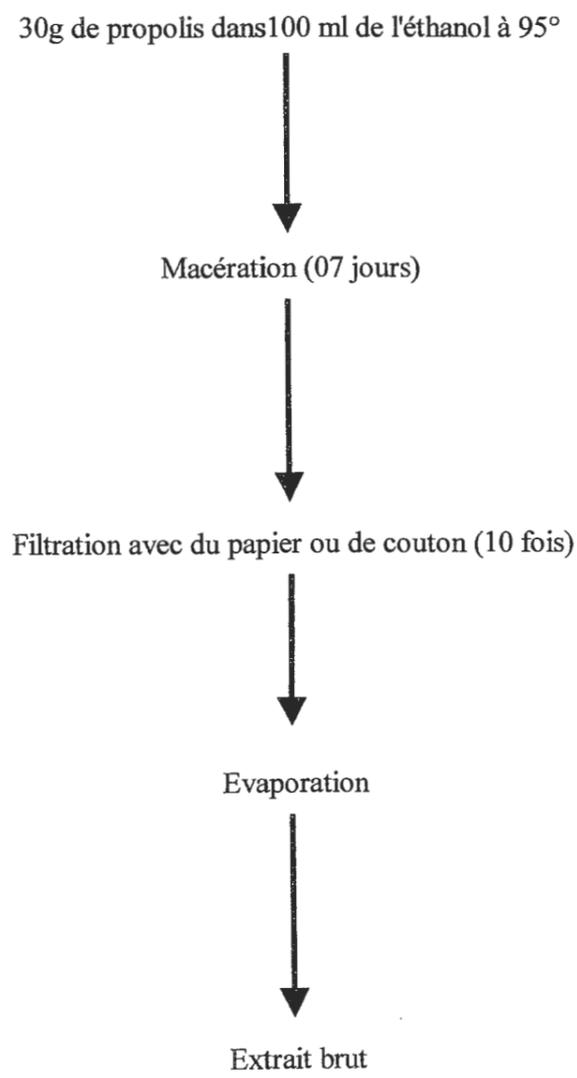


Figure 4 : Protocole d'extraction des principes actifs de la propolis (Sforcin et al 1995) [52].

Chapitre II

Les flavonoïdes

II - Les flavonoïdes :

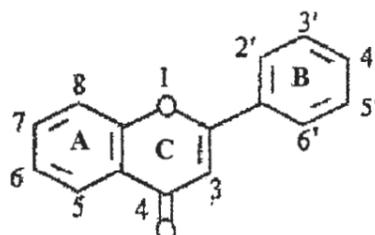
Le monde animal est très concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, la quercétine et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes la fabriquent à partir des sécrétions des bourgeons de nombreux arbres, comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa et le sapin, et la modifient par leurs enzymes salivaires [54]. Il y a aussi une autre origine des flavonoïdes qui est végétale (racines, tiges, feuilles, bois, pollens, nectar, écorce, graines, fleurs et fruits) [61].

Plusieurs chercheurs ont démontré que l'activité thérapeutique ou antibactérienne de la propolis dépend de la présence des flavonoïdes [30, 31].

II-1- Définition :

Les flavonoïdes (appelés parfois phénylchromones) sont des composés phénoliques dont beaucoup sont des pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs, de certains fruits et parfois des feuilles.

L'élément commun de ces composés est d'être rattachés à un noyau de base : phényl-2-chromane [8, 10, 46].



Phényl - 2- Chromane :

Le terme de flavonoïdes pris dans son sens le plus large s'applique à des structures très diverses :

- ❖ Phényl-2- benzopyryliums (flaviliums) : anthocyanes
- ❖ Phényl-2- chromones :- Flavonones et dihydroflavonols
 - Flavones flavonols et leur dimères
- ❖ Phényl-2- chromanes (flavanones) : - flavanes
 - Flavan-3-ol, flavan-3,4-diols
- ❖ Chalcones : forme isomères ouverts des flavanones
- ❖ Benzylidène-2-coumaranones : aurones [8, 10].

Certains auteurs appliquent indifféremment le terme de Flavonoïde à tous ces composés. Si l'on peut effectivement -Compte tenu de l'homogénéité structurale parler de flavonoïde (lato sensu) pour ce vaste ensemble, nous préférons séparer ici pour tenir compte de leur comportement et de leurs propriétés particulières. Les dérivés flavaniques des anthocyanosides et les isoflavonoïdes et conserver l'appellation de flavonoïdes (stricto sensu) pour les flavones, les flavonols, leurs dérivés- 2,3 -dihydrogénés, leur dimères, les aurones et chalcones [8].

II-2- Constitutions chimiques et classification: [8,61]**II-2-1 Genines :**

Les genines sont des dérivés poly hydroxylés méthoxylés ou méthylés de la chromone ou benzo γ pyrone.

On distingue :

II-2-1-1- flavones, flavonols :

Chez ces molécules elles représentent la majorité des flavonoïdes stricto sensu connus le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et en C₇, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosodique. Un troisième hydroxyle libre chez les chalcones est à l'origine de l'autome d'oxygène du cycle pyranique des autres flavonoïdes et de l'autome d'oxygène, et celui de cycle furanique des aurones.

Le cycle B est substitué dans la majorité des cas (80%) en C_{4'}, 4', 5' - tri substitué ; les substituants sont des groupes -OH ou -OCH₃

Exemple :

- ❖ Genine flavone :
 - R=H apigénine
 - R =OH lutéol
- ❖ Genine flavonol :
 - R=H kaempféline
 - R =OH quercétol

II-2-1-2- flavanones et dihydroflavonols:

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2.3 et la présence de centres l'asymétrie, chez les flavanones le carbone C₂ est normalement de configuration 2S, et pour les dihydroflavonols, si le C₃ est substitué la configuration est habituellement (2R.3R).

Exemples:

- ❖ Genine flavanone.
 - R=H naringétonine.
 - R=OH eriodictyol.
- ❖ Genine dihydroflavonol:
 - R=H dihydrokaempféline
 - R=OH dihydroquercétol.

II-2-1-3 - Biflavonoïdes:

Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones C₆ ou C₈, il se forme alors un dimère: un biflavonoïde.

La liaison interflavonique peut être de type carbone- carbone:

- ❖ C_{3'} - C_{8'} Ex: amentoflavone.
- ❖ C₆ - C_{8'} Ex: agathisflavone.
- ❖ C₈ - C_{8'} Ex: cupressuflavone.

Ou de type carbone- oxygène- carbone.

- ❖ C₆-O-C₄ Ex: hinokiflavone.

II-2-1-4- Chalcones- Aurones:

Les chalcones sont des isomères des flavonones avec l'ouverture du cycle pyranique sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique.

Les aurones sont des isomères des flavonones à hétérocycle pentagonal (benzylidène-2-coumaranone).

Exemple:

- ❖ les chalcones:
 - R=H isoliquiritigénine.
 - R=OH butéine.

II-2-2- les oses:

La partie osidique peut être très simple, réduite à un ose banal (D-glucose, D-galactose, L-rhamnose et parfois le D-xylose, L-arabinose) ou oligosides:

- ❖ Disaccharidiques:
 - Rutinose: α - rhamnosyl-(1-6)- β - D- glucose.
 - Sophorose: β - D - glucosyl-(1-2) - β - D- glucose
 - Néohesperidose: α - rhamnosyl- (1-2)-B, D-glucose

- ❖ Trisaccharidiques: linéaires (gentiotriose, sophorotriose) ou branchés (glucosyl -2-néohesperidose)

Il n'est pas exceptionnel que la chaîne sucrée soit acylée par acide aliphatique (acétique, malonique.....) ou aromatique (gallique, benzoïque, 4coumarique...)

II-3- Biosynthèse:

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation catalysée par la chalcone- synthase, de trois molécules de malonyl- COA avec un ester de coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4- coumaroyl- coenzyme A, le produit de la réaction est une chalcone la 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone.

Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone, en fait; la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme la chalcone- isomérase, qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle.

Une dioxygénase, la flavanone-3-hydroxylase a été isolée, catalysant l'hydroxylation en C₃ des flavanones, produisant des dérivés 2,3- dihydrogénés, c'est sur ces derniers qu'agit ensuite la flavonol-synthase: cette dioxygénase fonctionne comme la précédente, en présence de l'oxoglutarate, elle induit la double liaison entre les carbones C₂ et C₃.

Des enzymes très proches ; les flavones-synthases I et II transforment les flavanones en flavones par introduction comme précédemment d'une double liaison entre les carbones C₂ et C₃.

La formation de la (ou des) liaisons hétérosidiques est sous la dépendance de transférases également spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation: elle nécessite la présence d'uridine diphospho- oses (UDP- oses) [8, 10, 25].

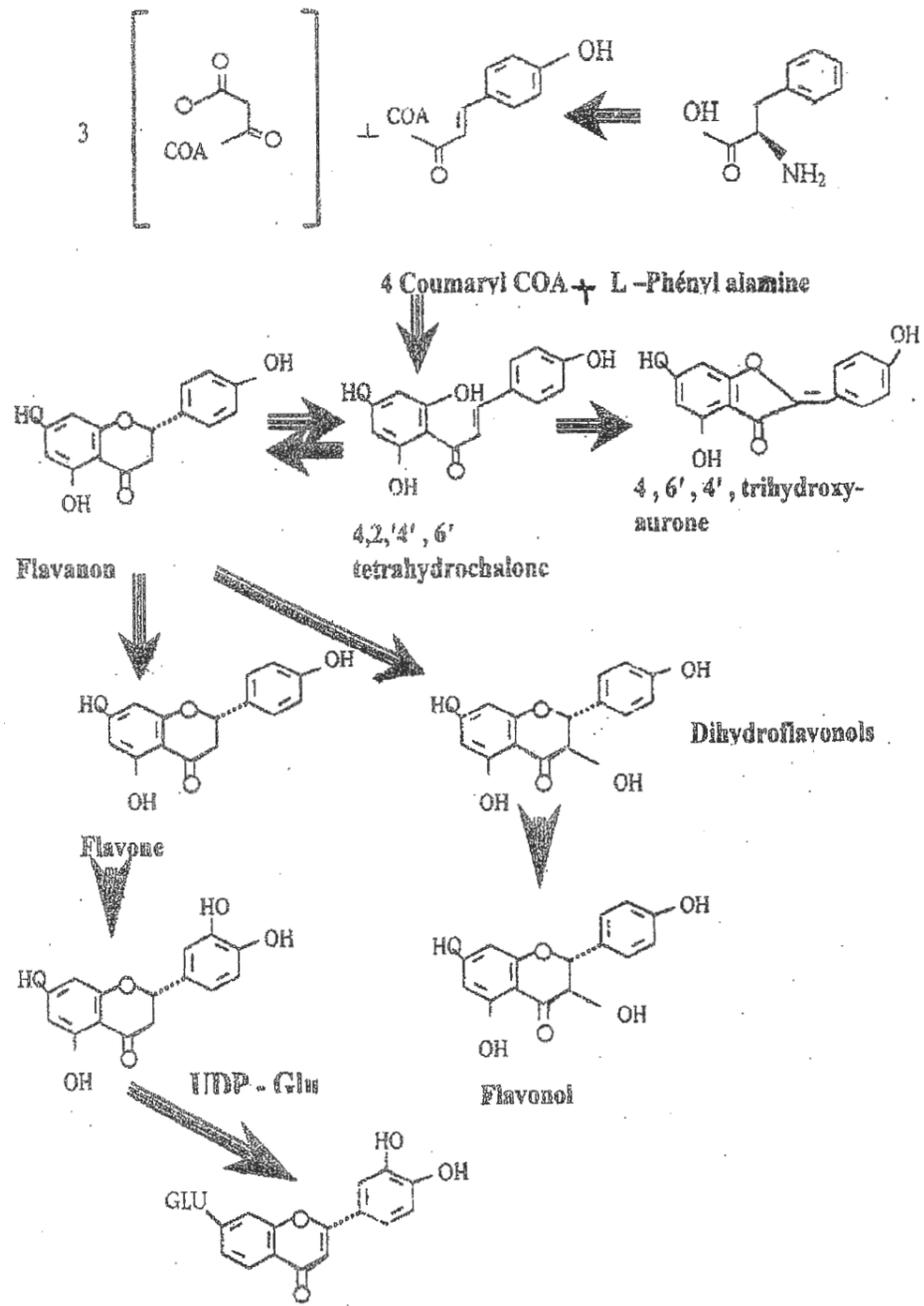


Figure 5 : origine biosynthétique des flavonoïdes[8]

II-4- Propriétés biologiques:

Souvent présentés comme anti- inflammatoires. Ce qui est compatibles avec ce qui est connu de leurs interactions (in vitro) avec les polynucléaires et les thrombocytes ou encore avec le métabolisme de l'acide arachidonique.

Les flavonoides peuvent être anti- allergiques, anti- thrombotiques hepatoprotecteurs, Antispasmodiques sur l'iléon, hepocholesterolemiant, antibactériens, antiviraux, anti-fongiques. Un petit nombre d'entre eux sont anti- concérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales in vitro[10,59].

II-5- Propriétés pharmacologiques:

Pendant de nombreuses années, les techniques d'analyses des flavonoides ont manqué de sensibilité et de spécificité. Ce qui rendait impossible leur dosage dans les milieux biologiques et mettait en doute leur absorption digestive, l'amélioration des techniques et le marquage moléculaire ont permis de mieux connaître le devenir des flavonoides dans l'organisme.

Les flavonoides sont des composés à poids moléculaires élevé à 600 KD. L'absorption digestive chez l'homme après administration orale est prouvée, elle est lente (5-9 heures) pour certains dérivés —> (rutoside).

Les flavonoides sont dégradés à l'intérieur du foie et par la microflore intestinale en de nombreux métabolites aglycones, ceux – ci étant conjugués au glucose, avant élimination.

La dégradation complète passe par un dé hydroxylation et une rupture oxydative de l'anneau benzyle et de l'hétérocycle [18]

II-6-Toxicité des flavonoides :

La toxicité des flavonoides est négligeable, toutes fois quelques dangers et inconvénients ont été signalés:

En cas d'administration de quantités importantes, des précipitations au niveau du foie et de rein ont été signalées, accompagnées d'induration et de réactions inflammatoires [60].

Des propriétés mutagènes ont été rapportées chez : *Salmonella thyphimurium* en particulier pour le quercétol, le kaempférol et d'autre dérivés hydroxylés en C₃ et arthodihydroxylés sur le noyau B. qui agissent par décalage du code génétique ; certaines dérivés substitués en 5, 7 et 8 agissent par substitution de paires de bases d'ADN [10].

Chapitre III

Les séries

III-Les bactéries

III-1- Les bacilles Gram négatifs :

III-1-1- Les entérobactériaceae :

La famille des entérobactériaceae est constituée des germes bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs:

- Ce sont des bacilles Gram négatifs dont les dimensions varient de 1 à 6 μm de long et 0,3 à 1 μm de large.
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles.
- Se développent en aéro- anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire.
- Acidifiant la gélose par voie fermentative avec souvent production de gaz.
- Ne possèdent pas l'oxydase.
- Réduisant les nitrates en nitrites [4].

Parmi les bactéries de cette famille, on peut citer:

3-1-1-1- *Escherichia coli*:

Isolée pour la première fois par ESCHERICHÉ en 1885, *E.coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire [4].

- **Habitat:**

E.coli est une espèce commensale de tube digestif de l'homme et des animaux, présente à raison de 10^7 à 10^9 corps bactérienne par gramme de selles [5]. La recherche d'*E.coli* dans l'eau d'alimentation est faite pour apprécier sa potabilité; la présence d'*E.coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et le rend impropre à la consommation [4].

- **Pouvoir pathogène :**

E.coli joue un rôle pathogène dans les infections urinaires, infections des biliaires et peut plus rarement être responsable de méningites, septicémies graves chez les nourrissons. On reconnaît aujourd'hui 04 types de souches responsables de diarrhées:

a- Les souches entéropathogènes: (entéropathogenic *E.coli*) (E.P.E.C.):

Elles sont responsables de diarrhées infantiles graves ou toxicoses survenant par des épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E.coli* (G.E.I.) (Gastro Entérites Infantiles). Ces Gastro Entérites provoquent des syndromes très sévères (fièvre, diarrhée, vomissement, douleurs abdominales) [4].

b- Les souches entérotoxigènes (enterotoxigenic *E.coli*) (E.T.E.C.):

Elles sont responsables de diarrhées très liquides. Ces diarrhées s'observent principalement chez les voyageurs [4].

c- Les souches entéroinvasives: (entéroinvasive *E.coli*) (E.T.E.C.):

Elles sont isolées des syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant, la présence de leucocytes (G.B) dans les selles et le témoignage du processus invasif [4].

d- Les souches entérohémorragiques (entérohémorragic *E. coli*) (E.H.E.C.):

Ces souches sont responsables de diarrhées aqueuses puis hémorragiques [4].

- **Caractères biochimiques [4, 32, 36]:**

Les caractères biochimiques d'*E. coli* sont représentés dans le tableau 1

Tableau 1 : Caractères biochimiques d'*E. coli*

| C.BIO. | Uré | Ind | Glu | Lac | Sacch | H ₂ S | Gaz | Mobi | Gela | VP | Inos | TDA | LDC | ODC | RM | Cit |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-------|------------------|-----|------|------|----|------|-----|-----|-----|----|-----|
| <i>E.coli</i> | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |

III-1-1-2- *Klebsiella*:

Klebsiella sont des entérobactériaceae toujours immobiles, possèdent généralement une capsule et fermentant de nombreux glucides [4].

- **Habitat:**

Les *Klebsiella* sont fréquemment isolées des eaux du sol et des végétaux. Elles sont présentées dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensale de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires [4].

- **Pouvoir pathogène :**

Klebsiella pneumoniae, 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 de pas divers [4].

- **Caractères biochimiques [4, 32, 36]:**

Les caractères biochimiques de *K. Pneumoniae* sont représentés dans le tableau 2

Tableau 2 : Caractères biochimiques de *K. Pneumonia*

| C.Bio. | Uré | Ind | Glu | Lac | Sacch | H ₂ S | Gaz | Cit | Man | RM | VP | Gela | ODC | LDC | ADH | TDA |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-------|------------------|-----|-----|-----|----|----|------|-----|-----|-----|-----|
| <i>K.pne</i> | + | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - |

III-1-1-3- *Proteus*:

Ces groupes d'entérobactériaceae rassemblent des espèces qui ont en commun de posséder des enzymes permettant la désamination oxydative des acides aminés en corps cétoniques. Ceux-ci forment des complexes colorés avec les ions Fe⁺⁺⁺ [4].

- **Habitat :**

Ce genre des entérobactériaceae est répandu dans l'environnement. On le trouve partout, sur le sol dans les eaux de surface, dans les eaux d'égout etc. C'est un hôte habituel de tube digestif de l'homme et des animaux [4].

- **Pouvoir pathogène :**

Bactéries responsables d'infection urinaire. Elles sont isolées de produits variés; sécrétions trochéo-branchiques, brûlure, pus divers. Des meningites à *Proteus* ont été décrites chez les nourrissons.

Ces *Proteus* sont souvent présentés en grande quantité dans les selles en provoquant des diarrhées [4].

- **Caractères biochimiques: [4, 32, 34]**

Les caractères biochimiques de *Proteus* sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères biochimiques de *Proteus*.

| C.BIO. | Uré | Ind | H ₂ S | Gaz | Cit | Man. | RM | VP | Géla | ODC | LDC | ADH |
|----------------|-----|-----|------------------|-----|-----|------|----|----|------|-----|-----|-----|
| <i>Proteus</i> | + | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + |

III-1-1-4- *Salmonella*:

Le genre *Salmonella* est l'un des 32 genres de la famille des entérobactériaceae, il est génétiquement proche des genres *Escherichia* et *Hafnia* et phénotypiquement proche des genres *Citrobacter* et *Hafnia*.

Les *Salmonelles* sont des bactéries pathogènes soit exclusivement pour l'homme comme: *Salmonella typhi* ou exclusivement pour l'animal comme: *Salmonella ovis*, *Salmonella suis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella aquinus*, *Salmonella abortus*, soit le plus souvent pour l'homme et l'animal [5].

- **Habitat**

Le réservoir de *Salmonella* est très large sont avant tout des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux après la maladie, certains sujets restent des porteurs sains et éliminent pendant plusieurs mois, des salmonelles sont trouvées dans le milieu extérieur, dans les eaux d'égout en particulier. Les salmonelles sont aussi fréquemment retrouvées dans les farines de poisson ou poudre d'os utilisées pour l'alimentation des animaux [5].

- **Pouvoir pathogène:**

Les *Salmonelloses* peuvent revêtir trois aspects:

1-Formes septicémiques:

Ce sont d'abord les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues aux sérotypes *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *B* ou *C* chez le nouveau-né et le jeune enfant.

2-Formes purement digestives :

Les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* se manifestant par des diarrhées des vomissements et de la fièvre. Les premiers signes surviennent 8 à 10 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé.

3-Formes extra digestives:

Elles sont plus rares, infections meningites ostéoarticulaires urinaires pulmonaires. Ces formes surviennent plus volontiers chez des malades immunodéprimés [4, 5].

- **Caractères biochimiques [4, 32, 36]:**

Les caractères biochimiques de *Salmonella* sont représentés dans le tableau 4

Tableau 4 : Caractères biochimiques de *Salmonella*.

| C. bio. | Uré | Ind | RM | VP | Man | Gaz | H ₂ S | Glu | Lac | Sacch | Gela | TDA | ODC | LDC |
|-------------------|-----|-----|----|----|-----|-----|------------------|-----|-----|-------|------|-----|-----|-----|
| <i>Salmonella</i> | - | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + |

III-1-2- Les *Pseudomonadaceae*:

- ❖ *Pseudomonas* :

Ce sont des bacilles Gram négatifs aérobies stricts mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés. Ils donnent des colorations bleu ou jaune verdâtre lors d'une culture sur gélose. Ce sont des bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire.

Généralement l'espèce pathogène pour l'homme est *P. aeruginosa* [4].

- **Habitat:**

Ces bactéries essentiellement répandues dans la nature; Saprophytes de l'eau, du sol humide, ou sur les végétaux. Comme ils peuvent vivre en commensaux du tube digestif de l'homme et divers animaux [4, 5, 48].

- **Pouvoir pathogène:**

Dans le genre *pseudomonas* l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille Pyocyanique est la première qui intéresse la santé publique.

Ce germe est bien connu en milieu hospitalier pour son pouvoir pathogène opportuniste: infections O.R.L., plaies, brûlures, nosocomiales pulmonaires, urinaires, septicémiques, méningées, ostéoarticulaires [4, 35].

- **Caractères biochimiques [4, 32, 36]:**

Les caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans le tableau 5

Tableau 5 : Caractères biochimiques de *P.aeruginosa*

| C. bio.. | Uré | Ind | RM | VP | H ₂ S | Glu | Lac | Sacch | Cit | Lécit | ADH | Gela | ODC | LDC | Oxy |
|---------------------|-----|-----|----|----|------------------|-----|-----|-------|-----|-------|-----|------|-----|-----|-----|
| <i>P.aeruginosa</i> | - | - | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | - | - | + |

III-2- Les Cocci Gram positifs :

III-2-1- *Staphylocoques* :

Les *staphylocoques* ont été découverts dans un pus par PASTEUR en 1880. En 1883, OGSTON a créé le nom « staphylocoque » pour décrire ces grains groupés en amas irréguliers à la façon d'un grappe de raisin (staphylos) et en 1884, ROSEMBAH a scindé le genre *staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées après qu'il a obtenu des cultures pures de ces bactéries [4].



◦ **Habitat :**

Staphylocoque est un germe ubiquitaire retrouvé dans le sol, l'air et l'eau . C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme, ou le trouve a l'état normal dans l'oropharynx, dans les selles. Un tiers des individus et porteurs de *S. aureus* au niveau de leurs fosses nasales [5].

◦ **Pouvoir pathogène:**

A - *Staphylococcus aureus*:

Les manifestations pathologiques dues à *S. aureus* sont nombreuses, elles sont très suppuratives et necroniques.

1 - Les suppurations localisées :

Elles peuvent être des infections cutanées (furoncle, abcès, panaris, anthrax, impétigo, infection ORL divers, staphylococcie maligne de la face.

Les infections des séreuses (arthrite, pleurésie, péritonite), les infections osseuses (ostéomyélite), les infections viscérales (abcès du poumon, abcès du cerveau).

2 -Septicémies et les endocardites :

L'incidence des endocardites à *S. aureus* c'est accru avec les prothèses valvulaires intracardiaques, les septicémies sont caractérisées par la fréquence des métastases par embolies septiques. Malgré l'antibiogramme, la mortalité reste élevée.

3 - Les manifestations digestives :

Les toxi-infections alimentaires survenant deux a six heurs après l'ingestion d'un aliment contaminé contenant l'enterotoxine staphylococcique thermostable. Elles sont caractérisées par des vomissements incoercibles chez un malade sans fièvre.

Les enterocolites staphylococciques consécutives à un traitement antibiotique (tétracyclines).

4 - Le syndrome de choc -toxique :

Ce syndrome associe une fièvre avec eruption scarlatinifore, hypotension et atteinte cérébrale, rénale, hépatique et musculaire [5].

B - *Staphylococcus épidermis* :

Les infection a *S.epidermis* se développent dans des circonstances particulières: affection sous -jacente, intervention chirurgical difficile, présence de prothèse cardiaque, valve de dérivation du liquide céphalorachidien chez les hydrocéphales [5].

◦ **Caractères biochimiques [4, 32]:**

Les caractères biochimiques des *S.aureus* et *S.épidermis* sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractères biochimiques de *S.aureus* et *S. épidermis*

| C. bio. | Uré | Glu | Lac | VP | Man | Sacch | ADH | Nit | RM |
|----------------------|-----|-----|-----|----|-----|-------|-----|-----|----|
| <i>S. aureus.</i> | d | + | + | + | + | + | - | + | - |
| <i>S. epidermis.</i> | d | + | - | - | - | + | - | - | + |

III-2-2 –Streptocoques:

Le genre *Streptococcus* rassemble des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères. Ce sont des Cocci Gram positifs sphériques ou ovoïdes disposés en paire pour former Des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes Par fois longues. Ils ne sporulent pas [4].

III-2-2-A- Streptocoques pathogènes :◦ **Habitat :**

Les *streptocoques* pathogènes sont ubiquitaires et plus fragiles, vivent à l'état commensal au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme (pharynx, nez, intestin, voies génitales) ou des animaux (mamelle des bovidés)[4]

◦ **Pouvoir pathogène**

Chez l'homme, elles sont responsables de septicémies, dermites, néphrites, érysipèle, scarlatine, méningites, infections urinaires et génitales, endocardites, pharyngites, et suppurations diverses.

Pour les animaux, elles sont responsables de mammites chez les bovidés [32].

III-2-2-B- streptocoques fécaux :

C'est un groupe de bactéries ayant la propriété commune de posséder l'antigène sérologique D (classification de LANCEFIELD).

Certains sont spécifiques de l'intestin de l'homme et / ou d'autres mammifères, alors que d'autres ont des habitats divers et quelques uns sont ubiquitaires. Le groupe des *streptocoques* fécaux est en réalise composé de *streptocoques* d'entérocoques [19]. Ils ont une très bonne résistance dans le milieu extra -intestinal [63] .

Caractères biochimiques des *streptocoques* : [4, 32, 36].

Les caractères biochimiques des *streptocoques* sont représentés dans le Tableau 7

Tableau 7 : Caractères biochimiques des *streptocoques*

| C-bio | Cat | Oxy | Nit | Géla | Lac | Glu | Raff | Sacch |
|----------------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-------|
| <i>Streptocoques</i> | - | - | - | - | + | + | + | + |

Deuxième partie

Etude expérimentale

Matériels méthodes

I - Matériels et méthodes

Des études précédentes ont démontré que l'extrait brut de la propolis répond à une activité anti-bactérienne très vaste.

L'Objectif principal de notre étude est d'approfondir cette étude et de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de cet extrait. Pour cela on a testé in vitro différentes souches bactériennes provenant de différents produits pathologiques, notre travail a été Réaliser au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel.

I-1- Matériels :

❖ Matériel bactériologique :

Notre travail a porté sur l'étude de 20 souches bactériennes

- ✓ 5 souches d'*E.coli* : 2 souches isolées des urines ont été obtenus de l'hôpital de Jijel (non identifiées) , 2 souches fournies au laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel a partir de foie de volailles et une souche de référence d'*E. coli* ATCC 25922, provenant de l'institut pasteur d'Alger.
- ✓ 3 souches de *Staphylocoques* : S₁ est une *S.épidermis*, S₂ et S₃ sont des *S.aureus* isolées de pus et de prélèvement vaginal au niveau de l'hôpital de Jijel
- ✓ 5 souches de *Streptocoques* : isolées de l'eau, et de mamelle des bovidés fournies au niveau de l'laboratoire de microbiologie de l'Université de Jijel.
- ✓ 2 souches de *Klebsiella* : isolées de sperme obtenues de l'hôpital de Jijel.
- ✓ Une souche de *Proteus* : isolée des selles au niveau de l'hôpital de Jijel.
- ✓ 3 souches de *Salmonella* : fournies a 'laboratoire de microbiologie de l'Université de Jijel à partir des différents. Organes des volailles.
- ✓ Une souche de *Pseudomonas aérugénosa* ATCC 27853, Provenant de l'institut pasteur d'Alger.

Les deux souches non identifiées qui ont été isolées au niveau de laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Jijel, on a fait des différentes testes pour les Identifier .Les autre souches ont été fournies déjà identifier.

❖ L'extrait de la propolis:

Notre travail a porté sur l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de la propolis provenant de la région de kaous.

Nous avons utilisé de propolis dont l'extraction a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de phytopharmacologie de faculté de science de l'université de Jijel.

❖ Milieux de culture :

On a utilisé de nombreux milieux :

- ✓ Gélose nutritif
- ✓ Gélose Hektoen
- ✓ Gélose Chapman
- ✓ Gélose Muller-Hinton : pour tester l'activité anti-bactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis sur les souches bactériennes utilisées
- ✓ Eau physiologique : pour la préparation de l'inoculum
- ✓ Bouillon nutritif : pour la revivification des souches
- ✓ Milieu mannitol mobilité

- ✓ Milieu TSI
- ✓ Milieu citrate de simmons
- ✓ Milieu eau peptone exempte d'indole
- ✓ Milieu urée indole
- ✓ Milieu nitrate
- ✓ Milieu Moeller a additionnée de : -Argentine
-Ornithine
-Lysine

❖ **Solvants et réactifs :**

- ✓ Ethanol a 60° : pour préparation des dilutions, 96° pour la CCM.
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ Kovacs : pour mettre en évidence la présence d'indole

- ✓ Nitrate réductase I
 - ✓ Nitrate réductase II
- } Pour mettre en évidence la présence de nitrate.
- ✓ Violet de gentiane
 - ✓ Lugol
 - ✓ Fushine
 - ✓ Huile de cèdre
- } Pour la réalisation de la coloration de Gram

❖ **Autres matériels :**

- ✓ Boites de pétri
- ✓ Pipettes pasteur
- ✓ Anse stérile
- ✓ Micropipettes
- ✓ Fil droit
- ✓ Tubes essai stériles
- ✓ Bec benzen
- ✓ Eppendoff
- ✓ Pipettes graduées (2 ml, 20 ml)
- ✓ Lames.
- ✓ Plaque de selice (10/20 cm) + cuve

❖ **Appareils utilisés :**

- ✓ L'étuve (37°C)
- ✓ Bain marie
- ✓ Agitateur.
- ✓ Microscope optique
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ Balance
- ✓ Lampe UV

I -2- Méthodes :**I-2-1 Méthode de l'étude bactériologique :****I-2-1-1 Purification des souches bactériennes :**

Les souches sont isolées sur différents milieux spécifiques :

- ✓ Les entérobactéries (*E. coli*, *salmonella*, *klebsiella*, *Proteus*) : sur le gélose Hektoen.
- ✓ *Streptococcus*, *pseudomonas* : sur gélose nutritif.
- ✓ *Staphylococcus* : sur gélose Chapman.

On les incube à 37° c pendant 24h.

I-2-1-2- Identification des souches utilisées : [21,28,29]

On définit les deux souches *d'E.coli* au niveau de laboratoire de microbiologie de faculté de science de l'université de Jijel.

I-2-1-2-1-Identification morphologique :

L'étude morphologique des bactéries a été basée sur la préparation d'un frottis coloré selon la méthode de coloration de Gram :

☒ -Coloration de Gram: [28]

- **But :**

Cette coloration permet de déterminer le mode de regroupement, la morphologie et l'affinité tinctoriale des bactéries.

- **Principe :**

La coloration de Gram dépend de la structure particulière de la paroi cellulaire de chacun des deux groupes des bactéries:

Les bactéries à Gram négatif ont une paroi composée d'une couche peptidoglycane peu épaisse, surmontée d'une couche très riche en lipides. Alors que les bactéries à Gram positif possèdent uniquement une couche de peptidoglycane.

Les colorants (violet de gentiane et lugol) pénètrent dans les deux types des cellules en formant des complexes qui peuvent être solubilisés par l'alcool. Chez les bactéries à Gram négatif, ces complexes formés par le violet de gentiane sont alors perdus, donc les cellules décolorées deviennent accessibles et absorbent la fuschine qui les recoloré en rose.

Par contre la paroi des bactéries à Gram positif garde leur coloration initiale violette.

- **Technique:**

- ✓ On a déposé une goutte de l'eau physiologique stérile sur une lame.
- ✓ On a prélevé une goutte de la suspension bactérienne puis on la étalé sur lame.
- ✓ On a laissé sécher en flambant léger ment jusqu'au séchage.
- ✓ La lame est recouvrir de solution de violet de gentiane
- ✓ On a laissé agir une minute (rincer par l'eau).
- ✓ On a ajouté lugol et on a laissé agir pendant une minute (rincer par l'eau).
- ✓ Décoloration de l'étalement bactérien par l'alcool pendant 30 secondes (rincer par l'eau).
- ✓ Coloration de la préparation par la Fushine dilué, on a laissé agir pendant une minute (rincer par l'eau).
- ✓ Séchage et observation à l'objectif ×100

- **Technique :**

On a ensemencé le milieu par piqûre centrale du culot au fil droit, suivi par des stries superficielles sur la pente, puis incubé à 37°C pendant 24 H .

- **Lecture :**

- ✓ A prés l'incubation; si le glucose est fermenté, le culot vire au jaune.
- ✓ La production du gaz est traduite par la formation des bulles du gaz dans la masse du milieu et contre les parois.
- ✓ Si le lactose est fermenté, la pente vire au jaune.
- ✓ Si les peptones et les acides animés sont dégradés la pente vire au rouge.
- ✓ Production des sulfures d'hydrogène (H₂S) aux dépens des acides aminés à radicale.
- ✓ La présence d'hyposulfite de sodium et du sulfate ferreux ammoniacal entraîne la formation de sulfure de fer qui est un composé de couleur noir.

I-2-1-2-2-2- Etude du métabolisme d'acide organique :

- Utilisation du citrate de simmons :

- **But :**

Le milieu citrate de simmons permet la recherche du citrate.

- **Principe :**

Certaines bactéries sont capables d'étuliser l'ion citrique comme unique source de carbone. De telles bactéries sont aptes à cultiver sur des milieux synthétiques dont la seule source de carbone est constituée par citrate de sodium. Cette croissance peut s'accompagne d'une libération d'ammoniaque d'où, le plus souvent, alcalinisation du milieu qui se traduit par le virage au bleu de l'indicateur (bleu de bromothymol).

- **Technique :**

On a ensemencé le milieu en surface par des stries longitudinales, et incubé à 37°C perdant 24H .

- **Lecture :**

- Citrate (+) : culture abondante avec bleuissement du milieu
- Citrate (-) : ni culture, ni bleuissement.

I-2-1-2-2-3- Métabolisme protéique :

A – Recherche d'uréase :

- **But :**

Ce test permet de déterminer les germes qui utilisent l'urée comme sources d'énergie (la présence d'urease).

- **Principe :**

Certaines bactéries possèdent une uréase très active transforment l'urée en ammoniac, et en carbonate d'ammonium.



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu décelable par un indicateur coloré.

- **Technique :**

On a fait une culture sur milieu urée indole puis on a incubé à 37°C pendant 24 H.

- **Lecture :**

✓ Le virage de l'indicateur de pH au rouge violacée prouve la dégradation de l'ammoniac et production de carbonate d'ammonium qui induisent l'alcalinisation du milieu, uréase (+).

✓ Pas de changement de teinte, uréase (-).

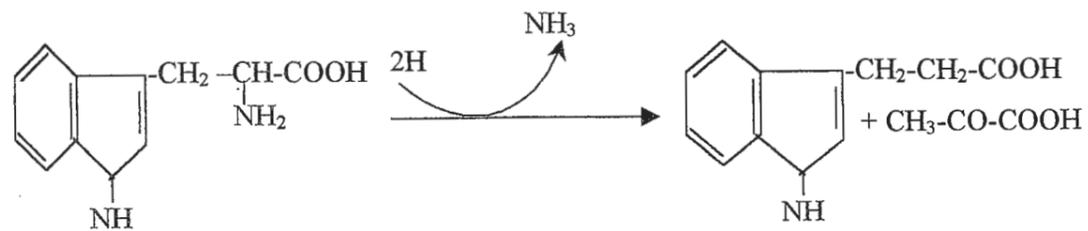
B- Recherche d'indole :

- **But :**

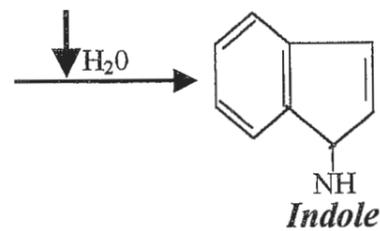
Pour déterminer si un microorganisme est capable de dégrader du tryptophane et produire l'indole .

- **Principe :**

Certaines bactéries désaminent et hydrolysent le tryptophane.



Tryptophane



- **Technique :**

On a ensemencé le milieu d'eau peptone exempte d'indole à partir d'une suspension bactérienne, puis incubé à 37°C pendant 24^h.

- **Lecture :**

- L'indole en présence du réactif d'erlich-kovacs donne un anneau rouge au milieu acide : indole (+).
- L'apparition d'un anneau jaune ou brunâtre : indole (-).

C - Dégradation des acides aminés :

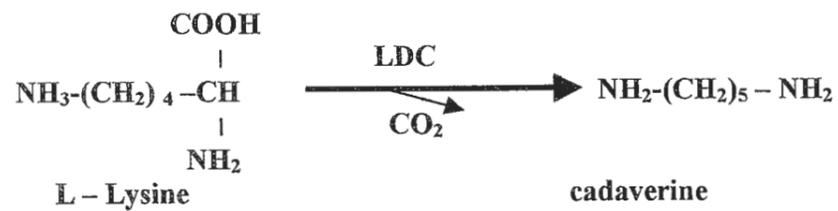
- **But :**

Certaines espèces microbiennes possèdent des enzymes capables de dégrader certains ammino- acides.

C-1- Recherche de la lysine décarboxylase (LDC) :

- **Principe :**

Certaines bactéries possèdent une décarboxylase qui agit sur un acide aminé particulier, la lysine en produisant la cadaverine.



- **Technique:**

Le milieu de moeller enrichi de lysine est ensemencé par la culture et incubé à 37°C pendant 24H

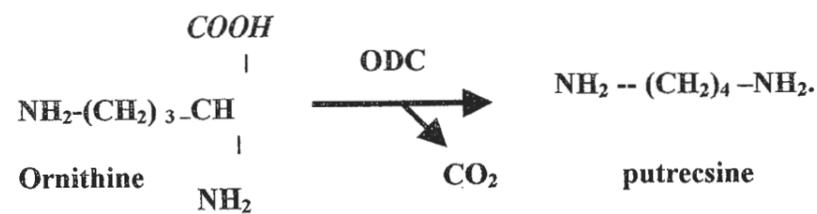
- **Lecture :**

- La coloration violette due à l'interaction entre la cadaverine et le ninhydrine : LDC(+)
- Le virage de la couleur vers le jaune est traduit par l'absence de LDC.

C-2- Recherche d'ornithine décarboxylase (ODC):

- **Principe :**

La dégradation de l'ornithine conduit au putrescine et libération deCO₂.

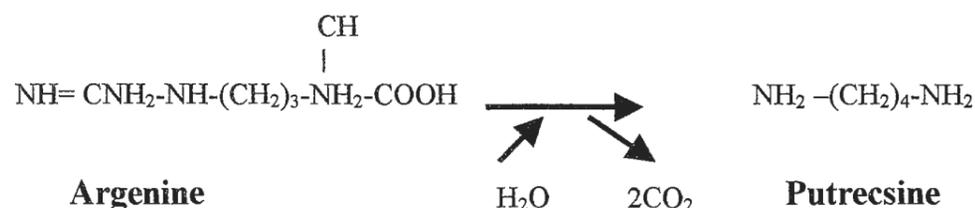


- **Technique:**
Le milieu de moeller enrichi de l'ornithine estensemencé par la culture et incubé à 37°C pendant 24H.

- **Lecture :**
 - La coloration violette due à la reaction de la putrescine avec la ninhydrine : ODC (+).
 - L'absence de l'ODC se traduit par le virage de la couleur au jaune.

C-3- Recherche de l'Argenine dehydrolase (ADH):

- **Principe:**
L'Argenine est décarboxylée en Agmatine, puis hydrolysée en putrescine .



- **Technique:**
Le milieu Muller enrichi de l'Argenine estensemencé par une culture fraîche et incubé à 37°C pendant 24H.

- **Lecture :**
La présence d'un ADH traduit par l'Apparition d'une couleur Violette.

I-2-1-2-2-4- Recherche de nitrate réductase :

- **But :**
Recherche de nitrate réductase

- **Principe:**
Certaines bactéries peuvent réduire les nitrates NO_3 en nitrites NO_2 . Grâce à des enzymes.

-Si la réaction est négative :

- ☒ Soit les nitrates ont d'abord été réduits en nitrites NO_2 , mais la réduction est peut suivre jusqu'au stade NO_2 ou NH_2 .
- ☒ Soit les nitrates n'ont pas été réduits et se trouve donc un bouillon nitrate .dans ce dernier cas en réduit chimiquement par de la poudre de zinc, les nitrates en nitrites.

- **Technique :**
On aensemencé le bouillon nitrate par une suspension bactérienne et incubé à 37°C pendant 24 H.

- **Lecture :**
On a ajouté quelques gouttes de nitrate réductase I (acide sulfanilique) et quelques gouttes de nitrate réductase II (alpha -naphty -lamine).

- ☒ Si le milieu devient rose ou rouge : nitrate réductase (+).
- ☒ Si le milieu reste incolore, ajouter une pincée de zinc.
- ☒ Si une teinte rose ou rouge apparaît, les nitrates n'ont pas été réduits par les bactéries : nitrate réductase (-).
- ☒ Si le milieu reste incolore les nitrates ont été réduits au stade nitrite : les bactéries sont nitrate réductase (+).

I-2-2 Séparation des flavonoïdes constituant la propolis :

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

Dans notre étude on a choisie la méthode de CCM pour séparer les différents constituants chimiques de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP).

❖ Chromatographie sur couche mince (CCM):

C'est une chromatographie liquide –solide, qui correspond à une suite de transfert dans la quelle l'une des phase est fixe, l'autre est mobile.

La phase liquide dite mobile constituée de l'éthanol 95% -eau distillée (45/55) (v/v). La phase solide est dite stationnaire (support) constituée d'une plaque de gel de silice, on l'obtient à partir de silicates de sodium ou potassium, aux quels on ajoute un acide. Le silice peut former des liaisons hydrogènes entre les hydroxyles rattachés au squelette.

Les taches des différents constituants sont révélées sous une lumière UV (lumière de Wood 365 nm). Cette méthode permet de déterminer la couleur des taches et de mesurer le rapport frontal (RF) des différents composés existants dans l'extrait éthanolique de la propolis (EEP).

• Relation fluorescence –structure:

L'examen lumière ultraviolette est certainement 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 U.V sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents. La relation structure – fluorescence est résumée dans le tableau 8 [39, 41, 56].

Tableau : 08 : Relation structure. Fluorescence -[56]

| Spot coloré | Types des flavonoïdes |
|---|---|
| Noir | Flavonols 5-6-7 tri -OH libre. Flavonols 5-7-8 tri -OH libre |
| 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 – ou 8-OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, 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 établi 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 :

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

La mobilité d'un composé dans un solvant particulier est référée à sa valeur de RF dans ce solvant. La comparaison des valeurs de RF du composé flavonique inconnu avec ceux de produits standard, donne une information préliminaire sur la structure du flavonoïde-[56].

I-2-3- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) :

I-2-3-1- : Préparation des dilutions de l'extrait éthanolique de la propolis:

On a préparé la solution mère a concentration de 100 mg/ml. Dont on a ajouté à 10 ml de l'éthanol 60⁰, 1g de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP).

A partir de cette solution mère on a préparé les différents dilutions selon le tableau suivant :

Tableau 09 : Les différents dilutions de la solution mère [14-17]

| Concentration Initiale mg/ml | Volume de l'extrait (ml) | Volume de l'éthanol 60 ⁰ (ml) | Concentration finale (mg/ml) |
|------------------------------|--------------------------|--|------------------------------|
| 100 | 6.4 | 3.6 | 6.4 |
| 64 | 2 | 2 | 3.2 |
| | 1 | 3 | 1.6 |
| | 0.5 | 3.5 | 0.8 |
| | 0.5 | 7.5 | 0.4 |
| 04 | 2 | 2 | 0.2 |
| | 1 | 3 | 0.1 |
| | 0.5 | 3.5 | 0.05 |
| | 0.5 | 7.5 | 0.025 |

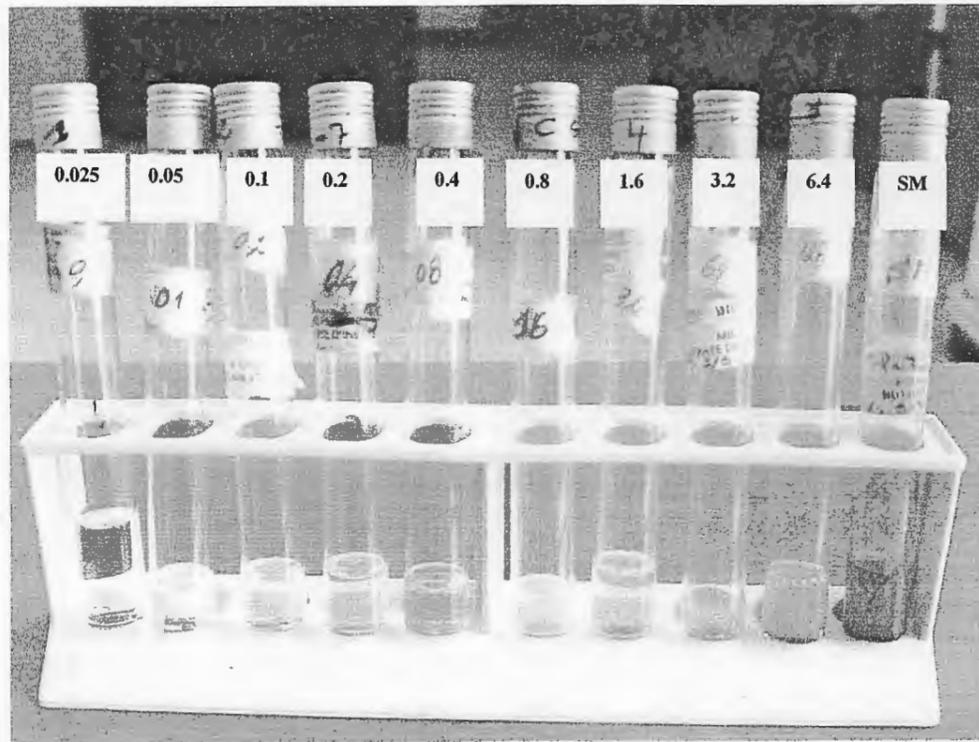


Figure 6 : les différentes Dilutions de la solution mère (mg/ml)

I-2-3-2 : Préparation du milieu de culture :

On a coulé la gélose Muller –Hinton en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4mm et on a laissé refroidir.

I-2-3-3 : Préparation de l'inoculum :

A partir des souches pures à étudier (*Salmonella*, *Esherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *klebsiella*). On a prélevé une ose de culture et on la trempé dans un tube contenant 1 ml de l'eau physiologique stérile.

A l'aide d'un fil droit, on a prélevé une ose à partir de tube a 1 ml de l'eau physiologique, puis on la dilué dans 5 ml de l'eau physiologique stérile et on a homogénéisé la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm [49].

I-2-3-4 : Ensemencement par inondation :

On a inondé la surface de la gélose par la suspension bactériennes de façon à recouvrir cette dernière avec des mouvements de rotation dans les deux axes par la main .A l'aide d'une pipette pasteur , on a aspiré le surplus , puis on a séché pendant 15 minutes a 37°C.

I-2-3-5- Test de l'antibiogramme : méthode de diffusion en gélose (méthode des puits).**❖ Confection des puits : [64]**

On a réalisé 7 puits dans chaque boîte déjà ensemencée et séchée, puis on a déposé 2 gouttes de la gélose stérile au fond de chaque puit pour boucher la base de ce dernier.

A partir de chaque dilution on a pris 50 µl et on l'a déposé dans chaque puit correspondant.

Il est important d'observer une prédiffusion de l'extrait de 30 minute à température ambiante avant de porter les boîtes à l'étuve , en suite on a incubé à 37°C pendant 24 H.

Resultats

II – Résultats :

II-1 –Identification des souches d'*E.coli* :

❖ **Identification morphologique :**

L'observation microscopique montre que les 2 souches isolées sur gélose Hektoen sont des bacilles de 2 à 3 micron de long et de 0.6 micron de large avec une couleur rose donc se sont des bacilles Gram(-) .

❖ **Identification biochimique:**

Les résultats obtenus à partir de profil biochimique des souches *d'E. coli* sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Profil d'identification biochimique *d'E. coli*

| C-BIO | ADH | LDC | ODC | Cit | Ind | Uré | Nit | Man mob | | TSI | | | |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | | man | Mob | H ₂ S | Gaz | Lac | Glu |
| <i>E.coli</i> | + | + | + | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + |

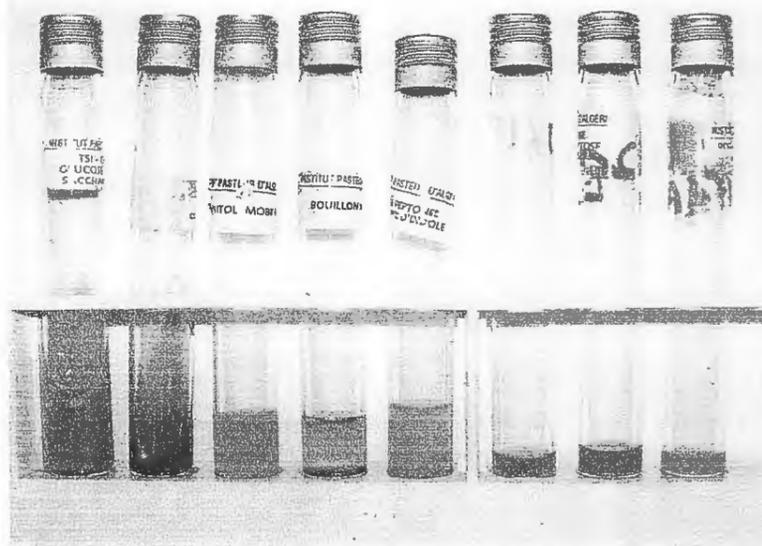


Figure 7 : Profil d'identification biochimique *d'E.coli* .

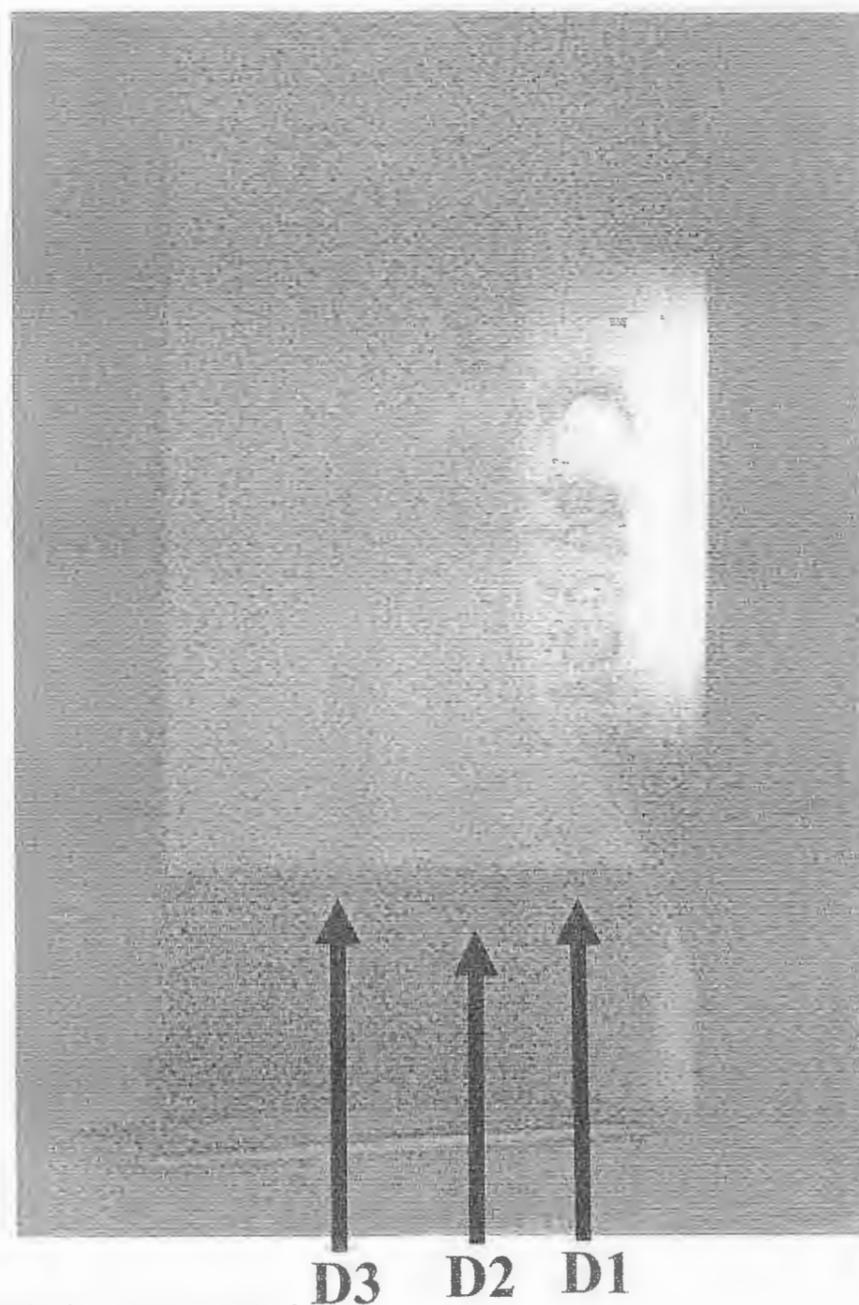
II-2- Séparation des flavonoides par la CCM:

La chromatographie à permis de séparer plusieurs produits flavoniques. Les valeurs des RF et la fluorescence des 3 dilutions 6.4 mg/ml, 3.2 mg/ml , 1.6 mg/ml sont représentés dans le tableau 11 (les RF et la fluorescence sont les mêmes pour les trois dilutions).

Tableau 11: Résultats de la chromatographie sur couche mince de L'EEP

| Fluorescence | RF |
|--------------|------|
| Jaune terne | 0.23 |
| Violet | 0.25 |
| Violet | 0.30 |
| Jaune pale | 0.35 |
| Violet | 0.40 |
| Violet | 0.45 |
| Brun noir | 0.48 |
| Bleu clair | 0.56 |
| Bleu clair | 0.79 |

On a remarqué que la propolis testée présente 9 taches différentes de couleur : jaune terne, jaune pale, violet, brun noir, bleu clair avec des **RF** différentes.



D1 : Dilution 1,6 mg /ml
D2 : Dilution 3,2 mg /ml
D3 : Dilution 6,4 mg /ml

Figure 8 : Chromatographie sur
couche mince de l'EEP

II-3- Evaluation de l'activité antibactérienne de L'EEP:

Les résultats obtenus à l'issue du test de diffusion sur gélose (test de sensibilité par méthode des puits) de l'extrait éthanolique de la propolis sur les différentes souches sont représentés ci-après.

❖ **Sur les streptocoques :**

Les valeurs de CMI et les diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour chaque souche de *streptocoque*: S₁ isolée de l'eau ; S₂,S₃;S₄;S₅ isolées de mamelles de bovidés sont résumées dans le tableau 12.

Tableau 12: Détermination de la CMI des souches de *Streptocoques* :

| Souches | Dilutions (mg/ml) | Diamètre de la zone d'inhibition en mm | | | | | | CMI | |
|----------------|-------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | | 3,2 |
| S ₁ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 17 | 24 | 0,8 |
| S ₂ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 20 | 22 | 0,8 |
| S ₃ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 24 | 26 | 0,8 |
| S ₄ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 17 | 20 | 0,8 |
| S ₅ | | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 20 | 23 | 0,8 |

On a remarqué qu'il n'y a aucune activité de l'extrait éthanolique de la propolis pour les dilutions:0,05. 0,1. 0,2. 0,4 mg/ml sur les 5 souches. Par contre pour les autres dilutions, on remarque une activité. Effet toutes les souches de *streptocoques* possèdent la même CMI qui est égale à 0.8 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition de 26 mm pour la souche 3 et de 24 mm pour la souche 1 avec la dilution 3.2 mg/ml et des zones d'inhibition de 20 mm (souche 4), 22 mm (souche 2) et 23 mm (souche 5) pour la même dilution (3.2 mg/ml).

Figure 9,10 et 11

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

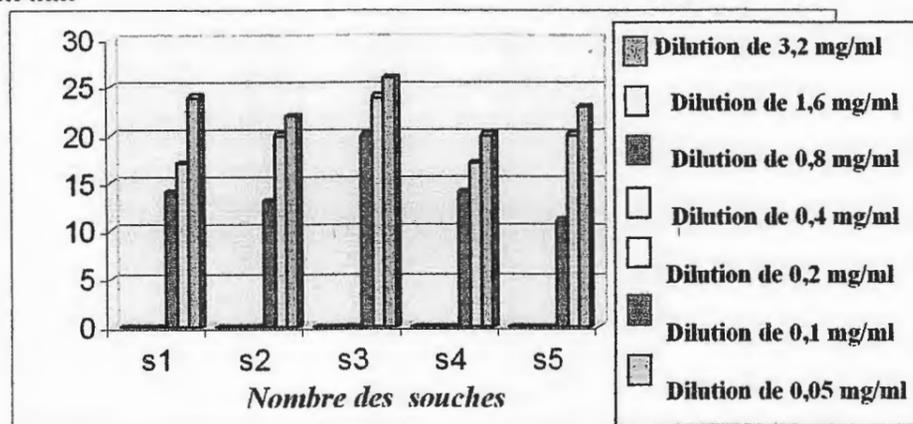


Figure 9:Diagramme des zones d'inhibition des souches de *streptocoques* en fonction de la souche et des dilutions

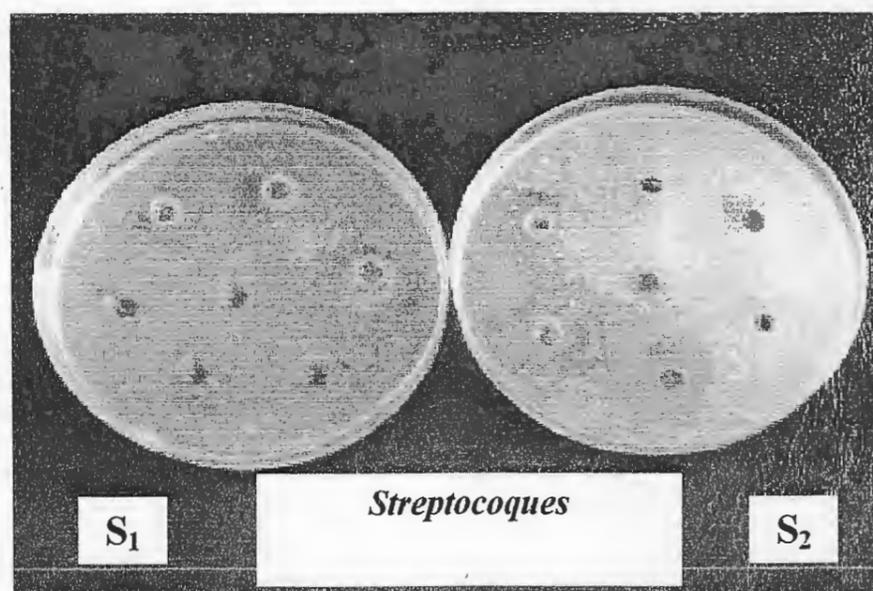


Figure 10: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 1 des *streptocoques* isolée de l'eau et la souche 2 des *streptocoques* isolée des mamelles de bovidés.

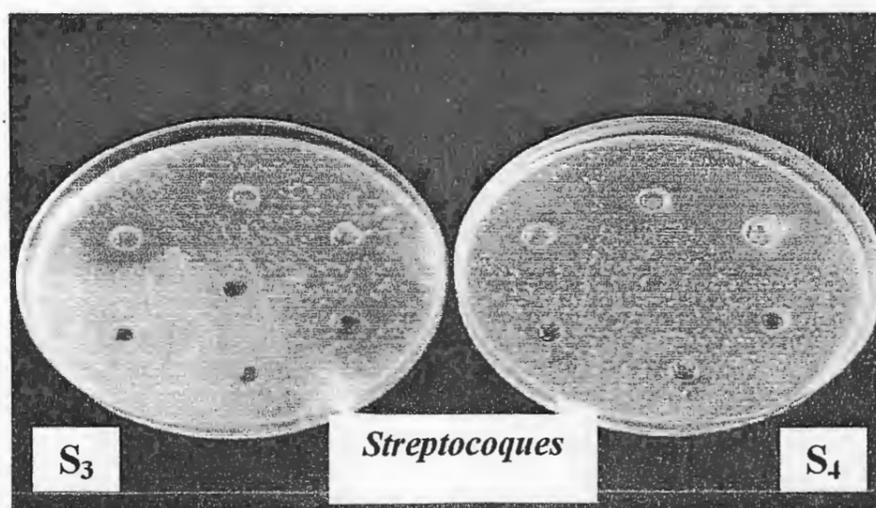


Figure 11 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 3 et 4 des *streptocoques* isolées des mamelles de bovidés.

❖ **Sur les salmonelles:**

La valeur de la CMI et les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour chaque souche de *salmonelle*, isolées des différents organes des volailles sont représentés dans le tableau 13

Tableau 13 : Détermination de la CMI des souches de *salmonelles* .

| Dilutions (mg/ml) | Diamètre de la zone d'inhibition en mm | | | | | | | CMI |
|-------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | |
| Souches | | | | | | | | |
| S ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 16 | 1,6 |
| S ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 16 | 1,6 |
| S ₃ | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 10 | 15 | 0,8 |

Il n'y a aucune zone d'inhibition pour les dilutions qui varie entre 0,05 et 0,4 mg /ml avec les 3 souches, et pour la dilution 0,8 mg/ml avec les souches 1 et 2. La CMI la plus importante (0,8 mg/ml) est obtenue avec la souche 3, pour les 2 autres souches elle est de (1,6 mg/ml).

La souche la plus sensible envers l'extraits est la souche 3 avec une CMI (0,8 mg/ml) et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 15 mm pour la dilution 3,2 mg/ml, par contre les 2 autres souches 1 et 2 possèdent une CMI égale à 1,6 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 16 mm pour la dilution 3,2 mg/ml. **Figure 12 et 13.**

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

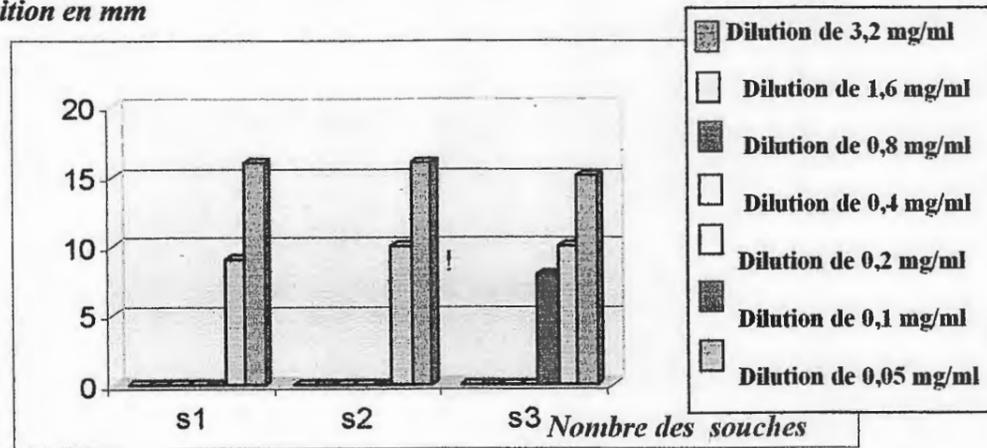


Figure 12: Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Salmonelles* en fonction de la souche et des dilutions.

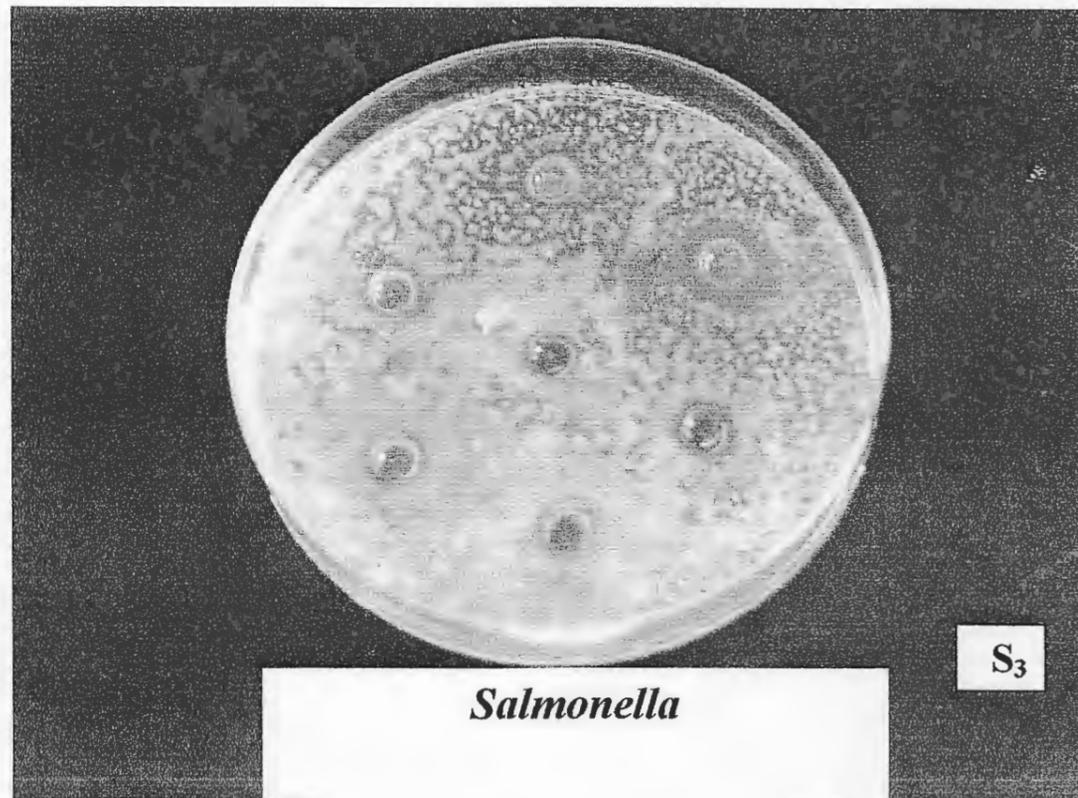


Figure 15: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélosc (méthode des puits) de la souche 3 des salmonelles isolées des différents organes des volaille

❖ **Sur les staphylocoques :**

Les valeurs de la CMI et les zones d'inhibition obtenus pour chaque souche des staphylocoques : S₁, S₂ isolées de pus, S₃ isolée d'un prélèvement vaginal sont représentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Détermination de la CMI des souches de staphylocoques :

| Dilution (mg/ml) | Diamètre de la zone d'inhibition en mm | | | | | | | CMI |
|---------------------|--|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | souches | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | |
| S ₁ | 0 | 11 | 15 | 18 | 20 | 24 | 30 | 0,1 |
| S ₂ | 0 | 0 | 15 | 18 | 20 | 24 | 28 | 0,2 |
| S ₃ | 0 | 0 | 0 | 10 | 15 | 20 | 22 | 0,4 |

On a remarqué qu'il n'y a aucune activité de la propolis pour la dilution 0,05 mg/ml sur les souches 1, 2, 3; pour la dilution 0,1 mg/ml sur les souches 1, 2 et pour la dilution 0,2 mg/ml sur la souche 3. La CMI la plus importante (0,1 mg/ml) est obtenue avec la souche 1, pour les 2 autres souches elle varie entre 0,2 mg/ml et 0,4 mg/ml.

La souche la plus sensible envers l'EEP est la souche 1 avec une CMI égale à 0,1 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 30 mm pour la dilution 3,2 mg/ml. Par contre la souche la moins sensible envers l'EEP est la souche 3 avec une CMI égale à 0,4 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 22 mm . **Figure 14 et 15**

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

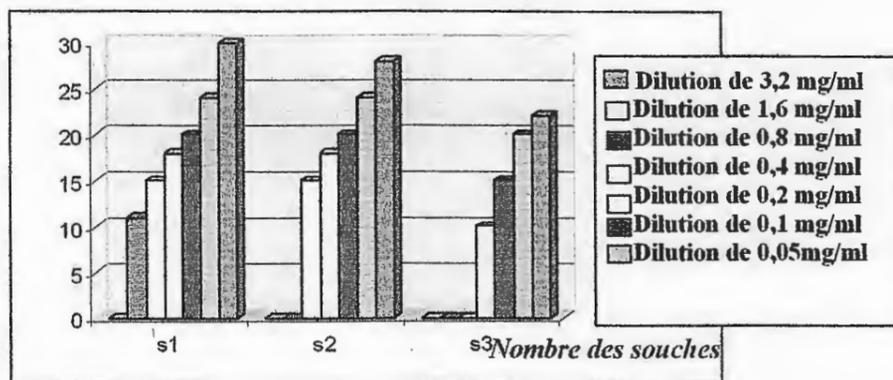


Figure 14: Diamètres des zones d'inhibition des souches de *staphylocoques* en fonction de la souche et des dilutions.

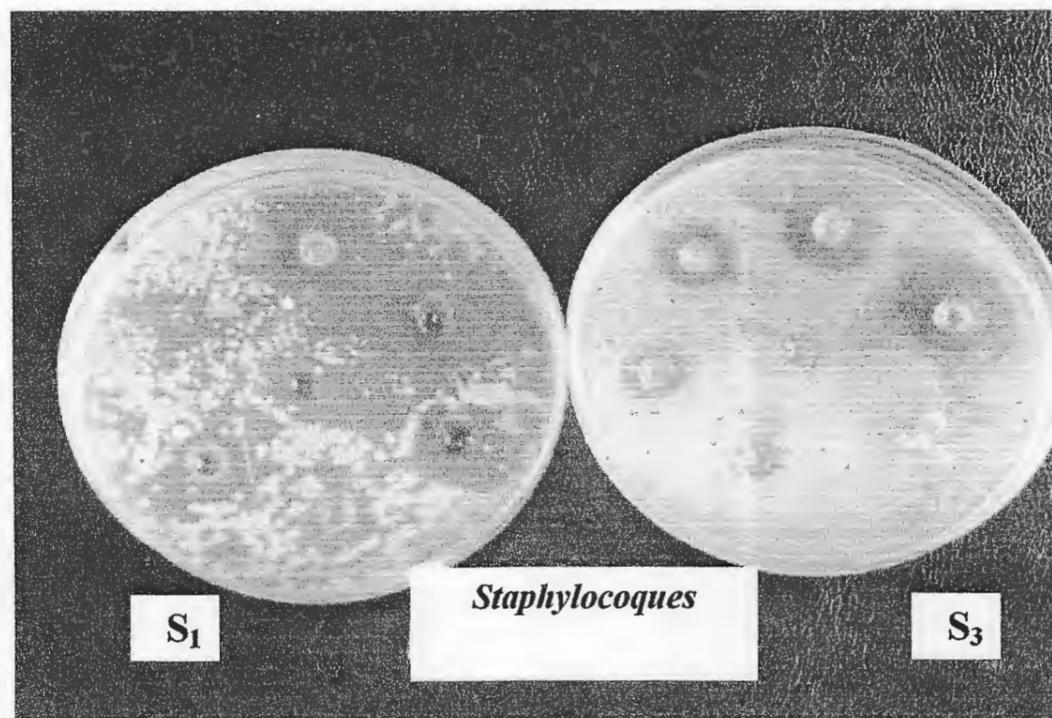


Figure 15: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 1 des *staphylocoques* (*S.epidermis*) isolée de pus et la souche 3 des *staphylocoques* (*S.aureus*) isolée d'un prélèvement vaginale.

❖ **Sur *Escherichia coli*:**

Les valeurs de la CMI et les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour chaque souche *d'E coli*: S₁, S₅ isolées de foie de volailles. S₂ (*E.coli* ATCC25922) souche de référence provient de l'institut pasteur d'Alger. S₃, S₄ isolées des urines sont présentées dans le tableau 15:

Tableau 15: Détermination de la CMI des souches *d'E. coli*

| Dilutions (mg/ml) souches | Diamètre de la zone d'inhibition en mm | | | | | | | CMI |
|---------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | |
| S ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 14 | 1,6 |
| S ₂ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 | 1,6 |
| S ₃ | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 | 15 | 20 | 0,4 |
| S ₄ | 0 | 0 | 0 | 9 | 11 | 14 | 17 | 0,4 |
| S ₅ | 0 | 0 | 9 | 11 | 13 | 16 | 17 | 0,2 |

On a remarqué que l'activité antibactérienne de la propolis pour les dilutions varie entre 0,05 et 0,8 mg/ml sur les souches 1 et 2, pour les dilutions 0,05, 0,1 et 0,2 mg/ml sur les souches 3 et 4 et pour les dilutions 0,05 et 0,1 mg/ml sur la souche 5 est nulle. La CMI la plus importante (0,2 mg/ml) est obtenue avec la souche 5, pour les autres souches elle varie entre 0,4 mg/ml et 1,6 mg/ml.

La souche la plus sensible envers l'EEP est la souche 5 avec une CMI égale à 0,2 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 17 mm pour la dilution 3,2 mg/ml. Par contre les 2 souches les moins sensibles envers l'EEP sont les souches 1 et 2 avec une CMI égale à 1,6 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 14 mm et 11 mm successivement pour la dilution 3,2 mg/ml. **Figure 16, 17 et 18.**

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

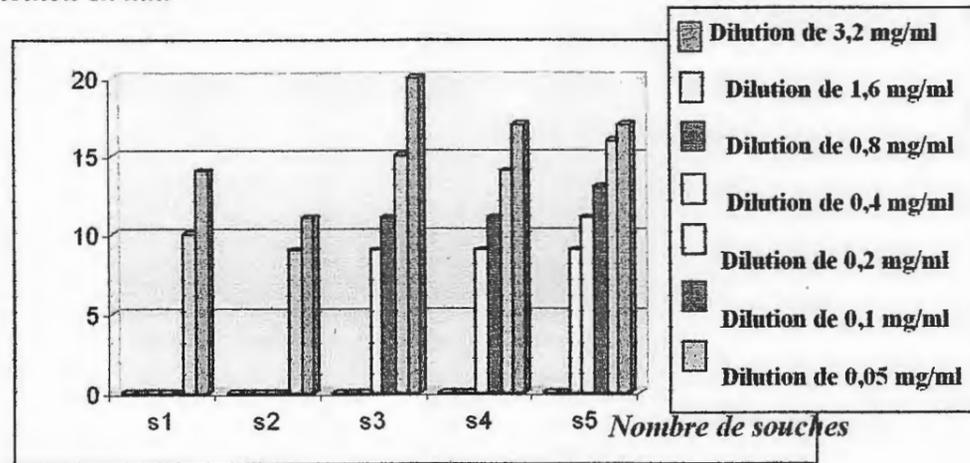


Figure 16: Diamètres des zones d'inhibition des souches *d'E. coli* En fonction de la souche et les dilutions.

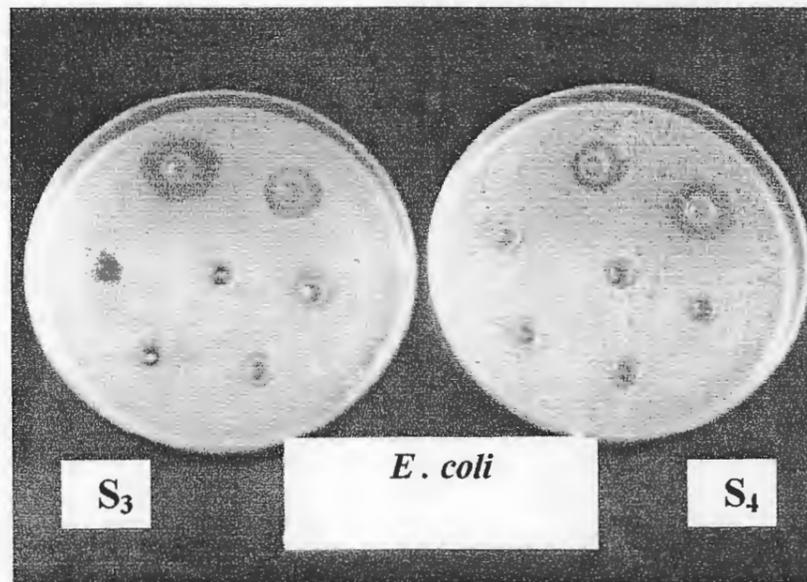


Figure17 : Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 3 et 4 d'*E.coli* isolées des urines

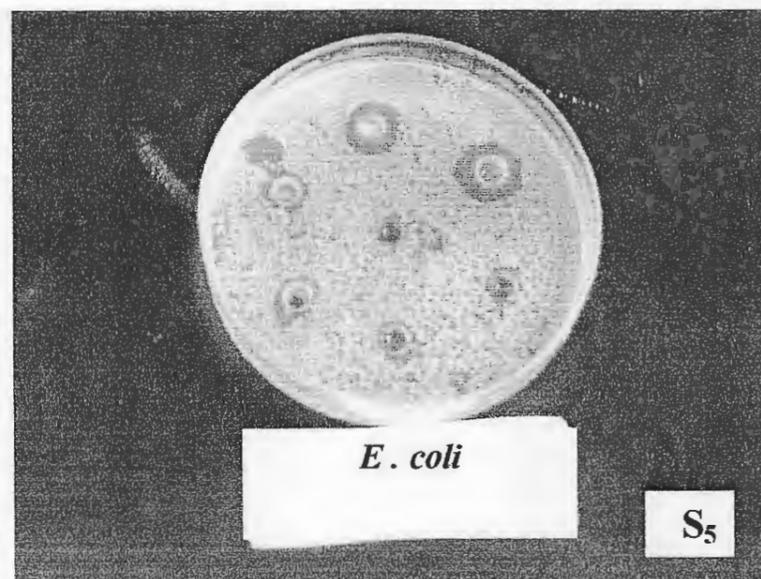


Figure18: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) de la souche 5 d'*E.coli* isolée de foie de volailles.

❖ **Sur *Klebsiella* :**

Les valeurs de la CMI et les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour chaque souche de *Klebsiella* (S₁, S₂) isolées de sperme sont représentés dans le tableau .

Tableau 16 : Détermination de la CMI de *Klebsiella*

| Dilutions (mg/ml) \ souches | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | CMI |
|-----------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S ₁ | 0 | 0 | 9 | 10 | 12 | 14 | 16 | 0,2 |
| S ₂ | 0 | 0 | 0 | 9 | 12 | 14 | 16 | 0,4 |

On a remarqué qu'il n' y a aucune activité de la propolis avec les dilutions 0,05 et 0,1 mg/ml sur les 2 souches ainsi que pour la souche 2 pour la dilution 0,2 mg/ml. La souche la plus sensible est la souche 1 qui présente la CMI la plus importante 0,2 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 16 mm pour la dilution 3,2 mg/ml. Par contre la souche 2 possède une CMI égale à 0,4 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition pour la dilution 3,2 mg/ml Figure 19 et 20.

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

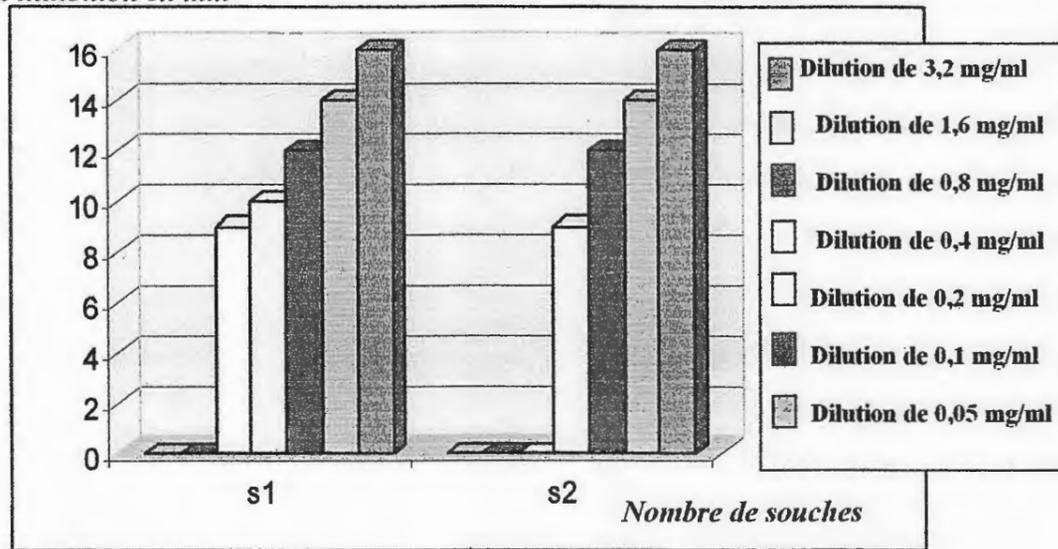


Figure19 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Klebsiella* en fonction de la souche et des dilutions

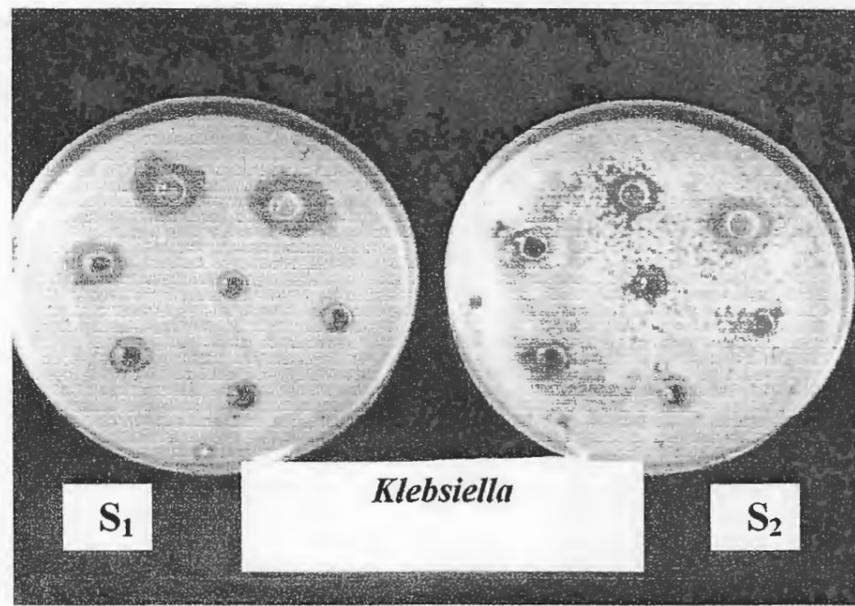


Figure 20: Détermination de la CMI par la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) des souches 1 et 2 de *klebsiella* isolées de sperme.

❖ **Sur proteus:**

La valeur de la CMI et les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour la souche de *proteus* (S₁) isolée des selles sont représentés dans le tableau 17

Tableau 17: Détermination de la CMI de la souche de *proteus* :

| Dilution (mg/ml) | Diamètres de la zone d'inhibition en mm | | | | | | | CMI |
|---------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | |
| souches | | | | | | | | |
| S ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 09 | 14 | 1,6 |

On a remarqué que la souche de *proteus* présente une CMI de 1,6 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 14 mm pour la dilution 3,2 mg/ml et qu'il n'y a aucune activité de la propolis pour les dilution entre 0,05 et 0,8 mg/ml. **Figure 21.**

Diamètre de la zone d'inhibition en mm

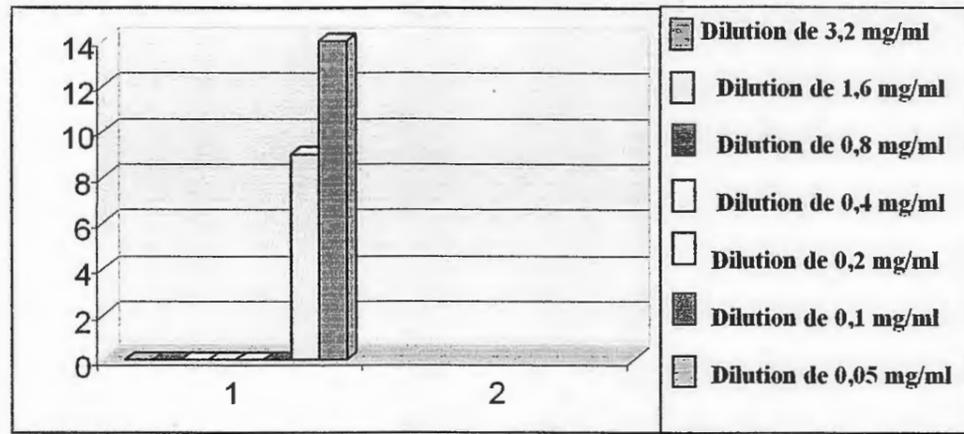


Figure 21: Diamètres des zones d'inhibition de la souche de *Proteus* en fonction de la souche et des dilutions.

❖ **Sur Pseudomonas:**

La valeur de la CMI et les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour la souche de *pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (S₁)* sont représentés dans le tableau 18

Tableau 18: Détermination de la CMI de la souche de pseudomonas :

| Dilution (mg/ml) / souches | Diamètres de la zone d'inhibition en mm | | | | | | | CMI |
|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 | |
| S ₁ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 17 | 1,6 |

On a remarqué qu'il n'y a aucune activité de la propolis pour les dilutions variant entre 0,05 et 0,8 mg/ml sur la souche de *P. aeruginosa ATCC 27853*, par contre il y a une activité pour les autres dilutions. Cette souche présente une CMI égale à 1,6 mg/ml et un diamètre de la zone d'inhibition égale à 17 mm pour la dilution de 3,2 mg/ml. **figure 22.**

**Diamètre de la zone
d'inhibition en mm**

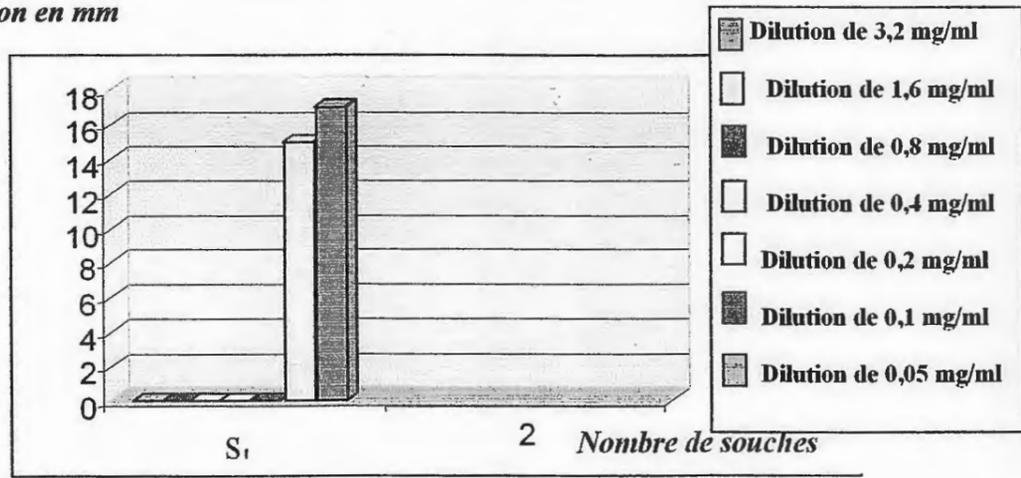


Figure 22: Diamètres des zones d'inhibition de la souche de *pseudomonas* en fonction de la souche et des dilutions.

Discussion

Discussion:**1-Séparation des flavonoides constituant la propolis par la CCM:**

Selon VOIRIN.B (1970) [56] nous pouvons dire que:

- Une couleur jaune terne avec un RF de 0,23 est en faveur d'une structure flavone (flavones 3- OH libre avec ou sans 5- OH libre).
- Une couleur violette avec des RF de : 0,27. 0,30. 0,40. 0,45 nous oriente vers une structure flavone, chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, ou flavanone.
- Une valeur de RF de 0,35 avec une fluorescence jaune pale traduit une structure dihydroflavonol.
- Un RF de 0,48 avec une couleur Brun- noir peut correspondre à une structure flavonol (3- OH absent ou 3- OH substitué).
- Une fluorescence bleu- clair avec des RF de 0,56. 0,79 est en faveur d'une structure flavone ou flavonol.

Ces résultats confirment que la propolis étudiée est très riche en flavonoides. L'apparition de 4 taches de couleur violette avec des valeurs de RF différentes, nous oriente que cette propolis contient beaucoup plus de composés flavonoliques de nature flavone, Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanone, en plus des flavonols.

2- Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP):

Dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de la propolis in vitro vis-à-vis des différentes souches bactériennes, et selon le test de sensibilité par diffusion en gélose (Méthode des puits), nos résultats montrent que les valeurs des CMI varient entre 0,1 et 1,6 mg/ml.

Pour les souches Gram(+):

- la CMI la plus importante pour les souches de *Staphylocoques* est de 0,1 mg/ml obtenue avec la souche 1 qui est la plus sensible à l'EEP, son diamètre de la zone d'inhibition le plus important est de 30 mm.
- Les 5 souches de *streptocoques* présentent une CMI égale à 0,8 mg/ml et un diamètre plus important de la zone d'inhibition de 26 mm pour la souche 3.

Pour les souches Gram(-):

- La CMI la plus importante pour les souches des *salmonelles* est 0,8 mg/ml est obtenue avec la souche 3, et un diamètre plus important de la zone d'inhibition de 16mm pour les souches 1 et 2.
- La CMI la plus importante pour les souches *d'E. coli* est 0,2 mg/ml obtenue avec la souche 5 et un diamètre plus important de la zone d'inhibition de 20 mm pour la souche 3, par contre la

souche 2 est moins sensible à l'EEP, présente une CMI égale à 1,6 mg/ml, avec un diamètre de la zone d'inhibition de 11 mm obtenue avec la dilution 3,2mg/ml.

- Pour les souches de *Klebsiella*, la CMI la plus basse (0,2 mg/ml) est obtenue avec la souche 1 et un diamètre plus important de la zone d'inhibition de 16 mm pour les deux souches testées.

-Les souches de *Proteus* et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 présentent une CMI égale à 1,6 mg/ml avec respectivement un diamètre de la zone d'inhibition de 14 mm et de 17 mm.

Nous constatons que les diamètres des zones d'inhibition pour toutes les souches testées sont inversement proportionnelle à la dilution utilisée, et les bactéries Gram positifs sont plus sensibles à la propolis que les bactéries Gram négatifs.

La croissance des bactéries Gram positifs est inhibée par les concentrations les plus basses (0,1mg/ml), tandis que la croissance des bactéries Gram négatifs est inhibée par les concentrations les plus élevées (1,6mg/ml), à l'exception de la souche 1 de *Klebsiella* et la souche 5 d'*E.coli*.

Nos résultats concorde avec ceux obtenus avec d'autres chercheurs qui ont travaillé sur la propolis Brésilienne, et la propolis de la région d'Amaicha del valle de l'Argentine.

Effectivement, cette dernière était active seulement contre les bactéries Gram positifs et aucune activité contre les bactéries Gram négatifs, dont la CMI la plus importante est de 0,02 mg/ml pour *Staphylococcus aureus*, 0,07 mg/ml pour *Streptococcus agalactiae*, 0,1 mg/ml pour *Streptococcus pyogenes* et 0,2 mg/ml pour *Enterococcus faecalis* [45].

D'autre part, la propolis Brésilienne présente aussi une grande activité vis-à-vis des bactéries Gram positifs, et une activité limitée contre les bactéries Gram négatifs, dont la CMI la plus basse pour *Staphylococcus aureus* est de 0,4 mg/ml, pour *Pseudomonas aeruginosa* est de 5,7 mg/ml et pour *E.coli* et *Salmonella typhimurium* est de 8 mg/ml [51].

Ces résultats sont aussi en accord avec ceux de GRANGE et DAVEY (1990) [26], DOBRWOLSKY et AL (1991) [20] et WOISKY et AL (1994) [57] qui ont obtenues des résultats similaires soutenant l'hypothèse que la propolis est active essentiellement contre les bactéries Gram positifs.

A partir des résultats obtenus dans notre travail ainsi que les résultats d'autres auteurs [51], [45] on a remarqué que les trois propolis Algérienne, Brésilienne et d'Amaicha del valle possèdent une activité antibactérienne. La propolis d'Amaicha del valle de l'Argentine est la plus active, elle a les CMI les plus basse (0,02mg/ml, 0,07 mg/ml), suivie par la propolis Algérienne dont la CMI la plus basse est égale à 0,1 mg/ml, puis la propolis Brésilienne active avec des concentrations plus hautes (CMI= 0,4 - 8 mg/ml).

Ces constatations sont en faveur de la conclusion de NIEVA.MORENO et AL [45], qui confirment que les propriétés biologiques de la propolis sont différentes selon leur origine phytogéographique.

Conclusion

Conclusion :

La propolis est un des produits majeurs de la ruche qui a été employé dans l'apithérapie pour beaucoup d'années.

Les résultats du test de sensibilité des différentes dilutions de l'extrait éthanolique de la propolis testée sur 20 souches bactérienne (*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*) révèlent que les bactéries Gram positifs sont plus sensibles à la propolis que les bactéries Gram négatifs. Les valeurs de la CMI varient entre 0,1 et 1,6 mg/ml. La croissance des bactéries Gram (+) est inhibée par les CMI les plus basses, par contre la croissance des bactéries Gram (-) est inhibée par les concentrations les plus hautes .

Nos résultats obtenus à partir de la chromatographie sur couche mince montrent que l'activité antibactérienne de la propolis est due à sa richesse en flavonoides . Ces derniers sont considérés comme étant les principes actifs de la propolis.

Les résultats obtenus dans notre travail ne sont que des résultats préliminaires, il faut les approfondir pour une éventuelle utilisation de la propolis dans un cadre expérimental in-vivo.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] **AMOROS. M ; SAUVAGER. F ; GIRRE. L ; CORMIER. M .** in vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 23, 1992 a: 231-240.
- [2] **AMOROS. M ; SIMOES . C.M.O; GIRRE . L; SAUVAGER. F; CORMIER. M .** synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of natural products* 55, 1992 b: 1732-1740.
- [3] ✓ **ANTUNES RMP; CATAO RMR; CEBALLOS BSO.** Antimicrobial activity of propolis. *Rev bras farm* 77, 1996: 8-15 (banskota).
- [4] **Avril. J-L; DABERNAT. H; DENIS.F ; MONTEIL. H .**bacteriologie clinic. Edition **MARKETING.** Paris. 2^{ème} edition mars 1992: 6, 22, 31-34, 152-153, 162, 184-185, 192-194, 265-268.
- [5] **Avril. J. L.** dictionnaire pratique de bacteriologie clinique. EM. Paris 1991 : 6-24
- [6] **BANSKOTA. AH ; TEZUKA. Y ; ADNYANA. I ; MIDORIKWA. K; MASTSUSHIGE. K; MESSAGE. V.** cytotoxic, herpatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from brazil, peru, the Netherlands and china. *Journal ethanopharmacol* 72, 1994: 46-239 .
- [7] **BIRI. M;** le grand livre des abeilles: l'apiculture moderne. Edition de vecchis. A. paris 1999: 79
- + [8] **BOURKEB. L ; MALLEM. W.** les flavonoides et leurs utilisations en therapeutique. Memoire de fin d'étude on vue de l'obtention du diplôme en pharmacie. Université de Annaba 2004.
- [9] **BRATTER. C ; TRAGEL. M; LIEBENTHAL. C; VOLK. HD.** Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: a clinical pilot study- forsh *komplementarmed* 6, 1999: 60-256.
- [10] **BRUNETON. J.** pharmacosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition **LAVOISIER** 1993 : 226.
- [11] **BRUNEAU. E ; BARBANÇON. J- M; BOUNNAFFE. B; CLEMENT. H; DOMEREGO. R, FERT. G; LE CONTE. Y ; RATIA. G ; REEB. C ; VAISSIERE. B.** le traite *Rustica* de l'apiculture. *Rustica éditions.* Paris 2002 : 54,68,78,373-415.
- [12] **BUGNICOURT.M.**dictionnaire de microbiologie générale ; la vie racontée par les bactéries. Edition **marketing** 1995.
- ✓ [13] **BURDOCK. GA.** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food chemitoxical* 36, 1998: 63-347.

- [14] **CARBONELLE. B; DENIS. E; MAWONIER. A; PINON. G; VARGNAS. R.** bactériologie médicale. Edition SIMEP (2^{ème} tirage) 1987
- [15] **CASTALDOS ; CAPASSO. F .** propolis, and old remedy used in moderne medecine. Filoterapia 73, 2002 :6-51
- [16] **CHAURVIN. R.** traité de biologie de l'abeille. Edition MASSON ET C^{ie}, paris 1968 : 2-46
- [17] **COURVALIN. P ; FANDROI. J-P ; GOLDSTIEN. F ; PHILIPPON. J.** l'antibiogramme automatisé mpc. Vigot, paris 1986.
- [18] **CRILGENK. R, REVE. J-R; ZANNAD . F.** thérapeutique en pathologie cardiovasculaire de la pharmacologie a la prescription 1987.
- [19] **DEGRE. M.** mémento technique de l'eau. Tome 1. edition de cinquantaire, paris 1989.
- [20] **DOBROWOLSKIJ-W ; VOHORA. S-B ; SHARMA. K; SHAH. S- A; NAQVI. S- AH; DANDIYA. P-C.** antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. Journal of ethnopharmacology 35, 1991: 77-82 cité par **SFORCIN^{a*}. J. M; FERNONDES jr^{a. a} ; LOPES^{a*} C.A.M ; BANKOVA^{b. V} ; FUNARIA^{a.S.R.C.}** seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology 73, 2000: 243-249.
- [21] **EYQUEM.A ;ALOUF J;MONTAGNIER.L.** traité de microbiologie clinique. Edition piccin nouva libraria ,SPA Italia 1998 :593-598.
- [22] **FERNANDED.A-JR ;SUGIZAKI.M-F ;FOGO.M-L ;FUNARI S.R.C ;LOPES C.M.A.** in vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from humain infection.journal of venomous animal toxins 1.1995:63-69 .
- ✧ [23] **FOCHT.J;HANSEN.S-H;IVIELSEN.J-V; BERG- SEGERS. A; RIEZLERE. R.** bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infection. Ar zneimihel for chung 43, 1993: 921-923 .
- [24] **FRONTY. A.** l'apiculture aujourd'hui. DARGAUD édition (2^{ème} edition) 1996 : 121-125, 134, 162.
- [25] **GERHARD. R.** metobolisme des végétaux : physiologie et biochimie 1993 : 331-338.
- ✧ [26] **GRANGE. J-M ; DAVEY. R-W.** antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the royal society of medecine 83, 1990: 159-160 cité par **SFORCIN^{a*}. J. M; FERNONDES jr^{a. a} ; LOPES^{a*} C.A.M ; BANKOVA^{b. V} ; FUNARIA^{a.S.R.C.}** seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology 73, 2000: 243-249.
- ✧ [27] **GREE NAWAY. W; SCAYSBROOK. T; WHATELEY. FR.** The composition of propolis from two different Spanish regions. Z- naturforsch 47, 1990: 634-637.
- [28] **GUIRAUD.J- P.** l'analyse microbiologique dans l'industrie alimentaire. 2^{ème} édition, paris 1980 : 54-76.

- [29] **HART. T ; SHERAR. S.** atlas de microbiologie medicinale, france 1997: 112-117.
- [30] **HAVSTEE. N- B.** flavonoides a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem pharmacol 32, 1983: 8-1141 .
- [31] **HERMONDEZ. N- M-R; BERNAL. K- C.** efecto antibiotico del propoleo frente a cepas de staphylococcus aureus de origen clinico humano. Rev. Cubana farm 24, 1990 : 45-50.
- [32] **JOUY.H; PESTER. A; MET NICOLAS. A.** techniques bacteriologiques appliqués a l'études des liquids organiques et des produits pathologiques. Maloinés. A edition (3^{ème} edition), paris 1975 : 44, 56, 82, 84, 89, 101-111.
- [33] **KRELL. R.** value- added product from bee keeping. Fao- agricultural servies bulletin 1996: 124.
- [34] **LARPENT. J- P.** memento technique de microbiologie 3^{ème} édition . techniques et documentation 1997 : 356.
- [35] **LECLERC. H- D ; MOSSEL. A- A ; BERNIER. J- J.** microbiologie de tube digestive de l'eau et les aliments. Doin edition, Paris 1989 : 371.
- [36] **LEYRAL. G ; JOFFIN. J- N.** micribiologie technique. 2^{ème} edition 1998.
- [37] **LILENBAUM. W ; BARBOSA. A- V .** avaliacao da actividade antimicrobiana da propolis perante malassezia pachydermatis « in vitro » . rev. Bras. Med. Vet 16, 1994 : 248-251
- [38] **LOUVEAUX. J.** les abeilles et leurs élevages. Nov. 1985.
- [39] **MARBY. T- J ; MARKAM. K- L ET THOMAS. M- B.** the systematic identification of flavonoids, sprunger- verlag, New york 1970.
- [40] **MARCUCCI. M- C.** propolis : chimical composition biological properties and therapeutic activity. Apidologie 26, 1995: 83-99.
- [41] **MARKHAM. K- R.** technique of flavonoid identification, Academic press London 1982.
- [42] **MIRZOEVA. OK; GRISHANIN .RN; CALDER. PC.** Antimicrobial action of propolis and of its compoments the effects on growth membrane potencial and motility of bacteria microbial rev 152, 1997: 46- 239
- [43] **MORENO. M; ISLA. M; SAMPIETRO. A, VATTUONE. M.** composition of the free radical scavenging activity of propolis from several region of argentina. Journal ethanopharmacal 71, 2002: 14-109.
- [44] **MUNKER. R; ANDREEFF. M.** induction of death (cd 95/ fas) activation and adhesion molecules (cd 54) on blast cells of acute myelogenous leukemias by tnf- α and ifn- γ - cytokinés mol ther 2, 1996: 59-147 .
- [45] **NIEVA MORENO^a. MI; CUDMANI^b. N-G VAHUONE^a. M-A; SAMPIETRO^{a,*}.** Screening of antibacterial activity of ethnopharmacologie 68, 1999: 97-102 .

- [46] **NUTR. J.** flavonoides, chemistry, cardioprotective, effect and dietary sources, biochem vol 7. february 1996: 97
- [47] **PIERRE. J- P.** apiculture : connaître l'abeille- conduire le rucher. 6^{ème} édition revue et complexe 1992 : 142-361.
- [48] **PILET. C ; BOURDON. J- L ; TOMA. B ; MARCHAL. N ; BALBASTRE. C.** bactériologie médical et vétérinaire : systématique bactérienne. Dion éditeur. Paris. 2^{ème} édition 1986.
- [49] **RAHEL. K.** standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire a l'échelle national. 2^{ème} édition 2003 : 19
- [50] **SERKEDJIEVA. J ; MANOLOVA. N; BANKOVA. V.** anti- influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). Journal of natural products 55, 1992: 294-297
- [51] **SFORCIN^{a,*}. J. M; FERNONDES JR^a. a ; LOPES^{a,*} C.A.M ; BANKOVA^b. V ; FUNARIA^a.S.R.C.** seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology 73, 2000: 243-249.
- [52] **SFORCIN. J- M; FINARI. S.R.C; MOVELLI. E. L. B.** serum biochemical determinations of propolis- treated rats. Journal of venomous animal toxins 1, 1995: 31-37.
- [53] **TATEFUGI. T; YAMOUCI. H ; IKEDA. M ; ANDO. S; KURINOTA. M.** effet of propolis obtained in brazil on infectivity of virus. Nat. med 47, 1993: 4-60 .
- [54] **VALCIC. S; MONTENIGRO. G; MARIA. M; AVILA. G; FRANZBLAU. S; SINGH. MP; MAIESE. WM; TIMMERMANN. BN.** Phytochemical, morphological, and biological investigation of propolis from central chile, verlag der zeitschrift fur naturforschung 54,1999:406-416.
- [55] **VELIKOVA.M,BANKOV.V;TSVELKOVA.I;KUJUMGIEV.A;MARCUCCI.M.** antibacterial- kaurene from brazilian propolis stingless bees. Fitoterapia 71, 2000: 6-69.
- [56] **VOIRIN. B ;** 1970. these de doctorat université de lion.
- [57] **WOISKY. R- G ; GIESBRECHT. A- M ; SALATINO. A.** atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de propolis de apis mellifera l. red. Farm. Bioquim. Univ. S. paulo 30; 1994: 19-21 cité par **SFORCIN^{a,*}. J. M; FERNONDES JR^a. a ; LOPES^{a,*} C.A.M ; BANKOVA^b. V ; FUNARIA^a.S.R.C.** seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology 73, 2000: 243-249.

Sites internet:

- [58] [http: / www.01 santé.com/version.1/toutes thérapeutiques/produits:ruche/propolis.htm](http://www.01santé.com/version.1/toutes_therapeutiques/produits_ruche/propolis.htm)
- [59] www.naturimania.com
- [60] www.biosanté.com
- [61] [http :membres lycos.fr/mourad/flavonoides.html](http://membres.lycos.fr/mourad/flavonoides.html)
- [62] [file://A:\propolis%20antibiotique %20 naturel%20 recherches.htm](file://A:\propolis%20antibiotique%20naturel%20recherches.htm)
- [63] [http: / www.vulamis-medical.com / texts / streptoc . htm.](http://www.vulamis-medical.com/texts/streptoc.htm)

Anexe

Reference bibliographique:

[64] Flining H.P. Microbial en hibition of isolates of pediococcus from.
Cum cumber branie. Apple environ Microbial, 30.1975: 1040 . 1042

Annexe

Les réactifs

1-Violet de gentiane (pour la coloration de Gram)

| | |
|----------------------------------|--------|
| ❖ Violet de gentiane | 1g |
| ❖ Alcool à 90 ⁰ | 10ml |
| ❖ Phénol | 2g |
| ❖ Eau distillée | 100 ml |

2- lugol :

| | |
|----------------------------|-------|
| ❖ Iode | 1g. |
| ❖ Iodure de potassium..... | 2g |
| ❖ Eau distillée | 100ml |

3- fuschine de ziehl :

| | |
|--|-------|
| ❖ Fuschine basique | 1g |
| ❖ Alcool éthylique à 90 ⁰ | 10 ml |
| ❖ Phénol | 5g |
| ❖ Eau distillée | 100ml |

Pour la coloration de Gram, cette solution doit être diluée au 15 % ou bien le colorant doit être dilué sur la lame (1 goutte de colorant sur la lame recouverte d'eau)

4- Kovacs : réactif pour indole

| | |
|--|--------|
| ❖ Alcool amylique ou isoamylique | 150 ml |
| ❖ P.diméthylaminobenzaldehyde | 10g |
| ❖ Acide chlorhydrique concentré | 50 ml |

Ajouter l'acide en dernier et lentement conserver au réfrigérateur.

5- nitrate

Réactif I

| | |
|----------------------------|--------|
| ❖ Acide acétique | 285 ml |
| ❖ Eau distillée | 715ml |
| ❖ Acide sulfanilique | 8g |

Réactif II

| | |
|----------------------------|--------|
| ❖ Acide acétique | 285ml |
| ❖ Eau distillée | 715 ml |
| ❖ N-N diméthyl amine | 6ml |

6- éthanol 60⁰

| | |
|--------------------------------|-----------|
| ❖ Alcool 96 ⁰ | 104.34 ml |
| ❖ Léau distillée | 95.659 ml |

Milieux de culture

1- Gelose nutritive ordinaire

| | |
|-----------------------------------|-----|
| ❖ Extrait de viande de bœuf | 5g |
| ❖ Peptone | 10g |
| ❖ Chlorure de sodium | 5g |
| ❖ Gélose | 15g |
| ❖ pH..... | 7.2 |

2- Gélose Hektoen

| | |
|-----------------------------------|--------|
| ❖ Protéose peptone | 3g |
| ❖ Extrait de levure | 5g |
| ❖ Chlorure de sodium | 5g |
| ❖ Sels biliaires | 9g |
| ❖ Citrate de fer ammoniacal | 1.5 g |
| ❖ Salicine | 2g |
| ❖ Lactose | 12g |
| ❖ Saccharose | 12g |
| ❖ Fuchsine acide | 0.1 g |
| ❖ Bleu de bromothymol | 0.065g |
| ❖ Agar | 13g |
| ❖ pH..... | 7.5 |

3- Muller-Hinton (Gélose pour antibiogramme).

| | |
|--------------------------------------|-------|
| ❖ Extrait de viande | 2g |
| ❖ Hydrolysate acide de caseine | 17.5g |
| ❖ Amidon | 1.5g |
| ❖ Gélose | 10g |
| ❖ PH | 7.4 |

Autoclaver 15 mm a 115 c⁰

4- milieu Chapman : (en gr/l)

| | |
|----------------------------|----------|
| ❖ Extrait de viande | 1g/l |
| ❖ Chlorure de sodium | 75g/l |
| ❖ Peptone | 10g/l |
| ❖ Gélose | 15g/l |
| ❖ Mannitol | 10g/l |
| ❖ 5/Rouge de phénol..... | 0.025g/l |

5- mannitol –mobilité (gélose ou milieu)

| | |
|------------------------------|-----|
| ❖ Peptone | 20g |
| ❖ Nitrate de potassium | 1g |
| ❖ Mannitol | 2g |
| ❖ Rouge de phénol à 1% | 4ml |
| ❖ Gélose | 4g |
| ❖ PH..... | 8.1 |

6- TSI (Gélose ou milieu). Gélose, glucose, lactose, saccharose, H₂S

| | |
|------------------------------|-------|
| ❖ Peptone | 20g |
| ❖ Extrait de viande | 3g |
| ❖ Extrait de levure..... | 3g |
| ❖ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ❖ Glucose..... | 1g |
| ❖ Lactose..... | 10g |
| ❖ Saccharose..... | 10g |
| ❖ Citrate de fer..... | 0.5g. |
| ❖ Hyposulfite de sodium..... | 0.5g |
| ❖ Rouge de phénol..... | 25g |
| ❖ Gélose..... | 12g |
| ❖ PH..... | 7.4 |

7- Simmons (Milieu ou gélose au citrate)

| | |
|-----------------------------------|------|
| ❖ Sulfate de magnésium..... | 0.2g |
| ❖ Phosphate mono ammoniacque..... | 1g |
| ❖ Phosphate dipotassique..... | 1g |
| ❖ Citrate de sodium | 2g |
| ❖ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ❖ Bleu de bromothymol..... | 80g |
| ❖ Gélose..... | 12g |
| ❖ PH..... | 6.8g |

8- Eau péptonée:

| | |
|---------------------------------|-----|
| ❖ Peptone exempte d'indole..... | 15g |
| ❖ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ❖ PH..... | 7.2 |

9- urée – indol. milieu de Fergusson:

| | |
|----------------------------------|------|
| ❖ L- tryptophane..... | 3g |
| ❖ Phosphate mono-potassique..... | 1g |
| ❖ Phosphate bipotassique | 1g |
| ❖ Chlorure de sodium..... | 5g |
| ❖ Urée..... | 20g |
| ❖ Alcool à 95%..... | 10ml |
| ❖ Rouge de phénol..... | 25mg |
| ❖ PH..... | 6.7 |

10- Bouillon nutritif:

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

11- Eau physiologique:

| | |
|---------------------------|---------|
| ❖ Chlorure de sodium..... | 8.5g |
| ❖ Eau distillée..... | 1 litre |

Réalisé par :

Date de soutenance : 17 Juillet 2006

KRID Rima
GHOUBICHE Sihem
GRES Hanane

Thème :

Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis vis-à-vis des différentes souches bactériennes

Résumé :

La propolis a attiré beaucoup d'attention dans les années récentes comme une substance naturelle d'intérêt thérapeutique et industriel.

Notre thème porte sur l'étude de l'une des plus importantes propriétés thérapeutiques de ce produit : la propriété antibactérienne.

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antibactérienne de la propolis provenant de la région de kaous (Jijel) vis à vis de différentes souches bactériennes : *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

La méthode de diffusion en gélose montre une sensibilité importante des bactéries G(+) et limitée des bactéries G(-) à l'extrait éthanolique de la propolis, dont les valeurs des CMI varient entre 0,1 et 1,6 mg/ml.

Mots clés : propolis- flavonoïdes- activité antibactérienne- CMI.

Summary:

The propolis attracted much attention in the recent years like a natural substance of therapeutic and industrial interest.

Our topic relates to the study of the one of the most important therapeutic properties of this product: the property antibactérienne.

In our work we studied the antibactérienne activity propolis coming from the area of kaous (Jijel) with respect to various bacterial stocks: *Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

The method of diffusion in gélose shows to a sensitivity important of the bacteria G (+) and limited bacteria G (-) to extract ethanolic of the propolis, whose values of the CMI vary between 0,1 and 1,6 mg/ml.

Key words: antibacterial activity, MIC - propolis- flavonoides.

ملخص:

جلب البروبوليس الكثير من الانتباه في السنوات الماضية كمادة طبيعية ذات فائدة علاجية و صناعية. يعتمد موضوعنا على دراسة واحدة من أهم الخصائص العلاجية لهذه المادة خاصة ضد البكتيريا. في عملنا هذا قمنا بدراسة نشاط بروبوليس منطقة "قاوس" (جيجل) ضد سلالات بكتيرية مختلفة:

Speudomonas, *proteus*, *Klebsiella*, *salmonella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*.

بينت طريقة الانتشار في الوسط الصلب حساسية كبيرة للبكتيريا ذات الغرام الموجب و محدودة للبكتيريا ذات الغرام السالب اتجاه المستخلص الكحولي للبروبوليس، بحيث تتراوح قيم الـ CMI بين 0.1 و 1.6مغ/ملل.

الكلمات المفتاح: نشاط مضاد للبكتيريا، CMI، الفلافونويدات، البروبوليس.

Responsable de recherche :

Madame : ROULA Sagia