

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université Frères Mentouri-Constantine 1**  
**Faculté des Sciences Exactes**  
Département de Chimie

N° D'ordre : 63/D3C/2023  
N° Série : 07/CH/2023

**Thèse**  
Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)

**Spécialité : Chimie organique**

**Par**  
**M<sup>me</sup> DAIKH Amina**

**Investigation phytochimique et biologique de la  
propolis Algérienne**

Devant le jury

<b>Président :</b>	<b>Akkal Salah</b>	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1
<b>Directrice de thèse :</b>	<b>Segueni Narimane</b>	Pr. Université Salah Boubnider, Constantine 3
<b>Examineur :</b>	<b>Zellagui Amar</b>	Pr. Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi
<b>Examineur :</b>	<b>Benkiniouar Rachid</b>	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1
<b>Examineur :</b>	<b>Bicha Sabrina</b>	Pr. Université Frères Mentouri, Constantine 1

## ***Dédicace :***

### ***Je dédie ce modeste travail***

*A la mémoire de mon admirable père.*

*A ma chère mère, qui m'a soutenue moralement et matériellement dans ma vie et mes études.*

*A mon mari Rida, Pour ton amour et ton soutien, je te remercie pour ta grande patience.*

*A mes anges Arwa et Aness, vous êtes toute ma vie.*

*A mes frères et sœur.*

*A toute personne qui me connais.*

*Amina*

## **Remerciements**

*Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier sincèrement madame **Segueni Narimane** ma directrice de thèse de m'avoir encadré et d'avoir dirigé ce travail. Un grand merci aussi pour sa patience, ses encouragements, ses précieux conseils, ses critiques constructives. Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Je souhaite également remercier les membres du jury, Mr. **AKKAL SALAH**, professeur à l'Université frères Mentouri Constantine 1 et Mr. **ZELLAGUI AMAR**, professeur à l'Université Larbi Ben'Mhidi (OEB), Mr. **BENKINIOUAR RACHID** professeur à l'Université frères Mentouri Constantine 1. Mme **BICHA Sabrina** professeur à l'Université frères Mentouri Constantine 1 pour l'importance qu'ils ont accordé à mon travail en acceptant d'être membres de ce jury et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire.*

*Un grand merci à monsieur **Ahmed TOUIL** professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine-1, pour son aide et ses conseils.*

*J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire des sciences et des arts de la biologie, Faculté de l'Université Pamukkale Denizli, Turquie sous la direction de madame le professeur **Nazime Mercan Dogan**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.*

*Enfin, mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Liste des abréviations :

ABTS : 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

A0.5 : Concentration indiquant 0,5 d'absorbance

Abs: Absorbance

Al(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (H<sub>2</sub>O) 9: Nitrate d'aluminium

BHT: Hydroxytoluène butylé.

BHA: Hydroxyanisole butylé

CUPRAC: Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity

CH<sub>3</sub>COOK : Acétate de potassium

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

d : doublet

dd : doublet de doublet

DPPH : 2,2 diphényl-1-picryl-hydrazyl

EAG : Equivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent Quercétine

EI-MS: Electron Ionization Mass Spectrometer

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IC<sub>50</sub> : Concentration des extraits nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres

*J*(Hz) : Constante de couplage exprimée en Hertz

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide)

m : multiplet

NC : Néocuproéne

NH<sub>4</sub>Ac : Acétate d'ammonium

RMN<sup>1</sup>H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.

RMN<sup>13</sup>C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone.

RMN<sup>1</sup>D : Résonance Magnétique Nucléaire monodimensionnelle

R<sub>f</sub> : Facteur de retardation.

s : singulet

TPC : Taux des polyphénols

TFC : Taux des flavonoïdes

UV: Ultraviolet

UPLC-ESI-MS / MS : chromatographie liquide ultra-performante couplée à une spectrométrie de masse en tandem avec une source d'ionisation électrospray  
 $\delta$  ppm : déplacement chimique en partie par million par

## Liste des figures

Figure 1 : La propolis brute.....	10
Figure 2: Récolte de la propolis par l'abeille.....	10
Figure 3 : grille de propolis au niveau de la ruche.....	11
Figure 4: Récolte de la propolis par l'homme.....	12
Figure 5: Composition de la propolis.....	14
Figure 6: Biofilm produit par une souche de <i>Staphylococcus epidermidis</i> dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de FilmTracer™ FM® 1-43.....	20
Figure 7 : la plaque dentaire (biofilm dentaire).....	21
Figure 8 : Squelette de base des flavonoïdes.....	24
Figure 9: Isoprène.....	28
Figure 10 : squelette de base des polyphénols.....	30
Figure 11: Protocole d'extraction de la propolis.....	47
Figure 12 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT (Mosmann 1983).....	49
Figure 13 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH.....	52
Figure 14 : ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).....	53
Figure 15 : la réduction du complexe Cu <sup>+2</sup> -NC.....	54
Figure 16: Structure de l'acide gallique.....	55
Figure 17 : Structure de la quercétine.....	56
Figure 18: Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 et des staphylocoques résistants à la méthicilline (MRSA10, MRSA18et MRSA20).....	71
Figure 19 : Cytotoxicité des extraits de propolis sur les cellules Caco-2 après 48 h.....	74
Figure 20: Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait PE1.....	77
Figure 21: Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait EA5.....	78
Figure 22: Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait ME5.....	78
Figure 23: Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait CL3.....	79

Figure 24 : les principaux composés phénoliques présents dans les extraits.....	79
Figure 25 : Courbes d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations.....	83
Figure 26: Courbes d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations.....	84
Figure 27 : Courbes d'absorbance du test du blanchissement du $\beta$ -carotène des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations.....	86
Figure 28: Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test CUPRAC.....	87
Figure 29 : Courbes d'absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test FRAP.....	88
Figure 30: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux...89	
Figure 31: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....89	
Figure 32 : Dosage des flavonoïdes et des polyphénols.....90	
Figure 33 : Cytotoxicité de traitement des extraits de propolis sur les cellules MDA-MB-231 après 24h.....92	
Figure 34: Analyse de l'apoptose d'extraits de propolis de Mila par cytomètre.....93	
Figure 35: Effets des extraits de Propolis de Mila sur l'expression de Caspase3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53.....95	
Figure 36: Expression des gènes Caspase3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53 des cellules traitées et témoins.....96	
Figure 37 : Série spectrale UV-Visible du composé PCI34.....98	
Figure 38: Spectre RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé PCI34.....100	
Figure 39 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) du composé PCI34.....101	
Figure 40 : 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine).....102	
Figure 41 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ ppm) du composé PAC27.....104	
Figure 42: Spectre RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ ppm) du composé PAC27.....105	
Figure 43 : 7-méthoxy 3, 5 dihydroxyflavonol (Galangine 7-méthoxy).....106	
Figure 44 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC48.....107	
Figure 45 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ ppm) du composé PAC48.....109	
Figure 46: Spectre RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ ppm) du composé PAC48 (étalement).....110	
Figure 47 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ ppm) du composé PAC48.....111	
Figure 48 : 4',5,7-trihydroxy-3- méthoxyflavone (isokampferide).....111	

<b>Figure 49 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé SN10.....</b>	<b>113</b>
<b>Figure 50: Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé SN10.....</b>	<b>115</b>
<b>Figure 51 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé SN10 (étalement).....</b>	<b>115</b>
<b>Figure 52 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé SN10 (étalement).....</b>	<b>116</b>
<b>Figure 53: Spectre RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé S10.....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 54 : 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine).....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 55: Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC79.....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 56: Spectre RMN- <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δppm) du produit PAC79.....</b>	<b>121</b>
<b>Figure 57 : Etalement du spectre RMN- <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δppm) du produit PAC79.....</b>	<b>121</b>
<b>Figure 58: Apigénine 7-méthoxy.....</b>	<b>122</b>
<b>Figure 59: Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC91.....</b>	<b>124</b>
<b>Figure 60: Spectre RMN- <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δppm) du produit PAC91.....</b>	<b>125</b>
<b>Figure 61:5, 7, 4'-trihydroxyflavone (apigenine).....</b>	<b>126</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux constituants et source végétales connues pour être productrices de propolis.....	15
Tableau 2. Différentes classes de flavonoïdes.....	24
Tableau 3 : Les flavonoïdes identifiés dans la propolis.....	26
Tableau 4 : Les terpènes identifiés dans la propolis.....	28
Tableau 5: Les acides phénoliques identifiés dans la propolis.....	30
Tableau 6 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait chloroformique...	60
Tableau 7 : Regroupement des fractions de la phase chloroformique.....	61
Tableau 8 : Résultats de séparation de la fraction F6.....	61
Tableau 9 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle...	62
Tableau 10 : Regroupement des fractions de la phase acétate d'éthyle.....	63
Tableau 11: Résultats de séparation de la fraction F7.....	64
Tableau 12: Résultats de séparation de la fraction F17.....	64
Tableau 13: Résultats de séparation de la fraction F18.....	64
Tableau 14: Résultats de séparation de la Sous fraction F18.....	65
Tableau 15: Pourcentage de réduction de la formation du biofilm par les extraits de propolis à 300 (µg/ml).....	70
Tableau 16 : Résultats de comptage des CFU pour l'inhibition du biofilm par les extraits de propolis.....	73
Tableau 17 : Analyse UPLC-ESI-MS/MS des extraits de propolis (mg/g).....	76
Tableau 18 : Inhibition du radical DPPH par les extraits de propolis.....	82
Tableau 19: Activité antiradicalaire (ABTS) par les extraits de propolis.....	84
Tableau 20 : Activité de blanchissement du β-carotène par les extraits de propolis.....	85
Tableau 21: Activité CUPRAC des extraits de propolis.....	86
Tableau 22 : Activité FRAP des extraits des propolis.....	87
Tableau 23 : Teneur en flavonoïdes et en polyphénols.....	89
Tableau 24 : Données de la série spectrale UV-Visible du composé PCI34.....	98
Tableau 25 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PCI34.....	99
Tableau 26 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PCI34.....	100
Tableau 27 : Données RMN- <sup>1</sup> H du composé PAC27.....	103
Tableau 28 : Données RMN- <sup>13</sup> C du composé PAC27.....	104
Tableau 39: Données de la série spectrale UV-Visible du composé PAC48.....	107

<b>Tableau 30: Données de la spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H du composé PAC48.....</b>	<b>109</b>
<b>Tableau 31 : Données RMN <sup>13</sup>C du composé PAC48.....</b>	<b>110</b>
<b>Tableau 32 : Maximums d'absorption du composé SN-10 dans le spectre UV-visible... </b>	<b>113</b>
<b>Tableau 33 : Données de la spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H du composé SN-10.....</b>	<b>114</b>
<b>Tableau 34 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé SN10.....</b>	<b>117</b>
<b>Tableau 35 : Maximums d'absorption du composé PAC79 dans le spectre UV-visible.....</b>	<b>119</b>
<b>Tableau 36: Données de la spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H du composé PAC79.....</b>	<b>120</b>
<b>Tableau 37: Maximums d'absorption du composé PAC91 dans le spectre UV-visible..</b>	<b>123</b>
<b>Tableau 38: Données de la spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H du composé PAC91.....</b>	<b>125</b>

## Sommaire

INTRODUCTION GENERALE .....	1
REFERENCES .....	5
<b>Chapitre I- Généralité sur La propolis</b>	
I-1-Historique.....	9
I-2-Définition.....	9
I-3-Récolte de la propolis.....	10
I-3-1- par les abeilles.....	10
I-3-2- par l'apiculteur.....	11
I-4-Propriétés physico-chimiques de la propolis.....	12
I-4-1- propriétés physiques .....	12
I-4-2- Propriétés Chimiques.....	13
I-5-Composition chimique.....	13
I-6- Origine botanique.....	14
I-6-1- Propolis des zones tempérées.....	14
I-6-2- Propolis des zones tropicales.....	14
I-6-3- la propolis des zones Pacifiques.....	15
I-6-4- la propolis méditerranéenne.....	15
I-7- La propolis Algérienne.....	17
I-7-1-Travaux antérieurs sur la propolis Algérienne.....	17
I-8-Propriétés pharmacologiques.....	19
I-8-1-Activité antimicrobienne.....	19
I-8-1-1-Activité antibactérienne.....	19
I-8-1-2-Activité antifongique.....	19
I-8-1-3-Activité antibiofilm.....	20
I-8-2-Activité anticancéreuse.....	21
I-8-3-Activité anti oxydante.....	22
I-9-Conservation.....	23
I-10-Toxicité.....	23
I-11-Composés chimiques isolés de la propolis.....	23
I-11-1-Flavonoïdes.....	23
I-11-2- Terpénoides.....	27
I-11-3- Acides phénoliques.....	29

Références.....	31
<b>Chapitre-II : Matériel et méthodes</b>	
II-1-Récolte de la propolis.....	46
II-2-Extraction.....	46
II-3-Etude de l'activité antibiofilm.....	47
II-3-1 Test de l'activité antibiofilm.....	48
II-3-2-Comptage des colonies.....	48
II-3-3-Analyse par microscopie optique.....	48
II-4-Détermination de la cytotoxicité.....	49
II-4-1-L'activité cytotoxique.....	49
II-5- Analyse UPLC-ESI-MS/MS.....	50
II-5-2-Analyse statistique.....	50
II-6-Etude de l'activité antioxydante.....	51
II-6-1-Test antiradicalaire au DPPH.....	51
II-6-2-Test du piégeage de l'ABTS.....	52
II-6-3-Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) .....	53
II-6-4-Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) .....	54
II-6-5-Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	54
II-7-Analyse quantitative des composés phénoliques.....	55
II-7-1-Dosage des composés phénoliques totaux (TCP) .....	55
II-7-1-1-Principe.....	55
II-7-1-2-Protocole.....	56
II-7-1-4-Courbe d'étalonnage.....	56
II-7-2-Dosage des flavonoïdes (TCF) .....	56
II-7-2-1-Principe.....	56
II-7-2-2-Protocole.....	57
II-9-2-3-Courbe d'étalonnage.....	57
II-10-L'activité cytotoxique.....	57
II-10-1-Mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP.....	58
II-10-2-Électrophorèse sur gel et western blot.....	58
II-10-3-Isolation d'ARN, synthèse d'ADNc et PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel.....	59
II-15-Étude phytochimique.....	60

II-15-1-Séparation et purification des composés de l'extrait chloroformique.....	60
II-15-2- Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	62
III -9-2-1- L'étude de la fraction F7.....	63
III -9-2-2- L'étude de la fraction F17.....	64
III -9-2-3- L'étude de la fraction F14.....	64
III -9-2-4- L'étude de la fraction F16.....	64
III -9-2-5- L'étude de la fraction F18.....	64
III-9-3- L'identification spectrale des composés isolés.....	65
II-9-3-1-spectrophotométrie UV-visible.....	65
II-9-3-2-Résonance magnétique nucléaire.....	65
Référence.....	66

## **Chapitre-III:Résultats et discussion**

III-I-1-1-Etude de l'activité antibiofilm.....	69
III-I-1-2-Comptage des colonies : L'unité formatrice de colonies UFC.....	72
III-I-2-L'activité cytotoxique.....	74
III-I-3- Analyse par chromatographie en phase liquide ultraperformante avec ionisation électro spray couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-ESI-MS/MS).....	75
III-I-4- Étude de l'activité antioxydante.....	82
III-I-4-1-Test de l'activité antiradicalaire au DPPH.....	82
III-I-4-2-Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS.....	84
III-I-4-3-Test du blanchissement du $\beta$ -carotène.....	85
III-I-4-4-Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC) .....	86
III-I-4-5-Test de la réduction du Fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) .....	87
III-I-5-Dosage de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.....	88
III-I-6-L'activité cytotoxique.....	91
III-I-6-1-Mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP.....	92
III-I-6-2-Électrophorèse sur gel et western blot.....	94
III-I-6-3-Isolation d'ARN <sub>m</sub> , synthèse d'ADN <sub>c</sub> et PCR en temps réel.....	95
III-II-Étude phytochimique de la propolis de Mila.....	97
III-II-1-Identification des produits isolés de l'extrait chloroformique.....	97

<b>III-II-1-1-Elucidation structurale du composé PCI34.....</b>	<b>97</b>
<b>III-II-2-Identification des produits isolés de l'extrait acétate d'ethyle .....</b>	<b>102</b>
<b>III-II-2-1-Elucidation structurale du composé PAC27.....</b>	<b>102</b>
<b>III-II-2-2-Elucidation structurale du composé PAC48.....</b>	<b>106</b>
<b>III-II-2-3-Elucidation structurale du composé SN10.....</b>	<b>112</b>
<b>III-II-2-4-Elucidation structurale du composé PAC79.....</b>	<b>118</b>
<b>III-II-2-5-Elucidation structurale du composé PAC91.....</b>	<b>122</b>
<b>Référence.....</b>	<b>127</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>135</b>

## Introduction générale

### Introduction générale

A partir du 20<sup>ème</sup> siècle, les produits de la ruche ont été étudiés scientifiquement pour déterminer leurs vertus dans le cadre de la santé. Ces multiples travaux, effectués par des chercheurs du monde entier, ont permis de déterminer en deux décennies leurs compositions précises, leurs propriétés réelles, leurs indications, leurs formes optimales d'utilisation, leurs doses précises pour leur efficacité. C'est ainsi qu'il y a une trentaine d'années est née cette nouvelle branche thérapeutique que l'on appelle l'apithérapie (**Donadieu, 2003**).

L'apithérapie est le traitement des maladies par les produits récoltés, transformés ou sécrétés par l'abeille. Ce sont essentiellement des thérapeutiques de terrain qui visent la prévention des maladies mais aussi ont des vertus curatives (**Donadieu, 2003**).

La propolis est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. La propolis ou colle d'abeille est définie comme un remède naturel utilisé depuis les temps les plus anciens. Elle est récoltée par les abeilles à partir des résines, des bourgeons et des écorces de plantes variées principalement le peuplier. Après cette récolte, les abeilles l'additionnent à leurs propres sécrétions (**Park et al., 1999**). Dans la ruche, la propolis a de multiples usages : c'est un mortier qui sert au colmatage des fissures ou interstices, à l'étanchéité (face à l'humidité et au développement des moisissures) et à la protection de la colonie par la réduction de l'entrée de la ruche. En effet, l'ouverture à l'entrée de la ruche est constamment remodelée afin d'ajuster ses dimensions et son orientation aux conditions climatiques (**Cardinault, 2012**).

Ce produit de la ruche est un puissant antifongique, antibactérien, anti-infectieux (**Lupatini et al., 2016**), antioxydante (**Kumazawa et al., 2004 ; Woźniak et al., 2004**), antitumorale (**Ishihara et al., 2009 ; Slavov et al., 2013**) et anti-inflammatoire (**Naik et al., 2013**). Elle favorise la guérison et la cicatrisation des plaies, et présente de nombreuses autres propriétés pour la santé (**IuF et al., 1995 ; Vynograd et al., 2000**).

Les infections causées par le biofilm sont devenues de plus en plus problématique car l'irradiation du biofilm par les antibiotiques conventionnels devient de plus en plus difficile. De nombreuses études ont démontré l'efficacité des antibiotiques face à ce problème (**Wojtyczka et al., 2013**). De nombreux mécanismes de résistance sont mis en place dans un biofilm. De plus des hétérogénéités génétiques et physiologiques des cellules bactériennes peuvent apparaître.

## Introduction générale

---

Le développement de nouveaux agents antibiofilms a attiré l'attention de nombreux chercheurs. A cet égard les produits naturels en général et les produits de la ruche en particulier ont largement été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes. La propolis est utilisée dans les traitements et la prévention des infections remonte au temps les plus anciens. Les anciens égyptiens ont utilisé la propolis pour ses propriétés antiputréfiques et pour conserver les cadavres. Les Romains et les Grecs ont utilisé la propolis comme antiseptique et désinfectant (**Burdock, 1998**).

Ces dernières années, l'activité antibiofilm de nombreuses propolis dans le monde ont été évaluées. Ces études ont démontré l'effet de la propolis sur la réduction de la formation du biofilm (**Kouidhi et al., 2010; Wojtyczka et al., 2013; da Cunha et al., 2016; Doganli, 2016; Stan et al., 2016**).

Cependant aucun travail n'a été réalisé sur les propolis algériennes.

Le cancer du sein est l'une des causes majeures de mort des femmes dans le monde entier (**Golubnitschaja et al., 2016**). La radiothérapie, la chimiothérapie ainsi que l'hormonothérapie combinée à la chirurgie sont les traitements les plus utilisés. Cependant, l'apparition de résistance aux différents médicaments utilisés ainsi que la gravité des effets indésirables et de leur grande incidence sont responsables de nombreux échecs des traitements préalablement cités. La recherche de nouvelles approches et de nouveaux agents anticancéreux est d'une grande importance et peut améliorer la qualité de vie des patients (**Mitra et al., 2018**).

La propolis est une source inépuisable de substances bioactives et peut être utilisée en traitement alternatif et complémentaire aux méthodes conventionnelles actuelles. Les études ont démontré que la propolis est active sur de nombreux types de cancer (**Czyżewska et al., 2016; Kapare et al., 2019 ; Gastaldello et al., 2021**).

Les mécanismes d'action de la propolis impliquent une inhibition du NF- $\kappa$ B, une régulation de certaines enzymes clés tels que ANAX7 et la protéine P53 et une régulation des espèces réactives à l'oxygène au niveau de la membrane mitochondriale (**Xuan et al., 2014**). De plus la propolis prévient la prolifération des cellules cancéreuses induisant l'apoptose et en réduisant le potentiel de la membrane mitochondriale (**Demir et al., 2016**).

Les propolis algériennes ont été testées sur plusieurs lignées de cancers tels que le mélanome (**Benguedouar et al., 2015**), le cancer du pancréas (**Rouibah et al., 2018**) et le cancer des poumons (**Brihoum et al., 2018**). Cependant, très peu de travaux ont été réalisés sur l'effet des propolis algériennes sur les différentes lignées du cancer du sein.

## Introduction générale

---

Sa composition chimique varie en fonction de plusieurs facteurs tels que : l'origine botanique, l'espèce d'abeille. Plusieurs types de propolis ont été découverts tels que la propolis verte du Brésil ou la propolis pacifique...etc. Les propolis présentent une très grande diversité avec des variations de la composition chimique et des propriétés pharmacologiques (**Bankova et al 2000**).

La propolis est très étudiée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Cependant, la propolis algérienne reste très peu étudiée même si quelques travaux y sont consacrés. Sa composition chimique, ses propriétés thérapeutiques ainsi que son origine botanique sont jusqu'à ce jour très peu étudiés.

Dans le cadre de continuité de nos travaux de recherche sur les propolis algériennes et dans le but d'aider à valoriser nos propolis, nous avons choisi l'étude de la propolis de plusieurs régions de l'est algérien avec l'objectif de comparer la richesse en polyphénols totaux et évaluer leur activité antibiofilm, anticancéreuse et antioxydante.

Notre travail est divisé en trois chapitres dont le premier a été consacré à des généralités et aux données bibliographiques sur la propolis.

Le deuxième chapitre est subdivisé en deux parties: la première partie concerne une étude comparative de cinq propolis Algériennes en fonction de leur activité antibiofilm et la cytotoxicité sur les cellules d'adénocarcinome (Caco-2), leurs profils chimiques analysés a été réalisé par UPLC-ESI-MS/MS. En second lieu, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de deux autres propolis par cinq méthodes différentes (DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotène, CUPRAC, FRAP) et nous avons effectué une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux. De plus, l'étude de différents mécanismes de cytotoxicités sur la lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB-231 a été réalisée en adoptant plusieurs tests tels que l'évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT, la mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP, l'électrophorèse sur gel et western blot ainsi que l'isolation d'ARN<sub>m</sub>, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel .

Cette première partie de notre travail nous a permis de faire une première classification des propolis étudiées et de choisir la propolis la plus active pour une investigation phytochimique afin de séparer et d'identifier les différents constituants de cette propolis. Les principaux composés sont ensuite séparés par les différentes techniques chromatographiques. L'identification et la détermination de la structure de ces composés est réalisée par les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) monodimensionnelle ainsi que la spectrométrie UV-visible.

## **Introduction générale**

---

Enfin le troisième chapitre présente les résultats de nos travaux de recherche et leurs discussions.

### Références:

- Bankova, V., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3–15.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., & Antonicelli, F. (2015). Algerian ethanolic extract of Propolis and galangin decreased melanoma tumour progression in C57BL6 mice. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 142(6), 294-294.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), 1-12.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363.
- Czyżewska, U., Siemionow, K., Zaręba, I., & Milyk, W. (2016). Proapoptotic activity of propolis and their components on human tongue squamous cell carcinoma cell line (CAL-27). *PLoS One*, 11(6), e0157091.
- da Cunha, M. G., Franchin, M., de Paula-Eduardo, L. F., Freires, I. A., Beutler, J. A., de Alencar, S. M., ... Rosalen, P. L. (2016). Anti-inflammatory and anti-biofilm properties of ent-nemorosone from Brazilian geopropolis. *Journal of Functional Foods*, 26, 27–35.
- Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S. O., ... & Deger, O. (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*, 68(1), 165-172.
- Doganli, G. A. (2016). Phenolic content and antibiofilm activity of propolis against clinical MSSA strains. *Records of Natural Products*, 10(5), 617–627.
- Donadieu, Y. Introduction à l'apithérapie. 2003.
- Gastaldello, G. H., Cazeloto, A. C. V., Ferreira, J. C., Rodrigues, D. M., Bastos, J. K., Campo, V. L., ... & Tefé-Silva, C. (2021). Green Propolis Compounds (Baccharin and p-Coumaric Acid) Show Beneficial Effects in Mice for Melanoma Induced by B16f10. *Medicines*, 8(5), 20.
- Golubnitschaja, O., Debal, M., Yeghiazaryan, K., Kuhn, W., Pešta, M., Costigliola, V., & Grech, G. (2016). Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. *Tumor Biology*, 37, 12941-12957.

- Holz, J. (1999). *Zur Wirksamkeit von Propoliszubereitungen bei Otitis externa des Hundes sowie Untersuchungen der antibakteriellen, antiviralen Aktivitäten von ethanologischen Propolisextrakten und deren Wirkung auf Zellkulturen* (Doctoral dissertation).
- Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y., & Suzui, M. (2009). Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology reports*, 22(2), 349-354.
- IuF, M., Orlovskaia, L. E., & Andreev, V. P. (1995). The use of ocular drug films of propolis in the sequelae of ophthalmic herpes. *Voенно-медицинский Журнал*, (12), 36-9.
- Kapare, H., Lohidasan, S., Sinnathambi, A., & Mahadik, K. (2019). Standardization, anti-carcinogenic potential and biosafety of Indian propolis. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 10(2), 81-87.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe*, 16(6), 566–571.
- Lupatini, N. R., Danopoulos, P., Swikidisa, R., & Alves, P. V. (2016). Evaluation of the antibacterial activity of green propolis extract and meadowsweet extract against *Staphylococcus aureus* bacteria: Importance in wound care compounding preparations. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 20(4), 333-337.
- Mitra, S., & Dash, R. (2018). Natural products for the management and prevention of breast cancer. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2018.
- Naik, D. G., Mujumdar, A. M., & Vaidya, H. S. (2013). Anti-inflammatory activity of propolis from Maharashtra, India. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 35-43.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Moura, F. F., & Ikegaki, F. F. M. (1999). Atividade biológica da própolis. *Revista OESP–Alimentação*, 27, 46-53.
- Rouibah, H., Kebsa, W., Lahouel, M., Zihlif, M., Ahram, M., Aburmeleih, B., ... & Al-Ameer, H. J. (2018). Algerian propolis potentiates doxorubicin mediated anticancer effect against human pancreatic PANC-1 cancer cell line through cell cycle arrest, apoptosis induction and P-glycoprotein inhibition. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(3), 375-387.
- Slavov, A., Trifonov, A., Peychev, L., Dimitrova, S., Peycheva, S., Gotcheva, V., & Angelov, A. (2013). Biologically active compounds with antitumor activity in propolis

extracts from different geographic regions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(4), 4010-4013.

- Stan, T., Marutescu, L., Chirifiuc, M. C., & Lazad, V. (2016). Anti-pathogenic effect of propolis from different regions on *Staphylococcus* Sp. Clinical strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11166–11175.

- Vynograd, N., Vynograd, I., & Sosnowski, Z. (2000). A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7(1), 1-6.

-Wojtyczka, R. D., KeR pa, M., Idzik, D., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Dziedzic, A., & Wałsik, T. J. (2013a). In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1.

-Wojtyczka, R. D., Dziedzic, A., Danuta, I., KeR pa, I., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Wałsik, T. J. (2013b). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. *Molecules*, 18(8), 9623–9640.

- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of propolis extracts from Poland. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X19849777.

- Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., ... & Hu, F. (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

# **Chapitre I :**

# **Généralité sur la**

# **propolis**

### I-1-Historique :

Le mot propolis vient du grec ancien qui signifie « pro » devant, en avant de et « polis » cité. En effet, l'abeille utilise cette résine pour protéger l'intérieur de la ruche (**Wagh, 2013**). La propolis a été utilisée comme médecine populaire depuis les temps les plus reculés (**Ghisalberti, 1979 ; Molan, 1992 ; Bankova, 2005**). Les anciens égyptiens l'utilisaient comme substance « embaumante ». Ils embaumaient leurs momies et ainsi les sauvegardaient des microbes et autres parasites (**Nicolas, 1947**). La propolis a été largement utilisée par les anciens Grecs. Aristote la signale comme remède aux plaies infectées dans son « Histoire des animaux ». Les Romains l'ont donné à tous les soldats pour soigner les blessures de la guerre (**Andrzej et al., 2013**).

Au cours du premier siècle avant Jésus Christ, le célèbre savant Latin Varron en fait état dans ses travaux ainsi que le poète Virgil dans ses écrits. A Rome, la propolis était très recherchée ou elle se vendait plus cher que le miel. Chaque légionnaire Romain en possédait une petite quantité sur lui au moment de campagnes militaires (**Donadieu, 1981 ; Eric Debuyser, 1984**). Puis au II<sup>ème</sup> siècle, c'est au tour du célèbre médecin grec Galien d'en faire mention dans ses traités et d'en conseiller l'usage. Plus tard, au XI<sup>ème</sup> siècle, le grand médecin Iranien Abu Ali Iben Sina (Avicenne) cite la propolis comme Un « *grand médicament* ». En Amérique centrale, c'est au cours du XI<sup>ème</sup> siècle que les Incas semblaient utiliser la propolis dans le cadre des infections fébriles. Elle est retrouvée également dans les livres de médecine de Géorgie à partir du XII<sup>ème</sup> siècle. En France, c'est au cours des XVIII<sup>ème</sup> et XIX<sup>ème</sup> siècles qu'on retrouve quelques traces de son usage dans le pansage et le soin des plaies. (**Lavie, 1975 ; Hegazi et al., 1998**).

### I-2-Définition :

La propolis (**Figure-1**) est une substance résineuse gommeuse et balsamique collectée par les abeilles mellifères sur certaines parties de végétaux (les bourgeons, de l'écorce, les feuilles et les exsudats) (**Lotti et al., 2010**). Les parties collectées sont mastiquées et mélangées avec des enzymes salivaires. Enfin, le produit partiellement digéré est mélangé avec de la cire.



**Figure-1** : La propolis brute [1].

### **I-3-Récolte de la propolis :**

#### **I-3-1- par les abeilles :**

La récolte de la Propolis est faite par un nombre d'abeilles spécialisées dans la récolte des résines et la fabrication de la propolis. Elle est relativement restreinte au sein d'une colonie d'abeilles. En général leurs activités est plus intense aux heures chaudes de la journée (température le plus souvent supérieure à 20°C) et se déroule du printemps jusqu'à la fin de l'été. Les ouvrières butineuses localisent la source de résines et triturent celle-ci avec leurs mandibules, les mélangent a d'autre substances de leurs propres sécrétions afin de fabriquer de la propolis. Une fois fabriquée, la propolis est transportée à la ruche dans les corbicules (ou corbeilles) situées dans les pattes postérieures de l'abeille (**Philippe, 1994**).



**Figure-2:** Récolte de la propolis par l'abeille [2].

La quantité de propolis fabriquée dépend de la race d'abeille, de la flore butinée et de la saison. Au sein d'une même race, la quantité de propolis récoltée par les abeilles est de l'ordre de 100 à 300g par ruche par an (**philippe, 1994**).

### **I-3-2- par l'apiculteur:**

Traditionnellement, L'homme récolte la propolis selon deux méthodes diverses :

-Raclage et grattage des cadres et des parois internes: cette méthode consiste à gratter la propolis qui se dispose sur toute la circonstance des cadres et les parois internes de la ruche, de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux (**Lavie, 1975**).

-Utilisation de grilles : c'est une méthode très efficace qui donne une très bonne qualité de propolis. Elle consiste à mettre des grilles en plastique, en métal ou en textile synthétique comme couvre cadres à l'intérieur de la ruche. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été. Les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche (**Krell, 1996, Evangelist-Rodrigues et al., 2001**).



**Figure 3** : grille de propolis au niveau de la ruche [3].



Figure 4: Récolte de la propolis par l'homme [4]

### I-4-Propriétés physico-chimiques de la propolis :

#### I-4-1- propriétés physiques :

. **Consistance** : La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable, en fonction de la température

- A 15°C, elle est dure et friable.
- A 30 °C, elle est molle et malléable.
- Entre 30 °C et 60 °C elle devient collante ou gluante, jusqu'à fondre vers 60-70 °C ou plus (**Donadieu, 2008**).

. **Couleur** : la propolis a une couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toute une gamme de bruns extrêmement riche et étendue (**Lavie, 1975 ; Krell, 1996 ; Evangelist-Rodrigues et al., 2001**). Mais même la propolis transparente a été signalée par (**Hausen et al., 1987**).

. **Saveur** : elle est souvent âcre et parfois amère.

. **Odeur** : variable suivant son origine. En général, arôme, agréable, douceâtre mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille...etc) (**Tosi & Enzo, 2006**). Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (**Harnaj, 1978**).

### I-4-2- Propriétés Chimiques:

. **Solubilité** : De nombreuses méthodes d'extraction ont été utilisées telles que la macération, la sonication, le Soxhlet, les micro-ondes et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique (**Bankova et al., 2021**). Habituellement, les solvants utilisés pour extraire la propolis sont l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane, le hexane, l'acétate d'éthyle (**Zin et al., 2018**), l'eau et les mélanges eau/éthanol (**Biscaia et al., 2009**). L'utilisation de certaines huiles telle que l'huile d'olive ainsi que les solvants eutectiques profonds naturels (NaDES) (Natural Deep Eutectic Solvents) ont démontré un potentiel prometteur (**Bankova et al., 2021**).

. **Point de fusion** : Son point de fusion peut aller jusqu'à 100°C.

Chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties:

-Une partie visqueuse qui tombe au fond.

-Une partie liquide (cire de propolis) qui reste en surface et trouve de nombreux usages dans le domaine apicole (**Lavie, 1975**).

. **Densité** : Elle est d'ordre 1.2 en moyenne.

### I-5–Composition chimique :

De nombreuses études en rapport avec la composition chimique des différents types de propolis ont été réalisées permettant ainsi l'isolation et l'identification de centaines de composés. Jusqu'à 2018, plus de 850 composés ont été isolés et identifiés à partir de la propolis (**Šturm, 2020; Bouchelaghem, 2022**). Cette composition varie principalement en fonction de la source végétale visitée par les abeilles (**Bankova et al., 2005 ; Salatino et al., 2011 ; Toreti et al., 2013**).

De manière générale, la propolis recueillie dans la ruche est constituée de :

- 50 % de résines et baumes.

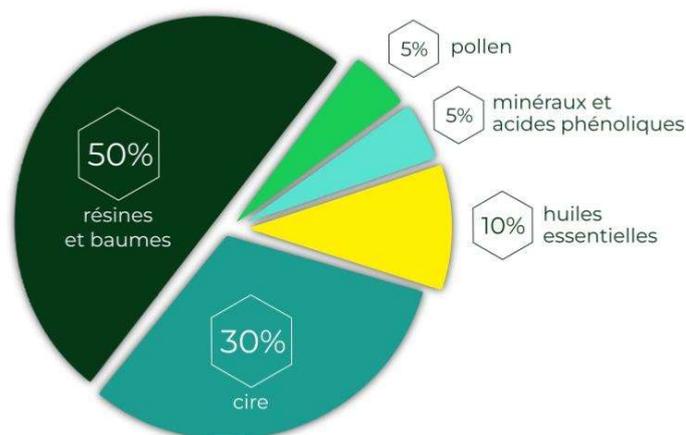
- 30% de cire.

- 10% d'huiles volatiles ou essentielles.

- 5% de pollen et 5% de matières diverses organiques et minérales. (**Gómez-Caravaca et al., 2006**)

Elle est riche d'un grand nombre de substances minérales, parmi lesquels nous trouvons en particulier : Mg, Ca, K, Na, Cu, Zn, Mn et Fe, .et les vitamines : B1, B2, B6, C et E. (**Vani Mamillapalli et al., 2018**) et quelques enzymes comme : la succinique déshydrogénase, la

glucose-6-phosphatase, l'adénosine triphosphatase et la phosphatase acide (Greenaway et al., 1990 ; Park et al., 2004) (Figure 5).



**Figure-5:** Composition de la propolis [5].

### I-6- Origine botanique:

Les origines florale et géographique, la saison et les facteurs environnementaux se reflètent sur les propriétés pharmacologiques et la composition de la propolis. Tout cela explique que l'on trouve de nombreux types de propolis tels que : propolis tempérée, tropicale, méditerranéenne et pacifique (Bankova, 2005).

#### I-6-1- Propolis des zones tempérées:

Plusieurs études ont démontré que la propolis des zones climatiques tempérées, comme l'Europe, l'Amérique du nord, l'Australie continentale et les régions non tropicales d'Asie sont des propolis de type peuplier. La propolis connue sous le nom de propolis de type peuplier, provient principalement des exsudats de bourgeons de *Populus nigra* (Salicaceae). Ces principaux constituants sont des flavonoïdes aglycones et des acides phénoliques ainsi que leurs esters (Ristivojević et al., 2015 ; Al-Ani et al., 2018). Il existe d'autres espèces en Russie telles que *Betula verrucosa* (Betulaceae) dérivé du bouleau qui contient aussi des flavones et des flavonols (Miguel & Antunes, 2011 ; Martinotti & Ranzato, 2015).

#### I-6-2- Propolis des zones tropicales :

Dans les zones tropicales les abeilles cherchent une autre source botanique de la propolis. Au Brésil, il existe au moins quatre sources distinctes de résine pour la production de propolis:

*Baccharis dracunculifolia*, la plante alecrim-do-campo (propolis verte brésilienne) (Kumazawa, 2003 ; Salatino, 2005), *Dalbergia ecastophyllum* (propolis rouge brésilienne) (Silva et al., 2008), *Hyptis divaricata* (propolis brune brésilienne) et *Populus alba* (propolis de type peuplier) (Paret al., 2002). À Cuba et au Venezuela, les abeilles rassemblent les résines de *Clusia spp*, (Clusiaceae), des propolis de ces regions contiennent des benzophénones comme principaux constituants (Cuesta-Rubio et al., 2002). A Hawaii, les espèces utilisées sont : *Plumeria accuminata*, *P. rubra acutifolia*, *Schinus terebinthifolius* et *Psidium guajava* (Tomás-Barberán et al., 1993).

### I-6-3- la propolis des zones Pacifiques :

La source végétale est *Macaranga spp* (Kumazawa et al., 2008). Cette propolis se retrouve dans de nombreuses régions comme Taiwan, Okinawa et Indonésie. Cette propolis provient de *Macaranga tanarius* (Euphorbiaceae) et se caractérise par sa richesse en C-géranyl flavanones (Trusheva et al., 2011 ; Kumazawa et al., 2014). Par contre, la propolis bolivienne des vallées (Cochabamba, Chuquisaca et Tarija) est riche en phénylpropanoïdes prénylés. Tandis que la propolis de La Paz et de Santa Cruz (Bolivie) présente une composition chimique différente riche en triterpènes cycloartane et pentacyclique (Nina et al., 2016).

### I-6-4- la propolis méditerranéenne :

La source végétale est les conifères (Silici et al., 2005). Cette propolis se retrouve dans de nombreuses régions comme la Grèce, la Sicile, Malte, Chypre, la Croatie et l'Algérie et contient principalement des diterpènes (Popova et al., 2010 ; Popova et al., 2011).

Les principaux constituants et source végétales connues pour être productrices de propolis sont représentés dans le **tableau 1** :

**Tableau 1** : Les principaux constituants et source végétales connues pour être productrices de propolis

Source végétale	Les principaux constituants	provenance	références
<i>Populus nigra</i> (Salicacées)	Flavonoïdes acides phénoliques et leurs esters	Europe, régions non tropicales d'Asie, Amérique du Nord et Australie continentale	(Ristivojević et al., 2015 ; Al-Ani et al., 2018)
<i>Betula verrucosa</i> ,	flavones et flavonols	Russie	(Miguel & Antunes, 2011 ; Martinotti & Ranzato, 2015)
<i>Cupressus</i>	diterpènes	Grèce, Sicile, Malte, Chypre,	(Popova et al., 2010 ;

<i>sempervirens</i> , <i>Cupressacées</i> . Cupressaceae		Croatie et Algérie	<b>Popova et al., 2011)</b>
<i>Azadirachta indica</i> , Meliaceae, <i>Acacia</i> spp. (Probablement <i>A. nilotica</i> , Fabaceae et <i>Mangifera indica</i> , Anacardiaceae)	Flavanones C5-prényl	Jordanie	<b>(Popova et al., 2013)</b>
<i>Clusia</i> spp., (Clusiaceae)	benzophénones	Cuba et Venezuela	<b>(Cuesta-Rubio et al., 2002)</b>
<i>Macaranga tanarius</i> , (Euphorbiaceae)	Flavanones de C-géranyle	Îles océaniques (Tai-wan, Okinawa et Indonésie)	<b>(Trusheva et al., 2011; Kumazawa et al., 2014).</b>
<i>Macaranga tanarius</i> , (Euphorbiaceae)	phénylpropanoïdes prénylés	les vallées (Cochabamba, Chuquisaca et Tarija)	<b>(Nina et al., 2016)</b>
<i>-Baccharis dracunculifolia</i> , (Asteraceae)	-phénylpropanoïdes prénylés, acides caféoylquiniques et diterpènes -isoflavones	Sud-est du Brésil (Propolis verte)	<b>(Salatino et al., 2005 ; Fernandes-Silva et al., 2013 ; Righi et al.,2013)</b>
<i>-Dalbergiae castaphyllum</i> , (Fabaceae)		Nord-est du Brésil (Propolis rouge)	<b>(Righi et al., 2011 ;Rufatto et al., 2017)</b>
<i>Clusia</i> spp., (Clusiaceae)	benzophénones prénylées	Propolis noir (Amazone)	<b>(de Castro Ishida et al., 2011)</b>

## I-7- La propolis Algérienne :

### I-7-1-Travaux antérieurs sur la propolis Algérienne :

**Velikova et al (2000)** ont étudié deux échantillons différents récoltés de M'sila. Cette étude a permis de comparer la composition chimique de ces propolis. Les résultats obtenus ont prouvé que le climat, et la flore ont une influence directe sur la qualité de la propolis. Les deux échantillons étudiés ont montré des quantités considérables en terpènes. Ils contiennent principalement l'acide hydroxyditerpénique.

**Lahouel et al (2010)** ont étudié l'extrait éthanolique d'une propolis provenant de Kaous (Jijel). Les analyses chromatographiques réalisées par la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur Ultraviolet (HPLC-UV) des différentes fractions phénoliques indiquent la présence de 3 classes de polyphénols: les flavonoïdes, les chalcones et les dihydrochalcone ainsi que les acides phénoliques. Les principaux flavonoïdes détectés dans la propolis étudiée sont la pinostrobine chalcone, la pinocembrine, la tectochrysin, la chrysin et la naringinine.

**Segueni et al (2011)** ont identifié pour la première fois trois flavonoïdes dans la propolis algérienne : la pectolinarigénine, la pilosine et la ladanéine. **Boutabet et al (2011)** ont analysé la propolis de Kaous (Jijel) en utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse avec détection par barrette de diodes (RP-HPLC-DAD) pour identifier les composés phénoliques. Les composés identifiés sont : la pinostrobine chalcone, la galangine, la naringinine, la tectochrysin, la méthoxychrysin et une coumarine.

**Piccinelli et al (2013)** ont analysé 14 échantillons de propolis Algérienne récoltées des régions du nord Algérien par Chromatographie Liquide Haute Performance avec détection par barrette de photodiodes (HPLC-PDA), l'interprétation des résultats a permis de classer les échantillons en deux catégories. Un type riche en composés phénoliques, et le deuxième type contenant principalement des diterpènes.

Deux échantillons de propolis des régions d'Akbou et d'Ibouhatmen ont été étudiés et ont permis l'identification de 8 flavonoïdes, 3 dérivées d'acide caféique (3-méthyl-3-butényl (E)-caféate, 2-méthyl-2-butényl (E)-caféate, phénéthyl (E)-caféate) et 9 di terpène. Cette étude a montré que la richesse de la propolis dépend de la diversité florale du site où elle a été prélevée.

**Segueni et al (2017)** ont déterminé la composition phénolique de 2 échantillons de propolis provenant de 2 régions différentes d'Algérie (Beni Belaid et El-malha) par chromatographie liquide ultra-rapide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UFLC-MS/MS). Les

principaux composés phénoliques identifiés sont la rutine, les acides chlorogénique, férulique, caféique et gallique.

**Rebiai et al (2017)** ont analysé six échantillons de propolis qui proviennent de plusieurs régions d'Algérie: Jijel, Tizi Ouzou, Boumerdès, Tlemcen, Khenchela et El Oued en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) pour déterminer les acides gras. Plus de 34 composés appartenant à divers groupes d'acides gras ont été identifiés : tels que les acides gras saturés; les acides gras mono insaturés; les acides gras polyinsaturés, les oméga-3 et les oméga-6. Les composés les plus abondants dans les extraits d'hexane sont les acides gras polyinsaturés, les acides gras monoinsaturés et les oméga-6, respectivement.

**El-Khamsa Soltani et al (2020)** ont étudié cinq échantillons de propolis dont quatre de la région de Sétif (Babor, Setif; Ain-Abbassa et El-Hamma) et une de Tizi-Ouzou en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Un total de 102 composés ont été déterminés tels que les acides aromatiques (acide benzoïque, acide cinnamique et ses esters, acide férulique et acide phloroglucinique), les hydrocarbures linéaires et leurs acides (acide 2-propénoïque, acide pentanoïque, acide palmitique, acide succinique et acide 2,3,4-trihydroxybutyrique), terpènes (caryophyllène et germacrène A) et alcaloïdes (phénéthylamine, thébaïne, papavérine, 1,2,3,4-tétrahydro et (+) – salsolidine. En plus de ces composés, il existe des sucres et leurs acides, des alcools et d'autres composés.

**Bouaroura et al (2021)** ont étudié l'extrait acétate d'éthyle de propolis récoltée de la wilaya de constantine. L'étude a permis l'isolement de huit composés : la tectochrysin, la dihydrochrysin, la pinobanksin-3-acétate, la galangine, la chrysin, l'acide cupressique, le 3-méthyl-3-butényl (E) -Cafféate et le 2- méthyl-2-butényl (E) -Cafféate.

**Boulechfar et al (2022)** ont évalué l'effet antimicrobien (antibactérien et antifongique), antioxydant et inhibition de l'acétyl anticholinestérase et butyrylcholinestérase et alpha glucosidase de quatre propolis récoltées d'El Menia, Oum el Bouaghi, El Harrouch et Collo. L'ensemble des propolis sont plus actives sur les bactéries Gram positive. Elles ont aussi un effet intéressant sur *Candida albicans* ATCC 10231. Les extraits étudiés inhibent aussi alpha glucosidase et agit de manière sélective sur la butyrylcholinestérase.

Ces études ont montré que la composition chimique des échantillons, ressemble à celle des bourgeons de peupliers, qui se trouve dans la région d'Algérie.

### I-8-Propriétés pharmacologiques :

La propolis est l'un des produits naturels les plus utilisés par l'homme depuis longtemps surtout dans le domaine de la médecine traditionnelle.

Les activités extrêmement importantes rapportées sur la propolis sont :

#### I-8-1-Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la propolis est documentée contre différents micro-organismes : bactéries, virus, levures, parasites. Cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé (Ugur & Arslan, 2004).

La propolis et certaines de ses constituants possèdent des :

##### I-8-1-1-Activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne de la propolis est la plus largement étudiée. Cette activité a été démontrée sur les bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> (de type anaérobie et aérobie). Parmi les bactéries inhibées, on retrouve : *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus pneumoniae* (Nascimento et al., 2012), *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus spp* (Agbor et al., 2020) et pour les bactéries Gram positive, et *Porphyromonas gingivalis* (Santos, et al 2002), *Helicobacter pylori* (Banskota et al., 2001, Kim et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Nascimento et al., 2012), *Escherichia coli* (Darwish et al., 2010), *salmonella* (Uzel et al., 2005), *Klebsiella pneumoniae* (Drago et al., 2000) et *Protéus mirabilis* (Kim et al., 2011) pour les Gram négative.

Les travaux réalisés par Segueni et al., 2014 sur l'activité antibactérienne de la propolis algérienne ont montré une activité importante sur *Staphylococcus aureus* et les streptocoques  $\beta$  hémolytique et une faible activité sur *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumonie* et les streptocoques  $\alpha$  et non hémolytiques.

##### I-8-1-2-Activité antifongique :

La propolis a prouvé une activité antifongique très importante contre les germes appartenant au genre *Candida* et contre les levures. Freires et al., 2016 ont montré une activité antifongique contre *Candida spp* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*).

La propolis possède aussi une action contre *Trichophyton*, *Microsporium canis* et *Cryptococcus* (Donadieu, 2008 ; Gharbi, 2011), et contre les champignons de type

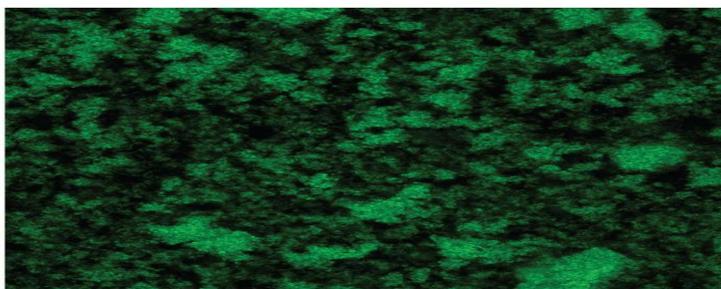
Aspergillus (Ota, et al 2001), Mycosporum ainsi que contre les levures (Dalben-Dota et al., 2010).

Une autre étude in vitro a montré un effet coopératif de la propolis pour lutter contre une souche mycosique (*Paracoccidioides brasiliensis*) d'Amérique du sud en stimulant l'activité fongicide des macrophages (Murad et al., 2002).

Les principaux composés antifongiques identifiés dans la propolis sont la pinocembrine, les triterpènes et les caffeates (Bankova, 2000 ; Bankova et al., 2000).

### I-8-1-3-Activité antibiofilm :

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de microorganismes dans lesquels les cellules sont collées à une surface et enrobées d'une matrice polymérique (figure 6) (plaque dentaire, flore intestinale...etc) (Costerton et al., 1999, Hall-Stoodley et al., 2004) (Figure 6, Figure 7). Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation) (Tremblay et al., 2014). Ils se forment généralement dans le milieu aqueux. Différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (Characklis, 1990).



**Figure 6:** Biofilm produit par une souche de *Staphylococcus epidermidis* dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de FilmTracer™ FM® 1-43 [6].



**Figure 7** : la plaque dentaire (biofilm dentaire) [7].

De nombreux travaux ont indiqué que l'extrait de propolis réduit la formation de biofilm. Les travaux en rapport avec la propolis récoltée en Turquie ont montré un effet positif contre trois différentes bactéries : *Staphylococcus aureus* (souches sensibles à la méthicilline (MSSA M10, MSSA M18 et MSSA M20) (**Doganli, 2016<sup>a</sup>**), *L. monocytogenes* et *E. faecalis* (**Doğanli et al., 2016<sup>b</sup>**). Dans une autre étude **Fernández-Calderón et al., 2021** ont testé l'activité anti-biofilm de l'extrait éthanolique de propolis d'Espagne contre *Candida glabrata*. L'extrait de propolis hongroise a montré une diminution de biofilm contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) (**Bouchelaghem et al., 2022**).

Plusieurs études rapportent aussi un effet contre quelques streptocoques qui provoquent des maladies dentaires : *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (**Kouidhi et al., 2010 k ;Yuan et al., 2022**), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Tannerella forsythia* ATCC 43037 et *Treponema denticola* ATCC 35405 (**Stähli et al., 2021**). De plus, les extraits de propolis sont aussi efficaces contre trois espèces de *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum* et *F. subglutinans*) qui provoquent l'onychomycose (**Galletti et al., 2017**).

#### **I-8 -2-Activité anticancéreuse :**

La propolis à un effet cytotoxique qui permet d'inhiber les cellules cancéreuses. Des recherches ont montré que la propolis et ses composés en particulier l'ester phénéthylrique d'acide caféique (CAPE) et la Chryisine sont des inhibiteurs des cellules tumorales (**Sawicka et al., 2012 ; Chan et al., 2013**). En plus de ces deux composés, on retrouve aussi la galangine qui semble inhiber la lignée cellulaire du cancer gastrique SNU-484 (**Banskota et al., 2002**). Par contre, la pinocembrine est active contre la lignée cellulaire d'adénocarcinome humain HCT 116 (**Kumar et al., 2007**). Les essais (*in vitro*) réalisés sur l'effet anti tumoral des extraits éthanolique et acétate d'éthyle de la propolis marocaine indiquent un effet cytotoxique

sur trois lignées cellulaires de mammifères : carcinome rénal de hamster (BSR), carcinome du larynx humain (Hep-2) et mastocytome murin (P815) (**Mouse et al., 2012**).

Plusieurs études relativement récentes réalisées sur la propolis algérienne ont montré une activité antiproliférative très intéressante de l'extrait éthanolique contre la lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549). De plus, la propolis étudiée pouvait bloquer l'adhésion des cellules par le fibrinogène (**Brihoum et al., 2018**). Dans une autre étude, **Rouibah et al., 2021** ont testé l'efficacité de l'extrait éthanolique contre les cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231), et les cellules de carcinome hépatocellulaire humain HepG2 (**Boulechfar et al., 2022**).

### **I-8 -3-Activité anti oxydante :**

L'activité antioxydante de la propolis est certainement l'activité la plus largement étudiée. Cette activité est attribuée aux flavonoïdes et aux divers composés phénoliques. Les composés phénoliques responsables de cette activité sont ; les dérivés de l'acide cinnamique, l'ester phénéthylique d'acide caféique et l'artepilline C, en plus de certains diterpénoïdes (**Banskota et al., 2001**) et le caféate de benzyle (**Yamauchi et al., 1992**).

L'étude de l'activité antioxydante de la propolis polonaise indique que les extraits sont riches en composés phénoliques et sont très efficaces comme agents antioxydants (**Woźniak et al., 2019**).

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'activité antioxydante de la propolis algérienne. Un total de 14 échantillons de propolis collectées du nord algérien ont été analysés. Les résultats obtenus ont permis de classer la propolis étudiée en deux groupes. Un premier groupe riche en composés phénolique (PAP) présentant des concentrations d'inhibition ( $IC_{50}$ ) qui varient entre 32.3 et 82.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  et un second groupe contenant principalement des diterpènes (DAP) présentant une faible activité antioxydante avec des valeurs d' $IC_{50}$  qui varient entre 208.3 et 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Cette différence est due aux compositions chimiques de la propolis. La diminution de l'activité décelée dans le deuxième groupe est en corrélation avec leur faible teneur en composés phénoliques. (**Piccinelli et al., 2013**).

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour évaluer in vitro l'activité antioxydante de la propolis Algérienne par piégeage de différents radicaux tels que : les radicaux libres DPPH (2,2 diphényl-1-picryl-hydrazyl), le blanchiment du B-carotène (**Kumazawa et al., 2004**), ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique) (**Segueni et al., 2017**), les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (**Laskar et al., 2010**), les ions de cuivre (CUPRAC), les peroxydes  $ROO\cdot$  par les

méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Silva et al., 2011) et les essais de décoloration des radicaux cationiques 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Ahn et al., 2007)

La propolis est aussi une substance aux propriétés : Anti-inflammatoire (Xool-Tamayo et al., 2020), Anti-leishmaniale (AL-Roubaey, 2018), Anti-ulcérante (De Barros et al., 2007), immunomodulatrice et antiparasitaire (Syamsudin et al., 2008) et antiparasitaire (Gressler et al., 2012).

### **I-9-Conservation :**

La propolis se conserve facilement, de préférence à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur dans un récipient bien fermé. La conservation de longue durée dans ces conditions ne diminue pas sa teneur en composants chimiques, ni ses activités biologiques.

### **I-10-Toxicité**

La propolis est un produit non toxique. La concentration sans danger pour l'homme est d'environ 1,4 mg/kg par jour ou 70 mg/jour (Wang et al., 2019). Il peut exister cependant des cas d'allergies de contact (dermatose, eczéma) avec un allergène bien identifié : le 3,3-diméthylallyl caffeate (Gardana et al., 2011).

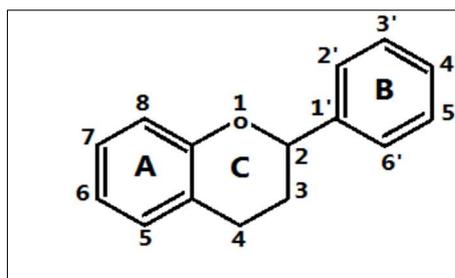
### **I-11-Composés chimique isolés de la propolis**

D'après l'étude bibliographique que nous avons menée, les travaux phytochimiques effectués sur la propolis ont permis essentiellement l'isolement et l'identification de nombreux composés. Ces composés sont principalement des flavonoïdes, des terpenoïdes et des acides phénoliques et leurs esters.

#### **I-11-1-Flavonoïdes :**

Les flavonoïdes (mot grec « *flavus* », jaune) sont des métabolites secondaires végétaux appartenant à la famille des polyphénols. Ils ont été découverts en 1936 par Albert Szent-Györgyi. Ces composés sont responsables de la couleur variée des fleurs, des fruits et des graines.

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent quinze atomes de carbones, formant une structure C6-C3-C6 généralement constitué de deux cycles aromatiques A et B reliés par un noyau hétérocyclique pyranne C (**Figure 8**).

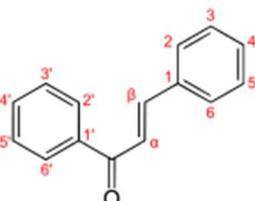


**Figure 8 :** Squelette de base des flavonoïdes.

La plupart des flavonoïdes sont présent dans la nature sous forme libre (aglycones) ou associée à un sucre (glycosides). Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon la variation du degré d'oxydation de la chaîne carbonée, (le nombre, la position et la nature des substituant (hydroxyles, méthoxyle, malonyle et la glycosyle) sur les deux cycles aromatiques (A et B) et le noyau pyranique central C). Parmi lesquels se trouvent: les flavonols, les flavones, les flavanones, les isoflavones, les chalcones et les anthocyanes, qui sont représentées dans **le tableau 2**.

**Tableau 2.** Différentes classes de flavonoïdes

Structure	Exemple	substitutions					
		5	6	7	3'	4'	5'
<p>FLAVONOL</p>	Kaempférol Quercétine Myricétine	OH	H	OH	H	OH	H
<p>FLAVONE</p>	Apigénine Chrysin Lutéoline	OH	H	OH	H	OH	H
<p>FLAVANONE (DIHYDROFLAVONE)</p>	Hespéridine Naringénine	OH	H	OH	OH	OMe	H
		OH	H	OH	H	OH	H

 <p>FLAVANONOL (DIHYDROFLAVONOL)</p>	<p>Taxifoline Aromadédrine</p>	<p>OH H OH H OH OH OH H OH H OH H</p>
<p>ISOFLAVONE</p>	<p>Daidézéine Génistéine</p>	<p>OH H OH OH OH H OH H OH OH OH OH</p>
 <p>CHALCONE</p>	<p>Phloretine Buteine</p>	
<p>AURONE</p>	<p>Sulphuretine Hispidol, Maritimetine</p>	
<p>ANTHOCYANIDIN</p>	<p>Delphinidine Cyanidine</p>	<p>OH H OH OH OH OH OH H OH OH OH H</p>

Les flavonoïdes sont des produits largement rencontrés dans divers organes des végétaux: les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs. Certaines classes de flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. On trouvera par exemple les anthocyanes et les flavonols localisés (très répandus) dans les fruits et les légumes. Les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs et sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Medic et al., 2003).

Les flavonoïdes identifiés dans la propolis sont représentés dans le **tableau 3**.

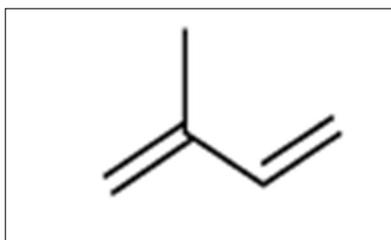
**Tableau 3 : Les flavonoïdes identifiés dans la propolis:**

Flavonoïde identifiés	Origine	Références
<p><b>Flavonols :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kaempferol</li> <li>- Galangine</li> <li>-Quercétine</li> <li>-2'-(8"-hydroxy-3",8"-diméthyl-oct-2"-enyl)-quercétine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Algérie</li> <li>-Egypte</li> <li>-Brésil</li> <li>-Île des Salomon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Piccinelli et al., 2013</li> <li>-Fadaly et al., 2001</li> <li>- Dausch et al., 2008</li> <li>-Inui et al., 2012</li> </ul>
<p><b>Flavones</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pectolarigénine</li> <li>-Pilosine</li> <li>-Ladanéine</li> <li>-Apigénine</li> <li>-Lutéoline</li> <li>-Chrysin</li> <li>- acacétine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Algérie</li> <li>- Turquie</li> <li>- Chine</li> <li>-Yémen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Segueni et al., 2011</li> <li>- Doganli, 2016</li> <li>- Usia et al., 2002</li> <li>- Fadaly et al., 2001</li> </ul>
<p><b>Flavanones</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pinocembrine</li> <li>- Pinobanksin</li> <li>- Liquiritigénine</li> <li>-5, 7,3',4'-tétrahydroxy-6-C-géranylflavanone</li> <li>-5, 7,3',4'-tétrahydroxy-2'-C-géranylflavanone</li> <li>-(2R, 3R)-6[1-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl) prop-2en-1-yl] pinobanksine</li> <li>-5,7-dihydroxy-6-méthoxy-2,3-dihydroflavonol-3-acétate</li> <li>-5-Méthoxy-3-hydroxyflavanone</li> <li>-Hespéritine-5,7-diméthyléther</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Yémen</li> <li>- Egypte</li> <li>-Brésil</li> <li>-Japon</li> <li>-Mexique</li> <li>-Australie</li> <li>- Portugal</li> <li>-Portugal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fadaly et al., 2001</li> <li>- Sun et al., 2018</li> <li>- Dausch et al., 2008</li> <li>-Kumazawa et al., 2004</li> <li>-Li et al., 2011</li> <li>-Tran et al., 2012</li> <li>-Falcão et al., 2010</li> <li>-Falcão et al., 2010</li> </ul>

<b>Flavanol</b> -Catechin	- Algérie	-Chaa et al., 2019
<b>Isoflavanes</b> - Isosativan - Medicarpin -7,4'-Dihydroxy-2'-méthoxyisoflavone -Néovestitol	-Brésil -Brésil -Cuba -Cuba	- Trusheva et al., 2006 - Trusheva et al., 2006 - Piccinelli et al., 2005 -Campo Fernandez et al., 2008
<b>Isoflavones</b> - Formononétine -Odoratin -7,3'-dihydroxy-6,5'- méthoxyisoflavonoïde -7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavonoïde -5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavonoïde	-Brésil -Népal  -Cuba	- Dausch et al., 2008 -Shrestha et al., 2007  -Piccinelli et al., 2005
<b>Chalcones</b> -2',4',6'-trihydroxy chalcone  -2', 6'-dihydroxy-4',4'-diméthoxydihydrochalcone -2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone -2', 6'-dihydroxy-4' méthoxydihydrochalcone -2',6',4'-trihydroxy-4'-méthoxydihydrochalcone -2',4',6'-trihydroxy-4-méthoxydihydrochalcone	- Iran   - Canada	-Afrouzan et al., 2018   -Christov et al., 2006

### I -11-2- Terpénoides:

Les terpènes sont une classe de produits naturels largement représenté (Christianson, 2017). Ils sont formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)<sub>n</sub> (Huang et al., 2019).



**Figure 9:** Isoprène

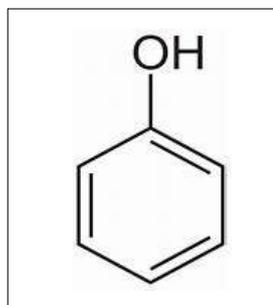
Ils sont classés en monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20)...etc.

Parmi ceux-ci, on rencontre principalement dans la propolis les monoterpènes acycliques, monocycliques, dicycliques et leurs dérivés. Les monoterpènes acycliques et monocycliques sont des myrcènes, des *p*-menthanes et des cinéoles, respectivement, les monoterpènes dicycliques sont classés en cinq groupes: thujanes, caranes, pinanes, fenchannes et camphènes. Les Sesquiterpènes sont les composants chimiques les plus abondants dans la propolis et se répartissent en quatre catégories : acyclique (les dérivés de farnesane), monocycliques (quatre types), dicycliques (cinq types) et tricycliques (dix types) (**Tableau 4**). Les cembrane, labdane, abiétane, pimarane et totarane sont signalés comme étant les principaux diterpènes de la propolis (**Huang et al., 2014**).

**Tableau 4 : Les terpènes identifiés dans la propolis**

<b>Terpène identifiés</b>	<b>Origine</b>	<b>Références</b>
<b>Monoterpènes :</b> - <i>trans</i> - $\beta$ -terpinéol - Linalol - Camphre	-Grèce -Brésil - Iran	- <b>Melliou et al., 2007</b> - <b>Oliveira et al., 2010</b> - <b>Trusheva et al., 2010</b>
<b>Sesquiterpènes :</b> - Valencéne - $\gamma$ -elemene - $\alpha$ -cadinol - 4- $\beta$ H,5 $\alpha$ -Eremophil-1(10)-ène -Patchoulene	-Brésil -Brésil -Turquie -Turquie -Indonesia	- <b>Oliveira et al., 2010</b> - <b>Silici et al., 2005</b> - <b>Kartal et al., 2002</b> - <b>Wiryo widagdo et al., 2009</b>





**Figure 10** : squelette de base des polyphénols.

La propolis verte du Brésil est riche en phénylpropanoïdes dont l'acide cinnamique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et leurs dérivés. Certains dérivés de l'acide caféique et le dérivé de l'acide isoférulique ont également été identifiés dans la propolis de peuplier par GC-MS (Huang et al., 2014).

Les principaux acides phénoliques identifiés dans la propolis sont représentés dans le **tableau 5**

**Tableau 5: Les acides phénoliques identifiés dans la propolis**

Acide phénolique identifiés	Origine	Références
- 3-méthyl-3-butényl (E)- caféate	-Algérie	- Piccinelli et al., 2013
- 2-méthyl-2-butényl (E)-caféate		
- Phénéthyle (E)-caféate		
-Acide Galique	-Brésil	- Salatino et al., 2005
-Acide Isochlorogénique	-Brésil	- Sun et al., 2019
-Hexadécyle cafféate	-Brésil	- Salatino et al., 2005
-3-méthyl-2-butényl isoféruleate		
-Acide <i>p</i> -méthoxycinnamique		
-Acide 3-prényl-4-hydroxycinnamique	- Brésil	- Marcucci et al., 2001
- <i>p</i> -hydroxybenzoate de ferutinol	- Iran	- Trusheva et al., 2010
-Tétradécényl cafféate (isomer)	-Australie	-Hegazi et al., 2002
-(+)-Pinoresinol	- Brésil	- Li et al., 2008
-(+)-Syringaresinol		
-2-Methyl-2-butenyl ferulate	-Uruguay	- Kumazawa et al., 2002
-Tetradecenyl caffeate	-Égypte	- Hegazi et al., 2002

**Références:**

- Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S., & Es-haghi, A. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iranian Biomedical Journal*, 22(1), 50-65.
- Agbor, A. M., Tsague, R., Kaptue, B., Naidoo, S., Tembe-Fokunang, E., Fokunang, C. N., & Pilipili, C. (2020). Phytochemical characterisation and antibacterial activity of propolis on cariogenic microorganisms. *European Journal of Medicinal Plants*, 31, 56-66.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383-1392.
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.
- Al-Roubaey, Dina A. A. (2018). *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of propolis extract. *Biochemical and Cellular Archives*, pp, 1893-1908.
- Andrzej, K. (2013). The Role of Medialabs in Regional Cultural and Innovative Policy.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Ishii, E., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2001). Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, 8(1), 16-23.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., ... & Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*, 80(1), 67-73.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15(7), 561-571.
- Bankova, V. (2000). Determining quality in propolis samples. *J Am Apither Soc*, 7(2), 50-55.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 734-743.
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(1), 29-32.
- Bankova, V., & Evid, J. (2005). Based Complement. *Alternative Medicine*, 2, 29.

- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Bankova, V. S., Christov, R., & Tejera, A. D. (1998). Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry*, 49(5), 1411-1415.
- Biscaia, D., & Ferreira, S. R. (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(1), 17-23.
- Bouaroura, A., Segueni, N., Diaz, J. G., Bensouici, C., Akkal, S., & Rhouati, S. (2020). Preliminary analysis of the chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian propolis. *Natural product research*, 34(22), 3257-3261.
- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi journal of biological sciences*, 29(4), 1936-1946.
- Bouchelaghem, S., Das, S., Naorem, R. S., Czuni, L., Papp, G., & Kocsis, M. (2022). Evaluation of total phenolic and flavonoid contents, antibacterial and antibiofilm activities of Hungarian Propolis ethanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 27(2), 574.
- Boulechar, S., Akbulut, Z., Tepe, H. D., Zellagui, A., Aktas, R. G., Bensouici, C., ... & Lahouel, M. (2022). LC-MS/MS analysis, antioxidant and anticancer effects of phenolic-rich extracts from Algerian propolis: a comparative study. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-12.
- Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., & Lahouel, M. (2011). Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*, 21(2), 101.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boumeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1), e17396-e17396.
- Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., Montes De Oca Porto, R., Márquez Hernández, I., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2008). GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9927-9932.
- Cao, Y. H., Wang, Y., & Yuan, Q. (2004). Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 59(1-2), 135-140.

- Chaa, S., Boufadi, M. Y., Keddari, S., Benchaib, A. H., Soubhye, J., Van Antwerpen, P., & Riazi, A. (2019). Chemical composition of propolis extract and its effects on epirubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 294-300.
- Chan, G. C. F., Cheung, K. W., & Sze, D. M. Y. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 44, 262-273.
- Characklis, W. G. (1990). Energetics and stoichiometry. *Biofilms*, 161-192.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., & Lin, J. K. (2003). Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*, 66(4), 503-506.
- Christianson, D. W. (2017). Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Natural product research*, 20(06), 531-536.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Urbe, B. A., Ramírez-Apan, T., & Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of Nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 372-378.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Darwish, R. M., Ra'ed, J., Zarga, M. H. A., & Nazer, I. K. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(36), 5966-5974.
- Daugusch, A., Moraes, C. S., Fort, P., & Park, Y. K. (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 5(4), 435-441.
- Dalben-Dota, K. F., Faria, M. G., Bruschi, M. L., Pelloso, S. M., Lopes-Consolaro, M. E., & Svidzinski, T. I. (2010). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 16(3), 285-290.
- Debuyser, E. *La propolis. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante. Faculté de pharmacie.*
- de Mendonça, I. C. G., Porto, I. C. C. D. M., do Nascimento, T. G., de Souza, N. S., Oliveira, J. M. D. S., Arruda, R. E. D. S., ... & Barreto, F. S. (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-12.

- de Castro Ishida, V. F., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. (2011). A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125(3), 966-972.
- de Barros, M. P., Sousa, J. P. B., Bastos, J. K., & de Andrade, S. F. (2007). Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 567-571.
- Doganlı, G. A. (2016)<sup>a</sup>. Phenolic content and antibiofilm activity of propolis against clinical MSSA strains. *Records of Natural Products*, 10(5), 617-627.
- Doğanlı, G. A., Ülger, G., & Doğan, N. M. (2016)<sup>b</sup>. Antibiofilm activity and chemical contents of propolis samples from Manisa-Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44(4), 505-513.
- Donadieu, Y. (1981) les produit de la ruche 3<sup>ème</sup> Edition.
- Donadieu, Y. (2008) *La Propolis* Editions Dangles, Paris, 90p..
- Drago, L., Mombelli, B., Vecchi, E. D., Tocalli, M. F. L., & Gismondo, M. R. (2000). *In vitro* antimicrobial activity of propolis dry extract. *Journal of chemotherapy*, 12(5), 390-395.
- Evangelist-Rodrigues, A., Carneiro of Cunha. M. (2001). Analise comparativa da qualidade da propolis colectado atraves de calços de madeira etela plastica na regiaô do byo paraeibano. *Mensagem Doce* 63 (bis).
- Fadaly, H. E. I., & Eey, E. (2001). Badrawy, "Flavonoids of propolis and their antibacterial activities,". *Pakistan Journal Biological Science*, 21, 204-207.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, 887-897.
- Fernández-Calderón, M. C., Hernández-González, L., Gómez-Navia, C., Blanco-Blanco, M. T., Sánchez-Silos, R., Lucio, L., & Pérez-Giraldo, C. (2021). Antifungal and anti-biofilm activity of a new Spanish extract of propolis against *Candida glabrata*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1-10.
- Fernandes-Silva, C. C., Salatino, A., Salatino, M. L. F., Breyer, E. D., & Negri, G. (2013). Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova*, 36, 237-240.
- Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. (2016). Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida spp.* *Journal de mycologie medicale*, 26(2), 122-132.

- Galletti, J., Tobaldini-Valerio, F. K., Silva, S., Kioshima, É. S., Trierveiler-Pereira, L., Bruschi, M., ... & Estivalet Svidzinski, T. I. (2017). Antibiofilm activity of propolis extract on *Fusarium* species from onychomycosis. *Future microbiology*, 12(14), 1311-1321.
- Gardana, C., & Simonetti, P. (2011). Evaluation of allergens in propolis by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 25(11), 1675-1682.
- Gharbi, M. (2011). *Les produits de la ruche: origines-fonctions naturelles-composition-propriétés thérapeutiques: apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire* (Doctoral dissertation).
- Ghisalberti, EL. (1979). Propolis: A review.
- Gressler, L. T., Da Silva, A. S., Machado, G., Dalla Rosa, L., Dorneles, F., Gressler, L. T., ... & Monteiro, S. G. (2012). Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1314-1317.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., & Whatley, F. R. (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee world*, 71(3), 107-118.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
- Harnaj, V. (1978). A remarkable hive product: propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics.
- Harborne, J.B. (1980). Secondary plant products. In: Encyclopedia of Plant Physiology. *Phytochemistry*, 19(12), 2803-2804.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E., Senff, H., & Post, B. (1987). Propolis allergy.(II). The sensitizing properties of 1, 1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*, 17(3), 171-177.
- Hegazi, A. G., & El Hady, F. K. A. (2002). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(3-4), 395-402.
- Hegazi, A. G. (1998). Propolis an overview. *J. Bee Informed*, 5(5), 22-23.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.

- Huang, A. C., & Osbourn, A. (2019). Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. *Pest management science*, 75(9), 2368-2377.
- Inui, S., Shimamura, Y., Masuda, S., Shirafuji, K., Moli, R. T., & Kumazawa, S. (2012). A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(5), 1038-1040.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Mourtzinou, I., Troullidou, E., Chiou, A., & Karathanos, V. T. (2009). Encapsulation of complex extracts in  $\beta$ -cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. *Journal of microencapsulation*, 26(7), 603-613.
- Kartal, M., Kaya, S., & Kurucu, S. (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 905-909.
- Kasote, D., Suleman, T., Chen, W., Sandasi, M., Viljoen, A., & Van vuuren, S. (2014). Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 156-163.
- Koç, A. N., Silici, S., Kasap, F., Hörmet-Öz, H. T., Mavus-Buldu, H., & Ercal, B. D. (2011). Antifungal activity of the honeybee products against *Candida spp* and *Trichosporon spp*. *Journal of medicinal food*, 14(1-2), 128-134.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe*, 16(6), 566-571.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org..
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(6), 740-742.
- Kumazawa, S., Murase, M., Momose, N., & Fukumoto, S. (2014). Analysis of antioxidant prenylflavonoids in different parts of *Macaranga tanarius*, the plant origin of Okinawan propolis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 16-20.
- Kumazawa, S., Nakamura, J., Murase, M., Miyagawa, M., Ahn, M. R., & Fukumoto, S. (2008). Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, 95, 781-786.
- Kumazawa, S., Hayashi, K., Kajiya, K., Ishii, T., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2002). Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4777-4782.

- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. (2004). A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68(1), 260-262.
- Kumar, M. S., Nair, M., Hema, P. S., Mohan, J., & Santhoshkumar, T. R. (2007). Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 46(3), 231-241.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kessa, W., & Alyane, M. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *Afr J Pharm Pharmacol*, 4(10), 712-720.
- Laskar, R. A., Sk, I., Roy, N., & Begum, N. A. (2010). Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233-237.
- Lavie, P. (1975). La propolis. Edition : Apimondia. *Bucharest*, 65,63-71.
- Li, F., He, Y. M., Awale, S., Kadota, S., & Tezuka, Y. (2011). Two new cytotoxic phenylallylflavanones from Mexican propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(9), 1194-1196.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., & Kadota, S. (2010). Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of natural products*, 73(4), 623-627..
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2008). Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(10), 5434-5440.
- Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A. L., Cuesta-Rubio, O., Marquez Hernandez, I., & Rastrelli, L. (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2209-2213.
- Maciejewicz, W. (2001). Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 24(8), 1171-1179.
- Makashvili, Z. A. (1978). From the history of propolis. *Remarkable hive product: Propolis. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in*

*therapeutics. APIMONDIA standing Commission on Beekeeping technology and Equipment, Bucharest.*

- Mamillapalli, V., Tiyyagura, V. M., Katamneni, M., & Khantamneni, P. L. (2018). Bee Propolis-A Novel Perspective. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 5(12), 167-171.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., ... & Paulino, N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 74(2), 105-112
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing?. *Burns & trauma*, 3(1), 1-7.
- Medić-Šarić, M., Jasprica, I., Smolčić-Bubalo, A., & Mornar, A. (2004). Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemica acta*, 77(1-2), 361-366.
- Melliou, E., Stratis, E., & Chinou, I. (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece—Antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 103(2), 375-380.
- Miguel, M. G., & Antunes, M. D. (2011). Is propolis safe as an alternative medicine?. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 3(4), 479.
- Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, A. M. V. C., Bankova, V., & Sforcin, J. M. (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 331-334.
- Mouse, H. A., Tilaoui, M., Jaafari, A., M'barek, L. A., Aboufatima, R., Chait, A., & Ziad, A. (2012). Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of Moroccan propolis extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 558-567.
- Molan, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee world*, 73(1), 5-28.
- Nascimento, A., Ferreira, N., Barizon, E., Rocha, B., Leite Vaz, M. M., Marquiafavel, F., & Berretta, A. (2012). Methodologies for the evaluation of the antibacterial activity of propolis. *International Journal of Sciences*, 1(10), 38-41.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 30.
- Nicolas, A. (1947). Cire d'abeilles et propolis. *Nancy, France: Thomas*, 141-142.
- Nicolas, A. (1947). Cire d'abeilles et propolis. *Nancy, France: Thomas*, 141-142.

- Nina, N., Quispe, C., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Giménez, A., & Schmeda-Hirschmann, G. (2016). Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2142-2153.
- Oliveira, A. P., França, H. S., Kuster, R. M., Teixeira, L. A., & Rocha, L. M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16, 121-130.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44(9-10), 375-378.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(9), 2502-2506
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., & Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1100-1103
- Patel, J.M. (2008). A review of potential health benefits of flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*, 3(2).
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., & Bankova, V. (2010). New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*, 81(6), 509-514.
- Philippe JM .le guide d'apiculteur.Paris :Episud. 1994.
- Piccinelli, A. L., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., De Simone, F., & Rastrelli, L. (2005). Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9010-9016.
- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P., & Rastrelli, L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(21), 5080-5088.
- Popova, M. P., Graikou, K., Chinou, I., & Bankova, V. S. (2010). GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(5), 3167-3176.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126(3), 1431-1435.

- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H. T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., & Bankova, V. (2013). Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-8.
- Popova, M. P., Chinou, I. B., Marekov, I. N., & Bankova, V. S. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(10), 1262-1271.
- Rahman, M. M., Richardson, A., & Sofian-Azirun, M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4(18), 1872-1878.
- Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. (2015). Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity. *Natural product communications*, 10(11).
- Rebiai, A., Belfar, M. L., Mesbahi, M. A., Nani, S., Tliba, A., Amara, D. G., & Chouikh, A. (2017). Fatty acid composition of Algerian propolis. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(3), 1656-1671.
- Righi, A. A., Negri, G., & Salatino, A. (2013). Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Righi, A. A., Alves, T. R., Negri, G., Marques, L. M., Breyer, H., & Salatino, A. (2011). Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(13), 2363-2370.
- Rouibah, H., Kebsa, W., Lahouel, M., Zihlif, M., Ahram, M., Aburmaileh, B., ... & Mustafa, E. (2021). Algerian propolis: Between protection of normal cells and potentialisation of the anticancer effects of doxorubicin against breast cancer cells via P-glycoprotein inhibition and cell cycle arrest in the S phase. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 72(1), 10-26402.
- Rufatto, L. C., dos Santos, D. A., Marinho, F., Henriques, J. A. P., Ely, M. R., & Moura, S. (2017). Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591-598.
- Safia, B., Amar, Z., Chawki, B., Meltem, A. O., Songul, T., & Djeghim, H. (2022). Anticholinesterase, anti- $\alpha$ -glucosidase, antioxidant and antimicrobial effects of four Algerian propolis. *Journal of Food Measurement & Characterization*, 16(1), 793-803.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports*, 28(5), 925-936.
- Salatino, A., Teixeira, É. W., & Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2(1), 33-38.

- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., & Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of ethnopharmacology*, 80(1), 1-7.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., & Nikliński, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 50(1), 25-37.
- Segueni, N., Benlabed, K., Hassane, B., Moussaoui, F., Zellagui, A., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2014). Antibacterial activity of two Algerian propolis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25, 106-110.
- Shrestha, S. P., Narukawa, Y., & Takeda, T. (2007). Chemical constituents of Nepalese propolis: isolation of new dalbergiones and related compounds. *Journal of Natural Medicines*, 61, 73-76.
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A., & Alencar, S. M. (2008). Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 5(3), 313-316.
- Silva, V., Genta, G., Möller, M. N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., ... & Denicola, A. (2011). Antioxidant activity of Uruguayan propolis. *In vitro* and cellular assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6430-6437.
- Soltani, E. K., Mokhnache, K., Mezaache-Aichour, S., Charef, N., De Haro, J. P., Zerroug, M. M., & Esteban, M. A. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of Algerian propolis against fish pathogenic bacteria. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10(2), 12-19.
- Syamsudin, A., Rita Marleta, D., & Kusmardi, K. (2008). Immunomodulatory and *in vivo* Antiplasmodial Activities of Propolis Extracts. *Global Journal of Pharmacology*, 2 (3), 37-40.
- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2016). Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S425-S428.
- Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2020). Advances in the propolis chemical composition between 2013 and 2018: A review. *Efood*, 1(1), 24-37.
- Stähli, A., Schröter, H., Bullitta, S., Serralutzu, F., Dore, A., Nietzsche, S., ... & Eick, S. (2021). *In vitro* activity of propolis on oral microorganisms and biofilms. *Antibiotics*, 10(9), 1045.

- Sun, L., Liao, L., & Wang, B. (2018). Potential Antinociceptive Effects of Chinese Propolis and Identification on Its Active Compounds. *Journal of immunology research*, 2018, 5429543.
- Sun, S., Liu, M., He, J., Li, K., Zhang, X., & Yin, G. (2019). Identification and determination of seven phenolic acids in Brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. *Molecules*, 24(9), 1791.
- Tran, V. H., Duke, R. K., Abu-Mellal, A., & Duke, C. C. (2012). Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa*. *Phytochemistry*, 81, 126-132.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Simova, S., Marcucci, M. C., Miorin, P. L., ... & Tsvetkova, I. (2006). Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 3(2), 249-254.
- Trusheva, B., Todorov, I., Ninova, M., Najdenski, H., Daneshmand, A., & Bankova, V. (2010). Antibacterial mono-and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 1-4.
- Toret, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.
- Tomás-Barberán, F. A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., & Tomás-Lorente, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 34(1), 191-196.
- Tosi, E. A., Ciappini, M. C., Cazzolli, A. F., & Tapiz, L. M. (2006). Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *Apiacta*, 41, 110-120.
- Trusheva, B., Todorov, I., Ninova, M., Najdenski, H., Daneshmand, A., & Bankova, V. (2010). Antibacterial mono-and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 1-4.
- Trusheva, B., Popova, M., Koendhori, E. B., Tsvetkova, I., Naydenski, C., & Bankova, V. (2011). Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. *Natural Product Research*, 25(6), 606-613.
- Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116

- Ugur, A., & Arslan, T. (2004). An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 7(1), 90-94.
- Usia, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2002). Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of natural products*, 65(5), 673-676.
- Uzel, A., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., & Gençay, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, 160(2), 189-195.
- Vani Mamillapalli., Vamsi Meghana Tiyyagura., Mounika Katamneni., & Padma Latha Khantamneni .(2018). Bee propolis-a novel perspective. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 5(12), 167-171.
- Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (2000). Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 790-793.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 49-59.
- Wang, J. W., Chen, S. S., Zhang, Y. M., Guan, J., Su, G. Y., Ding, M., ... & Zhao, Y. Q. (2019). Anti-inflammatory and analgesic activity based on polymorphism of cedrol in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68, 13-18.
- Wiryowidagdo, S., Simanjuntak, P., & Heffen, W. L. (2009). Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 180-183
- Woźniak, M., Mrówczyńska, L., Waśkiewicz, A., Rogoziński, T., & Ratajczak, I. (2019). Phenolic profile and antioxidant activity of propolis extracts from Poland. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X19849777.
- Xool-Tamayo, J., Chan-Zapata, I., Arana-Argaez, V. E., Villa-de la Torre, F., Torres-Romero, J. C., Araujo-Leon, J. A., ... & Cauich-Rodríguez, J. V. (2020). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties of Mayan propolis. *European Journal of Inflammation*, 18.
- Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kanaeda, J., & Ueno, Y. (1992). Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(8), 1321-1322.
- Yuan, J., Yuan, W., Guo, Y., Wu, Q., Wang, F., & Xuan, H. (2022). Anti-Biofilm Activities of Chinese Poplar Propolis Essential Oil against *Streptococcus mutans*. *Nutrients*, 14(16), 3290.

-Zin, N. B. M., Azemin, A., Rodi, M. M. M., & Mohd, K. S. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of stingless bee propolis from different extraction methods. *International Journal of Engineering & Technology*, 7, 90-95.

[1] : La propolis brute [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de : <https://magazine.laruchequiditoui.fr/la-propolis-antibiotique-meconnu/>

[2] : Récolte de la propolis par l'abeille [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de : <https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRm1YyGglX9XcZUGYliLCPDqzgr8lGeV-mW-hKm7VPnSUXX2tRgjuSvxdSIFkd-0nUMkLQ&usqp=CAU>

[3] : grille de propolis au niveau de la ruche [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de : [https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT15E1A\\_X0EbXH1jWErrV4g4ahhuU5VxPSDY9GPJvGcuJk6TLEwH4VdP\\_bUJg08BsI-Z5k&usqp=CAU](https://encryptedtbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcT15E1A_X0EbXH1jWErrV4g4ahhuU5VxPSDY9GPJvGcuJk6TLEwH4VdP_bUJg08BsI-Z5k&usqp=CAU)

[4] : Récolte de la propolis par l'homme [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de : [https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS7xqH00wVAB8d9lOux\\_Xa3JARhh6l83omEA&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcS7xqH00wVAB8d9lOux_Xa3JARhh6l83omEA&usqp=CAU)

[5] : Composition de la propolis [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de :

<https://www.pollenergie.fr/files/132771/img/06/composition-de-la-propolis.jpg>

[6] : Biofilm produit par une souche de *Staphylococcus epidermidis* dans un système en microplaque. Image obtenue en microscopie confocale suite à une coloration du biofilm à l'aide de FilmTracer™ FM® 1–43 [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de :

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962273/bin/cjvr\\_04\\_110f1.jpg](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962273/bin/cjvr_04_110f1.jpg)

[7] : la plaque dentaire (biofilm dentaire) [consulté le 05/08/2023] disponible à partir de : <https://www.lecourrierdudentiste.com/lepatient/wp-content/uploads/2021/06/plaque-tartre-dentaire.jpg>

# **Chapitre-II :**

## **Matériel et méthodes**

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique.

Notre travail s'intéresse à l'étude comparative de plusieurs propolis Algérienne. Cette comparaison est réalisée en fonction de leurs profils chimiques et de leurs propriétés biologiques et plus particulièrement l'activité antibiofilm, anticancéreuse et antioxydante.

Dans la première partie de notre travail, nous avons réalisé une étude comparative de cinq propolis Algérienne récoltées de différente wilaya située à l'est d'Algérie. Cette première partie nous a permis de sélectionner les extraits les plus actifs. Ces extraits ont ensuite été analysé par chromatographie liquide ultra-performante couplée à une source d'ionisation électrospray (UPLC-ESI-MS / MS) pour déterminer leur composition chimique.

Dans la deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'étude comparative de deux propolis algérienne. Un bio guidage nous a permis de sélectionner les extraits les plus actifs pour l'investigation phytochimique.

### **II-1-Récolte de la propolis :**

Les échantillons de propolis étudiées ont été récoltés par des apiculteurs de différentes régions Algériennes au cours de l'été 2014 par raclage et grattage de l'entrée et des parois de la ruche. Le poids de la propolis varie entre 10 et 150g. La conservation des échantillons a été faite à l'abri de la lumière et de la chaleur. Les propolis étudiées proviennent de plusieurs régions : Oumtboul (propolis 1), Taref (propolis 2) situées à la wilaya de Taref. Ouadsabt (propolis 3). Ain elhamra (propolis 4), Ferdjiwa (propolis 5), Ares (propolis 6) situées à la wilaya de Mila, et Skikda (propolis 7).

### **II-2-Extraction :**

La méthode d'extraction (**Figure 11**) que nous avons adoptée dans notre laboratoire est la macération. Un gramme de chaque échantillon est coupé en petits morceaux, il est ensuite broyé et extrait dans un volume de 10 ml d'un solvant organique de polarité croissante ; il s'agit de l'éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, et le méthanol pendant 24 h. Cette opération est répétée trois fois pour chaque solvant. Les extraits obtenus sont enfin filtrés et les solvants évaporés à 40 °C pour obtenir les différents extraits.

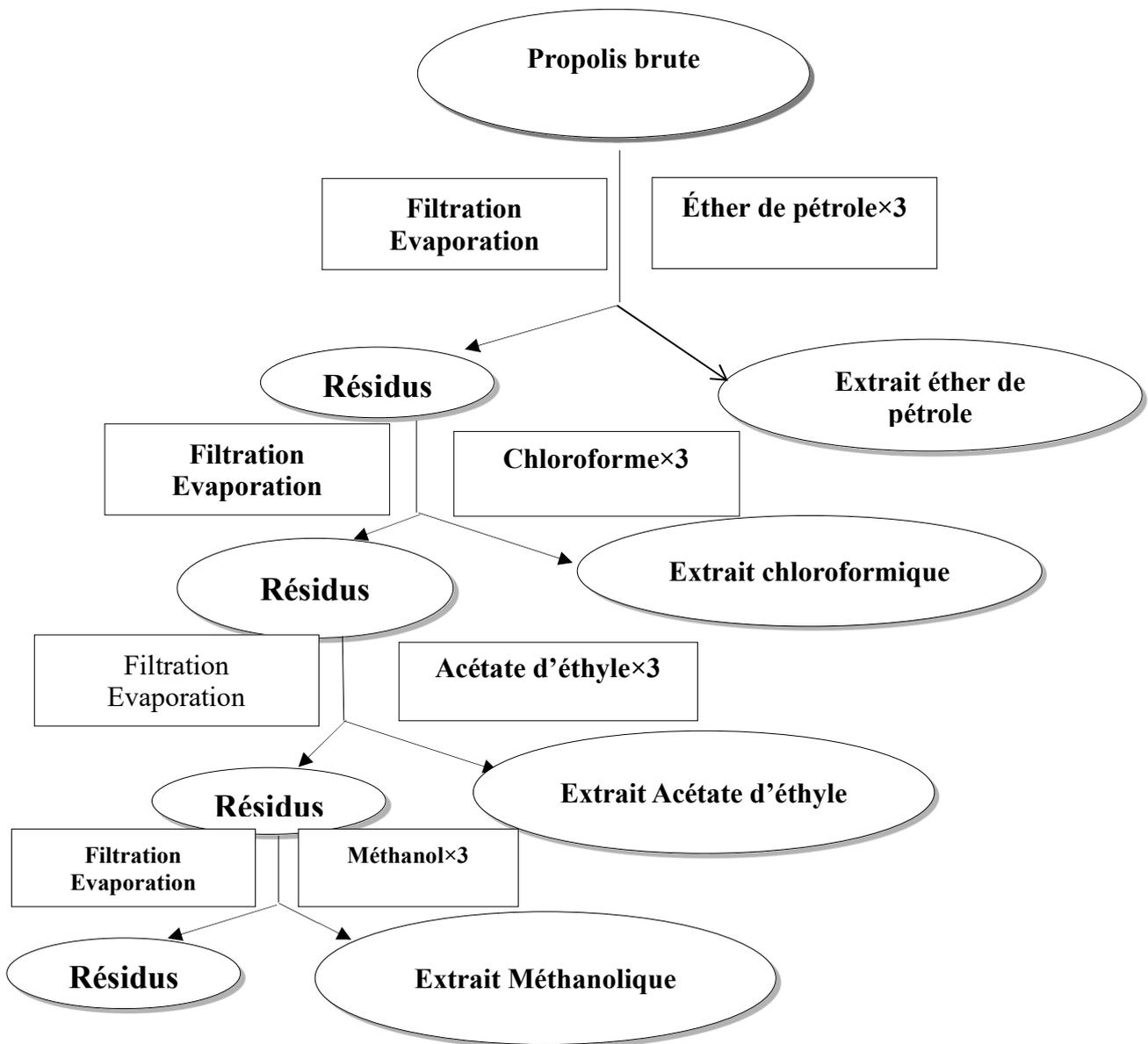


Figure 11: Protocole d'extraction de la propolis.

### II-3-Etude de l'activité antibiofilm :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique ainsi qu'au niveau du Laboratoire de Biologie, Département de biologie Faculté des sciences et arts université de Pamukkale, Denizli, Turquie. Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'effet antibiofilm de quelques propolis sur plusieurs souches bactériennes. Les tests sont réalisés sur sept souches Gram positive incluant des souches de référence : *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 3386), *Enterococcus Faecalis* ATCC 19433, *Micrococcus Luteus* NRRL-B1013 et des souches

résistantes : staphylocoque méticilline-résistant MRSA-10, MRSA-18 et MRSA-20 (MRSA : Meticillino Resistant *Staphylococcus aureus*). De plus, nous avons testé une bactérie Gram négative *Yersinia enterocolitica* RSKK 1501. Les propolis étudiées proviennent de plusieurs régions de l'Est algérien Oumtboul (propolis 1), Taref (propolis 2), Ouadsabt (propolis 3), Ain elhamra (propolis 4) et Ferdjiwa (propolis 5).

### II-3-1 Test de l'activité antibiofilm :

L'activité antibiofilm a été évaluée par la technique de coloration au cristal violet selon la méthode décrit par **Kouidhi et al (2010)**. L'effet antibiofilm des extraits de propolis (50-300 µg/mL) a été testé sur des microplaques de polystyrène à 96 puits.

Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 24 h à 37°C dans 5 mL de Bouillon tryptone caséine soja (T S B). Les suspensions bactériennes sont ajustés à 0,5 McFarland puis distribuées dans chaque puit en présence de TSB supplémenté avec 2% de glucose et contenant les extraits de propolis (50 à 300 µg/mL). Le DMSO a été utilisé comme contrôle. Les plaques ont enfin été incubées pendant 48 h à 37 ° C. Après l'incubation, les plaques ont été lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre puis colorées avec 1% de cristal violet et incubées de nouveau pendant 15min.

Les plaques ont été rincées en ajoutant l'éthanol pour les bactéries Gram négative et l'acide acétique glacial pour les bactéries Gram positive. Cette étape permet de décolorer les puits.

Enfin, la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 540 nm.

Le pourcentage d'inhibition a été évalué pour chaque concentration selon la formule suivante:

$$[(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

### II-3-2-Comptage des colonies :

Le comptage des cellules assemblées dans le biofilm a été réalisé à l'aide de la technique de comptage. Après maturation du biofilm dans les puits inoculés, la partie liquide a été retirée. Le biofilm mature est ensuite recueilli doucement avec de l'eau Saline. Les dilutions en série ont été effectuées et cultivées sur milieu solide. Après 24 h, les colonies ont été comptées pour déterminer le nombre de colonies par mL (CFU) (**Kouidhi et al., 2010**).

### II-3-3-Analyse par microscopie optique :

L'analyse en microscopie optique a été utilisée pour confirmer l'activité antibiofilm des extraits de propolis testés. Les lamelles ont été placées dans des plaques à 12 puits contenant les extraits de propolis et les bactéries testées puis incubées à 37°C. Ensuite, Ils ont été

colorées avec une solution de Giemsa 1/20 (v / v) pendant 30 min à 25 ° C et analysées par microscopie optique (Kouidhi et al., 2010).

#### II-4-Détermination de la cytotoxicité :

##### II-4-1-Conditions de culture :

Les cellules d'adénocarcinomes colorectaux humains (Caco-2) sont cultivés en milieu D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) contenant 10% de sérum bovin foetal (FBS), 1% de L-glutamine et additionné de 1% d'antibiotiques pénicilline-streptomycine (Pen-Strep). Les flasques de culture sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Les cellules sont inoculées dans 0,2 mL à une densité de 5 000 cellules par puits dans une plaque à 96 puits et incubées pendant 24 h.

##### II-4-2-L'activité cytotoxique :

L'effet antiprolifératif des différents traitements sur la croissance cellulaire a été évalué par le test colorimétrique MTT 3-(4,5-diméthylthiazole-2- yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) (figure 12).

Les cellules sont inoculées dans 0,2 mL à une densité de 5 000 cellules par puits dans une plaque à 96 puits et incubées pendant 24 h. Après incubation, le milieu de croissance est remplacé par 0,2 mL d'extraits de propolis à différentes concentrations puis incubées de nouveau pendant 48 h. Brièvement, après incubation, les cellules flottantes sont retirées et les cellules attachées sont incubées avec 10 mL de MTT pendant 3 h.

Après ajout de DMSO pour solubiliser les cristaux de formazan, l'absorbance a été mesurée à 590 nm (Kouidhi et al., 2010).

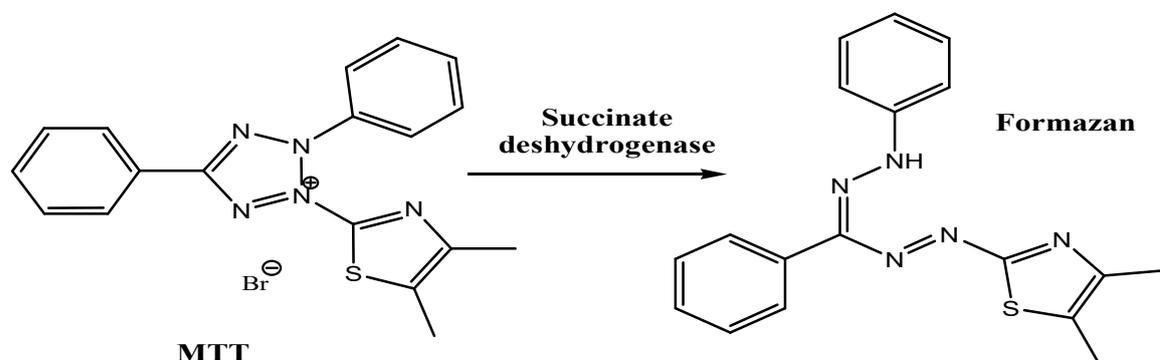


Figure 12 : Principe de la méthode colorimétrique au MTT (Mosmann, 1983).

### II-5- Analyse UPLC-ESI-MS/MS

Pour identifier les composés phénolique dans les extraits de propolis, nous avons utilisé la chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec une source d'ionisation électrospray (UPLC-ESI-MS / MS) selon la méthode décrite par **Kifrak et al., 2019**.

Les extraits de propolis ont été analysés en utilisant l'instrument (Waters Corporation, Milford, MA USA) équipé d'une colonne WATERS (Milford, USA) BEH C18 (100 mm X 2,1 mm X 1,7  $\mu$ m). Le débit était 0,65 mL.min<sup>-1</sup>. Pour l'identification des composés, un spectromètre de masse tandem Waters Xevo TQ-S Triple Quadrupole avec une source d'ionisation électrospray (Waters Corporation, Milford, MA USA) couplée à la chromatographie liquide ultra-performante est utilisée. Les phases mobiles utilisées sont l'eau mélangée avec de l'acide acétique à 0,5 % (éluant A) et de l'acétonitrile mélangée avec de l'acide acétique à 0,5 % (éluant B). Le gradient linéaire appliqué est de : 1 min, 99 % de A ; 10 min, 99-70% de A; 2 min, 70-99 % de A et enfin un plateau de 3 min à 99% de A.

Les paramètres de spectrométrie de masse en tandem étaient en mode ionique (ESI+/-), le nébuliseur 7,0 bar, température source 150 C, et température de désolvation 500 C.

Le volume d'injection dans le système HPLC est de 10  $\mu$ l. Les extraits ont été préparés à une concentration de 100ng/mL. L'ionisation par électrospray (ESI) source d'un spectromètre de masse (Waters, USA) a été réglée avec des solutions étalons de composés phénoliques dans le méthanol (100 ng/mL) perfusé à un débit de 10 mL/min avec un système fluidique. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode positif et en mode ion négatif avec une tension capillaire de 2 kV, et une tension de 25 V, source décalage de 60 V, température de désolvation de 500 C, et débit de gaz de désolvation de 1000 L/h. Les spectres MS ont été acquis et élaborés à l'aide du logiciel Masslynx pour tous les analytes.

### II-6-Analyse statistique:

L'étude de l'activité antibiofilm des différents extraits de propolis a été effectuée en utilisant une méthode adaptée au dosage sur plaque à 96 puits. Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Le comptage des colonies ainsi que l'étude de la composition phénolique par analyse **UPLC-ESI-MS/MS** ont aussi été réalisées en triple.

Pour la détermination de l'activité cytotoxique, les résultats de chaque extrait sont exprimés comme la moyenne de deux expériences indépendantes et reportés sous forme de moyenne  $\pm$

écart-type. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel SPSS (version 20.0). Pour l'analyse de la variance le test ANOVA a été réalisé suivi des tests post-hoc de Tuckey et Bonferroni pour analyser les différences significatives entre les différents traitements. Les valeurs sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p < 0.05$ ).

### II-7-Etude de l'activité antioxydante :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de produits naturels d'origine végétale et de synthèse organique ainsi qu'au niveau du Laboratoire de Biologie, Centre de Recherche en Biotechnologie CRBt, Constantine Algérie. Les propolis étudiées proviennent de deux régions de l'Est algérien Ares (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits des deux propolis étudiées est déterminée selon cinq méthodes: piégeage du radical libre DPPH, piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le blanchissement du  $\beta$ -carotène en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (Spectra Max PC340, Molecular Devices, USA).

#### II-7-1-Test antiradicalaire au DPPH

L'activité du DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par **Blois, 1958**. Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (**Figure 13**).

Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH est préparée dans le méthanol et 160  $\mu$ L de cette solution ont été ajoutés à 40  $\mu$ L d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT (Hydroxytoluène butylé) et le BHA (Hydroxyanisole butylé) ont été utilisés comme produits de référence (standards). La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure.

La capacité à piéger le radical DPPH représente le pourcentage de décoloration de ce radical. Elle a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

$A_{\text{Blanc}}$  est l'absorbance de la réaction contenant que les réactifs.

$A_{\text{Extrait}}$  est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50). Plus la valeur de (CI50) est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

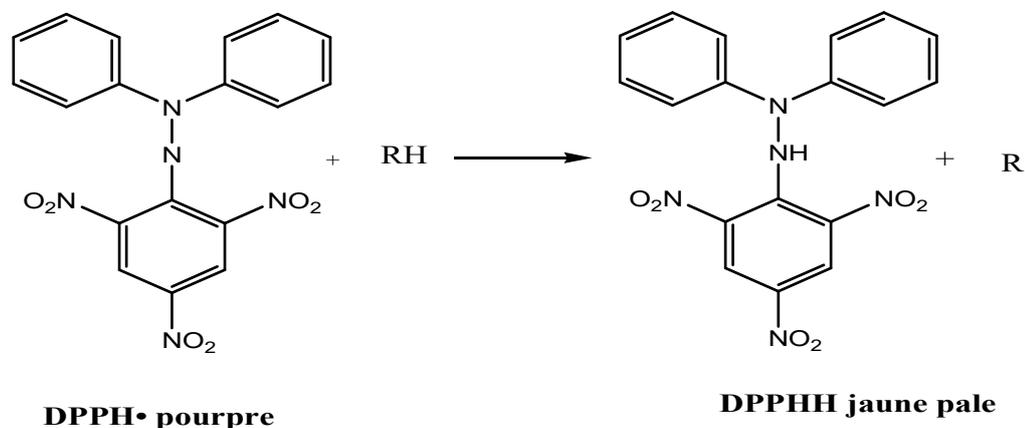


Figure 13 : Transformation du radical DPPH• en DPPHH

### II-7-2-Test du piégeage de l'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu verdâtre (Figure 14). Ce radical cationique est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Ainsi, la réaction se déroule en deux étapes. Au cours de la première étape, le radical ABTS<sup>•+</sup> est formé par arrachement d'un électron(e<sup>-</sup>) à un atome d'azote de l'ABTS. La deuxième étape se déroule en présence d'antioxydant donneur de H<sup>•</sup>. Le radical d'azote concerné piège un H<sup>•</sup> conduisant à l'ABTS H<sup>+</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

Une solution d'ABTS<sup>•+</sup> à 7 mM est mélangée à une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM puis stockée dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Le radical cation est placé pendant deux jours dans l'obscurité à température ambiante pour se stabiliser avant son utilisation.

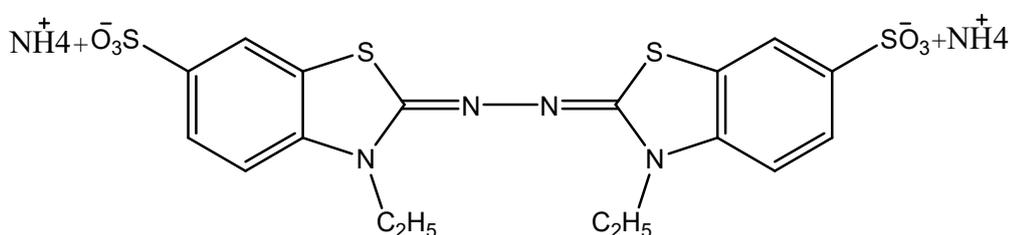
Avant utilisation, l'ABTS a été dilué pour obtenir une absorbance de 0,708 ± 0,025 à 734 nm avec de l'éthanol. Ensuite, 160 µl de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 40µl des différents extraits de propolis (dissout dans le méthanol à différentes concentrations). Après 10 min,

l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Le BHT et BHA ont été utilisés comme standards (Re et al., 1999).

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS<sup>•+</sup> a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

L'expression des résultats (CI50) sont déterminées par le même mode que celui décrit pour le test DPPH.



**Figure 14 :** ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

### II-7-3-Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés testés.

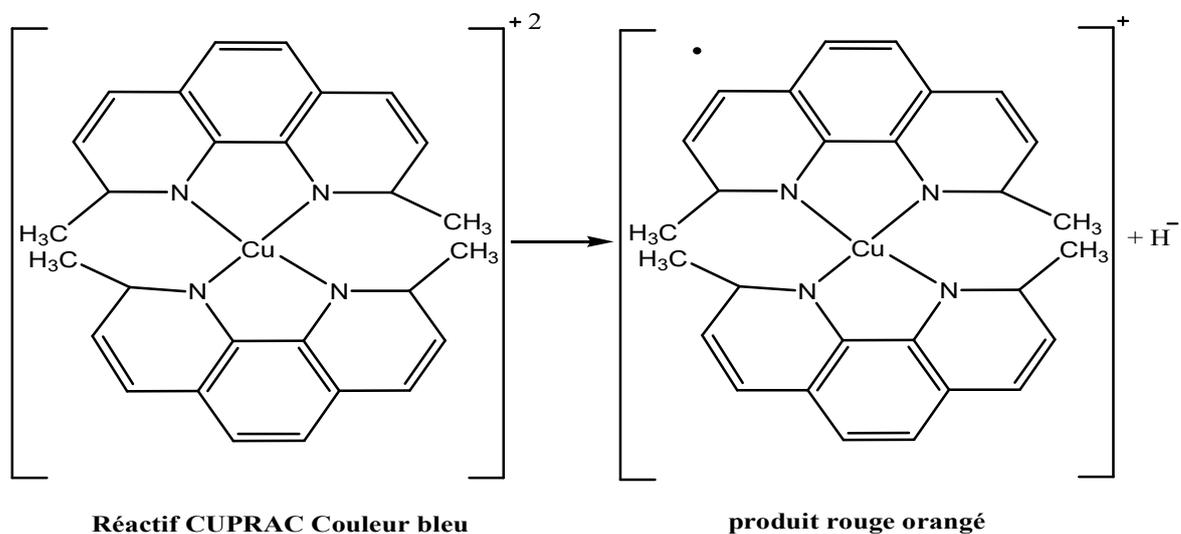
A 10  $\mu\text{l}$  de solution d'échantillon (propolis) à différentes concentrations, on ajoute 40  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 50  $\mu\text{l}$  de potassium hexacyanoferrate [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 50  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté ainsi que 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_3$  à 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le méthanol.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Yaizu, 1986).

Les résultats sont exprimés en  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) correspondant à la concentration indiquant une intensité d'absorbance de 0,5.

### II-7-4-Test de la réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) (**Figure 15**) décrite par Apak (**Apak et al., 2004**). Une solution est préparée en mélangeant 40  $\mu\text{l}$  des différents extraits de propolis avec 60  $\mu\text{l}$  d'une solution tampon  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 M,  $\text{pH} = 7,0$ ), 50  $\mu\text{l}$  de neocuprine (7,5 mM) et 50  $\mu\text{l}$  de Cu (II) (10 mM) respectivement. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles des deux standards BHA et BHT. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,5 d'absorbance.



**Figure 15 : la réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}\text{-NC}$**

### II-6-5-Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

L'activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène a été évaluée en utilisant l'acide  $\beta$ -carotène-linoléique (**Marco, 1968**). Une masse de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène est dissoute dans 1 mL de chloroforme puis ajoutée à un volume de 25  $\mu\text{l}$  d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40, formant un mélange émulsifiant. Après évaporation du chloroforme sous vide, un volume de 50 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été ajouté avec agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du  $\beta$ -carotène doit être comprise entre 0.8 et 0.9. Un volume de 160  $\mu\text{l}$  de cette solution a été ajouté à un volume de 40  $\mu\text{l}$  d'extrait de propolis aux différentes concentrations. L'absorbance a été mesurée à 470 nm chaque 30 minute en utilisant un lecteur de microplaque. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards.

Le blanchissement du  $\beta$ -carotène est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(R_{\text{Blanc}} - R_{\text{Extrait}}) / R_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A<sub>0</sub>: Absorbance à 0 minute.

A<sub>t</sub>: Absorbance à 120 minutes.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante:

## II-8-Analyse quantitative des composés phénoliques

Les analyses quantitatives de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnages et exprimés en µg équivalent/ mg de la matière végétale sèche.

### II-8-1-Dosage des composés phénoliques totaux (TCP)

#### II-8-1-1-Principe

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides : L'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et l'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux (Georgé et al., 2005).

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire (y = ax), réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 16).

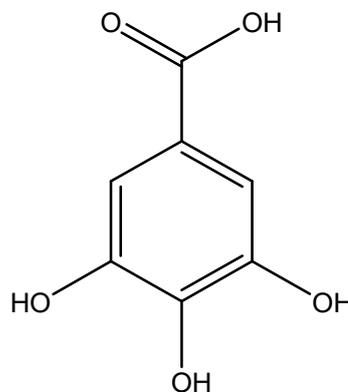


Figure 16: Structure de l'acide gallique

### II-8-1-2-Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par **Singleton et al (1999)** avec une légère modification. A un volume de 125  $\mu\text{l}$  de solution d'extrait de propolis (1 mg/mL), on ajoute 500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée puis 125  $\mu\text{l}$  du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1250  $\mu\text{l}$  de carbonate de sodium (20 g/l) et 1 mL d'eau distillée sont additionnés. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante puis la lecture est faite à 760 nm. L'acide gallique (50-500  $\mu\text{g/mL}$ ) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en  $\mu\text{g}$  d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait).

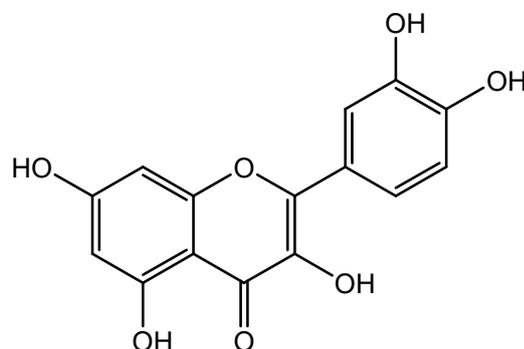
### II-8-1-3-Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de l'acide gallique de 500  $\mu\text{g/mL}$ , une série de dilution est préparée avec des concentrations allant de 50 à 500  $\mu\text{g/mL}$ . Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

### II-8-2-Dosage des flavonoïdes (TCF)

#### II-8-2-1-Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  avec lequel il forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle ( $\text{C}=\text{O}$ ) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, l' $\text{AlCl}_3$  peut également former des complexes acides labiles avec les groupements *ortho* dihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes. L'absorbance est mesurée au voisinage de 420 nm et les résultats sont exprimés en équivalents de quercétine (**Figure 17**) (**Woisky et al., 1998**).



**Figure 17** : Structure de la quercétine

### II-8-2-2-Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes totaux est celle décrite par **Turkoglu et al (2007)** avec une légère modification. Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 mL de méthanol pour obtenir la solution (S1). Un volume de 500 µl de la solution (S1) est mélangé avec 1900 µl de méthanol (MeOH), 50 µl d'une solution (S2) de CH<sub>3</sub>COOK et 50 µl de [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 9H<sub>2</sub>O]. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante puis la lecture est faite à 415 nm. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (500µl extrait + 2 mL méthanol). La quercétine (25-200 µg/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavonoides totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en µg d'équivalents de la quercétine par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

### II-8-2-3-Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de la quercétine de 200 µg/mL, une série de dilution est préparée avec des concentrations allant de 25 à 200 µg/mL. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

### II-9-L'activité cytotoxique :

L'effet antiprolifératif de la propolis sur la viabilité cellulaire des cellules d'adénocarcinome du sein humain (MDA-MB-231) a été évalué par le test colorimétrique MTT 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide). Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées en milieu de culture complet RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Sigma) supplémenté de 10 % de sérum bovin foetal inactivé par la chaleur (FBS, Capricorne), 2 mM de glutamine, 1 % d'une solution pénicilline/streptomycine (Gibco) puis incubé à 37°C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Tous les 2 à 3 jours, le milieu de culture est renouvelé. Les cellules sont ensuite récoltées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma) à 90% de confluence. Pour le test MTT, les cellules à la densité de 4000 cellules/puits sont cultivées dans des plaques de culture de 96 puits en présence de 200 µl du milieu de culture pendant 24h. Le milieu est ensuite enlevé délicatement puis les cellules sont traitées avec des extraits de propolis à différentes concentrations (2,5, 5, 10, 25, 50, 100 et 250µg/mL). Après incubation pendant 24 h, 10 µl de MTT (5 mg/mL dans du tampon phosphate salin) sont ajoutés et incubés pendant 4 h. Après incubation, 50 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) sont ajoutés pour solubiliser les cristaux de formazan. La quantité de formazan formée a été mesurée avec un lecteur de microplaques (Epoch, BioTek, USA) à 590 nm. La viabilité cellulaire (pourcentage) a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{viabilité cellulaire \%} = (\text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

### II-9-1-Mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP :

L'analyse de l'apoptose est réalisée en utilisant le kit de l'annexine V-EGFP (BioVision, USA). Brièvement, après 24 h d'incubation, les cellules ensemencées et traitées avec les extraits de la propolis sont lavées avec le PBS (Tampon phosphate salin) et remises en suspension dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon d'incubation. Un volume de 5  $\mu\text{L}$  d'annexine-V et 1  $\mu\text{L}$  de colorant PI (iodure de propidium) sont ajoutés à la suspension cellulaire, mélangés doucement et maintenus dans de la glace pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules ont été chargées dans un compteur de cellules (Arthur Cell Counter, NanoEnTek, États-Unis). Le marquage Annexine-V et iodure de propidium permet donc de caractériser trois sous populations de cellules : les cellules en apoptose, les cellules en nécrose et les cellules viables. Le pourcentage de cellules apoptotiques est exprimé par la moyenne  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes.

### II-9-2-Électrophorèse sur gel et western blot :

Pour l'analyse SDS-PAGE et Western Blot, les cellules MDA-MB-231 (traitées avec les extraits de propolis et les cellules contrôle) ont été recueillies et les protéines ont été préparées par sonication. La méthode ABC (la technique de l'acide BiCinchoninique) a été utilisée pour déterminer la concentration totale de protéines cellulaires en utilisant le ASB (albumine de sérum bovin) comme standard. Un volume allant de 75 à 150  $\mu\text{g}$  de protéines a été séparé sur du gel de polyacrylamide à 8,5% ou 12% en utilisant la méthode de **Laemmli (1970)**.

Les changements des taux de protéines dus à la présence des différents extraits de propolis ont été déterminés par analyse Western blot. Brièvement, les protéines séparées ont été transférées sur une membrane en nitrocellulose en utilisant un tampon Tris-glycine contenant du méthanol, à 90 V pendant 90 min. Après transfert, 5 % du lait sans gras en poudre dans du TBST (Tris Buffered Saline Tween) [20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 400 mM NaCl et 0,1 % (v/v) Tween 20] a été utilisé pour bloquer la membrane. Après 60 min, la membrane a été incubée avec la Caspase 3 anti-humaine, Bcl-2, Bax, CDK-4 et Anticorps P53 (dilué 1:200-1/1000 dans une solution de blocage). Après avoir été lavé trois fois avec du TBST, le blot a été encore incubé avec des anticorps secondaires conjugués à la phosphatase alcaline pendant 2 heures. Ensuite, la membrane a été lavée avec du TBST pour éliminer les anticorps non liés. La méthode décrite par **Ey & Ashman (1986)** a été utilisée pour déterminer l'activité de la phosphatase alcaline. Les images finales ont été obtenues à l'aide d'un instrument d'imagerie (système de documentation de gel GellITE, Royaume-Uni). Le GAPDH (Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase) a été utilisé. Les densités de bande ont été quantifiées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (Scion Image Version Bêta 4.0.2).

### **II-9-3-Isolation d'ARN, synthèse d'ADNc et PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel :**

Des cellules MDA-MB-231 ( $1 \times 10^7$  cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup>) ont été exposées à des valeurs EC50 de différents extraits de la propolis. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit (innuPREP RNA Mini Kit 2.0, Analytique Jena, Allemagne) après 24h. Les taux d'ARN ont été mesurés à 260/280 nm. La densité optique est mesurée à deux longueurs d'onde différentes :  $\lambda = 260$  nm (maximum d'absorption des acides nucléiques) et  $\lambda = 280$  nm (maximum d'absorption des protéines) et du gel d'agarose. L'électrophorèse a été utilisée pour vérifier la pureté de l'ARN.

Le Kit de synthèse d'ADNc OneScript® Plus (ABM, États-Unis) a été utilisé pour convertir les ARN en ADNc. Brièvement, 2,5 µg d'ARN, w 0,5 µM oligo (dT)18 reverse amorce de transcription, dNTP, tampon RT, inhibiteur de ribonucléase RNaseOFF (20 unités), OneScript® Plus RTase (200 unités) et de l'eau sans nucléase ont été incubés à 50°C pendant 50 min. La réaction de synthèse a été stoppée par incubation à 85°C pendant 5 min. Les dosages PCR quantitatifs en temps réel pour Caspase-3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53 ont été réalisés à l'aide du système de PCR en temps réel Applied Biosystems™ StepOnePlus™ (Thermo, États-Unis).

Les réactions ont été réalisées dans des volumes de 10 µl à l'aide d'ABM KiloGreen 2X qPCR MasterMix (ABM, USA). De l'eau de qualité PCR et un échantillon dans lequel la transcriptase inverse a été omise lors de la transcription inverse ont été inclus dans chaque cycle de PCR en tant que témoins négatifs pour confirmer qu'il n'y avait pas de contamination par l'ADN génomique dans les échantillons d'ADNc. La méthode des  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  a été utilisée pour la détermination des changements de pli dans les niveaux d'ARNm et la GAPDH a été utilisé comme gène de ménage.

### **II-10-Analyses statistiques:**

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Le logiciel statistique en ligne VassarStats a été utilisé pour les analyses statistiques. Les données ont été fournies sous forme de moyennes, y compris l'erreur standard des moyennes (SEM). Un test t de Student a été utilisé pour comparer les données. Les valeurs sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p < 0.05$ )

## **II-11-Étude phytochimique**

L'étude biologique réalisée dans la première partie de notre travail nous a permis de sélectionner les extraits les plus actifs de la propolis de Ares (Mila) pour la suite de notre travail. Dans la deuxième partie nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de la propolis de Mila et plus particulièrement les extraits chloroformique et acétate d'éthyle qui possède une activité biologique très importante.

### **II-11-1-Séparation et purification des composés de l'extrait chloroformique**

Plusieurs tests chromatographiques avec plusieurs systèmes de solvants ont mené au système de séparation (cyclohexane/éther d'éthylque).

L'extrait chloroformique (25 g) est mélangé avec une petite quantité de gel de silice puis déposé sur une colonne de gel de silice (20-45  $\mu$ m, Merck) préparé dans le cyclohexane. L'éluion est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane-éther d'éthylque en commençant par le cyclohexane à 100% et en terminant par l'éther d'éthylque à 100% et lavé avec le méthanol avec un fractionnement tous les 150 mL (**Tableau 6**). Le suivi des fractions est effectué par CCM de gel de silice et les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 6** :

**Tableau 6 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait chloroformique.**

N° de fraction	%			Observations
	Cyclohexane	Ether diéthylique	Méthanol	
1-8	100	0	0	Trace des produits + Graisses et cires
9-25	75	25	0	Trace des produits + Graisses et cires
26-34	50	50	0	Mélange séparable
35-37	25	75	0	Mélange séparable
38	0	100	0	Mélange séparable
39	0	100	0	Mélange complexe
40	0	0	100	Mélange complexe
41	0	0	100	Mélange complexe
42-43	0	0	100	Mélange complexe

Les différentes fractions recueillies sont regroupées selon leur profil chromatographique dans le système cyclohexane/éther diéthylique avec différents pourcentages. L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions obtenues a permis de les regrouper en 13 sous fractions. **Le tableau 7** représente ce rassemblement.

**Tableau 7 : Regroupement des fractions de la phase chloroformique.**

Nom de la fraction	N° de fractions regroupées	Observations
F1	1-7	Trace des produits + Graisses et cire
F2	8	Trace des produits + Graisses et cire
F3	9-25	Trace des produits + Graisses et cires
F4	26	Mélange séparable
F5	27-33	Mélange séparable
F6	34	Mélange séparable
F7	35-36	Mélange séparable
F8	37	Mélange séparable
F9	38	Mélange séparable
F10	39	Mélange complexe
F11	40	Mélange complexe
F12	41	Mélange complexe
F13	42-43	Mélange complexe

**II-11-1-1- L'étude de la fraction F6 :**

La fraction F6 a subi une séparation sur colonne de gel de silice avec le système cyclohexane-acétate d'éthyle (6/4), les résultats sont dressés dans **le tableau 8**.

**Tableau 8 : Résultats de séparation de la fraction F6**

Sous fraction	Remarques
F6-1	PCI34 : Mono tache donnant une tache violet à 365 nm (lampe de Wood)
F6-2	Mélange complexe
F6-3	Traces des produits

**II-11-2- Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle :**

Plusieurs tests chromatographiques avec plusieurs systèmes de solvants nous permis de choisir le système de séparation (cyclohexane/acétate d'éthyle/méthanol).

L'extrait acétate d'éthyle (20 g) est mélangé avec une petite quantité de gel de silice puis déposé sur une colonne de gel de silice (20-45 µm, Merck) préparé dans le cyclohexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane-acétate d'éthyle en commençant par le cyclohexane à 100% et en terminant par le Méthanol à 100% en récupérant des fractions de 150 mL (**Tableau 9**). Le suivi des fractions est effectué par CCM de gel de silice et les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau 9** :

**Tableau 9 : Fractions issues de la séparation sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle.**

N° de fraction	%			Observations
	Cyclohexane	Acétate d'éthyle	Méthanol	
1-23	100	0	0	Traces de produit
24-70	90	10	0	Mélange séparable
71-100	70	30	0	Mélange séparable
101-118	50	50	0	Mélange séparable
119-120	30	70	0	Mélange complexe
121-125	0	100	0	Mélange complexe
126-128	0	50	50	Mélange complexe
129-130	0	25	75	Mélange complexe
131-135	0	0	100	Mélange complexe

L'analyse par chromatographie sur couche mince des fractions obtenues a permis de les regrouper en 23 sous fractions. **Le tableau 10** représente ce rassemblement.

**Tableau 10 : Regroupement des fractions de la phase acétate d'éthyle.**

Nom de la fraction	N° de fractions regroupées	Observations
F1	1-7	Traces de produit
F2	8-10	Traces de produit
F3	11-16	Traces de produit
F4	17	Traces de produit
F5	18-21	Traces de produit
F6	22-25	Mélange séparable
F7	26-27	Mélange séparable
F8	28-31	Mélange séparable
F9	32	Mélange séparable
F10	33-34	Mélange séparable
F11	35	Mélange séparable
F12	36-48	Mélange séparable
F13	49	<b>Formation d'un précipité</b>
F14	50-55	<b>Formation d'un précipité</b>
F15	56-75	Mélange complexe
F16	76-80	<b>Formation d'un précipité</b>
F17	81-92	Mélange complexe
F18	93-100	Mélange séparable
F19	101-110	Mélange complexe
F20	111-115	Mélange complexe
F21	116-120	Mélange complexe
F22	121-130	Mélange complexe
F23	131-135	Mélange complexe

Parmi les fractions obtenues, on a choisi la séparation des fractions **F7, F14, F16, F17, F18**.

#### **II-11-2-1- L'étude de la fraction F7:**

Une séparation sur colonne de gel de silice avec le système cyclohexane-Acétate d'éthyle de la fraction F7 en commençant par le cyclohexane à 100% et en terminant par l'acétate d'éthyle à 100% a mené au résultat représenté dans **le tableau 11**.

**Tableau 11:** Résultats de séparation de la fraction F7

Sous fraction	Remarques
F7-1	<b>PAC 27 : mono tache donnant une tache violet à 365 nm (lampe de Wood).</b>
F7-2	Trace des produits

**II-11-2-2- L'étude de la fraction F14 :**

Comme signalé précédemment, au cours du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons remarqué la formation d'un précipité de couleur blanche que nous avons filtré et rincé par le méthanol pour obtenir un produit pur appelé **SN10** (10 mg).

**II-11-2-3- L'étude de la fraction F16 :**

La fraction **F16** renferme un précipité jaune insoluble dans le chloroforme. Ce précipité est filtré puis recristallisé dans le chloroforme. Ce précipité soluble dans le méthanol est appelé composé **PAC79** (13.5 mg).

**II-11-2-4- L'étude de la fraction F17 :**

Une séparation sur colonne de gel de silice avec le système cyclohexane-acétate d'éthyle (7/3) de la fraction F17 a mené au résultat du **tableau 12**.

**Tableau 12:** Résultats de séparation de la fraction F17

Sous fraction	Remarques
F84-1	Mélange complexe
F84-2	Mélange complexe
F84-3	<b>PAC48 : mono tache donnant une tache violet à 365 nm (lampe de Wood) (10mg)</b>
F84-4	Trace des produits

**II-11-2-5- L'étude de la fraction F18 :**

La fraction F18 a subi une séparation sur colonne de gel de silice avec le système isocratique cyclohexane-acétate d'éthyle-Méthanol (7/2/1), les résultats sont présentés dans **le tableau 13**.

**Tableau 13:** Résultats de séparation de la fraction F18

Sous fraction	Remarques
F18-1	Trace des produits
F18-2	Trace des produits
F18-3	Mélange de produits

F18-4

Mélange de produits

Ensuite, la sous fraction de la fraction F18-3 a été séparée avec une autre colonne sur gel de silice avec le système isocratique cyclohexane-acétate d'éthyle (7:3), pour donner les résultats du **tableau 14**.

**Tableau 14:** Résultats de séparation de la Sous fraction F18-3

Sous fraction	Remarques
SF18-1	Trace des produits
SF18-2	<b>PAC91 :mono tache donnant une tache violet à 365 nm (lampe de Wood) (16mg)</b>
SF18-3	Mélange de produits
SF18-4	Mélange de produits
SF18-5	Trace des produits

## II-12- L'identification spectrale des composés isolés

Les composés séparés ont été identifiés en utilisant les techniques suivantes :

### II-12-1-Spectrophotométrie UV-visible

Le spectrophotomètre est un appareil permettant de mesurer l'absorbance d'une solution pour différentes longueurs d'ondes. Pour cela, il fait passer un rayon d'une longueur d'onde à travers une cuve contenant la solution à étudier. Les molécules de la solution absorbent plus ou moins le rayon lumineux. On définit alors l'absorbance pour cette longueur d'onde. La spectrophotométrie UV-Visible, reste une technique essentielle pour l'identification des flavonoïdes. Les spectres sont réalisés en présence de méthanol puis dans divers réactifs (NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>).

### II-12-2-Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique non destructrice capable de donner des informations sur la structure chimique des composés. Elle est généralement employée pour un composé purifié afin d'obtenir sa structure précise à l'aide des spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C).

### Référence :

- Adesegun, S. A., Fajana, A., Orabueze, C. I., & Coker, H. A. B. (2009). Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* CB Cl.(Acanthaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), 227-231.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Ey, P.L., Ashman, L.K. (1986). The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures; in Langone JJ, Vunakis HV (eds.): *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press. 121: 497-509.
- Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W. H., & Zhang, Y. (2018). A rapid growth-independent antibiotic resistance detection test by SYBR green/propidium iodide viability assay. *Frontiers in medicine*, 5, 127.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), 1370-1373.
- Kivrak, Ş., Göktürk, T., Kivrak, I., Kaya, E., & Karababa, E. (2018). Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology*, 39, 423-431.
- Kouidhi, B., Zmantar, T., & Bakhrouf, A. (2010). Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe*, 16(6), 566-571.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Marco ,G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, 594–598.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

- Oyaizu, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Society of Nutrition and Dietetics*, 44, 307-315.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Met.Enzym*, 299, 152-178.
- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food chemistry*, 101(1), 267-273.
- Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-10

---

# **Chapitre-III:**

## **Résultats et discussion**

### III-I-1-1-Etude de l'activité antibiofilm:

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antibiofilm (Cristal violet et UFC) des extraits éther de pétrole (PE), chloroformique (Cl), acétate d'éthyle (EA) et méthanol (ME) de cinq propolis collectées dans différentes zone géographiques de l'Est algérien. Ces propolis proviennent de Oumtboul (propolis 1), Taref (propolis 2), Ouadsabt (propolis 3), Ain elhamra (propolis 4) et Ferdjiwa (propolis 5).

L'étude a été réalisée sur huit souches de références : *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* ATCC33862, MRSA 10, MRSA 18, MRSA 20, *E. faecalis* ATCC19433, *M. luteus* NRRLB1013 et *Y. enterocolitica* RSKK1501.

Les résultats obtenus sont présentées dans le (**Tableau 15**) et illustrés dans la (**Figure 18**).

Tableau 15 : Pourcentage de réduction de la formation de biofilm par les extraits de propolis à 300 (µg/mL).

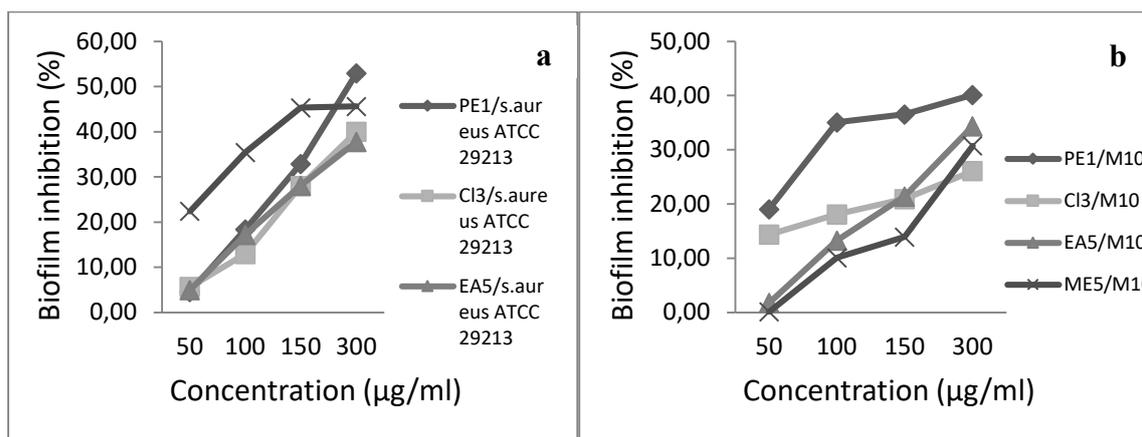
	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. aureus</i> ATCC33862	MRSA 10	MRSA 18	MRSA 20	<i>E. faecalis</i> ATCC19433	<i>M. luteus</i> NRRLB1013	<i>Y. enterocolitica</i> RSKK1501
PE1	52,94 ± 5,36	47,14 ± 4,09	40,15±2,67	48,05±4,90	80,72±2,34	58,0 ± 3,06	37,96±0,35	23,47±1,32
CL1	16,93 ± 2,00	21,17 ± 1,73	14,76±3,75	ND	0,51 ± 0,05	8,79 ± 3,10	0,35 ± 0,11	5,47 ± 2,09
EA1	24,01 ± 3,32	19,58 ± 4,10	12,64±0,14	ND	1,89 ± 1,01	6,02 ± 1,89	0,28 ± 0,09	3,72 ± 0,09
ME1	12,79 ± 0,96	27,27 ± 2,18	7,61 ± 2,58	ND	ND	9,18 ± 1,25	0,22 ± 0,08	4,95 ± 1,54
PE2	29,78 ± 3,31	26,43 ± 2,15	15,19±0,51	0,96 ± 0,25	1,58 ± 0,52	5,54 ± 1,90	0,46 ± 0,30	3,61 ± 1,80
CL2	27,04 ± 1,83	18,52 ± 2,53	15,36±1,44	0,66 ± 0,18	ND	5,16 ± 1,78	0,42 ± 0,15	6,45 ± 1,08
EA2	22,60 ± 2,32	13,16 ± 0,25	26,01±2,44	ND	ND	8,31 ± 1,36	ND	6,11 ± 1,55
ME2	13,47 ± 1,25	10,61 ± 1,58	15,61±1,35	ND	ND	7,81 ± 2,89	ND	6,80 ± 1,44
PE3	29,71 ± 2,13	24,12 ± 3,45	19,81±0,25	ND	ND	5,52 ± 1,24	0,46 ± 0,01	3,62 ± 0,78
CL3	40,02 ± 9,48	39,44 ± 6,51	26,12±1,84	51,60±4,25	62,64±3,30	9,19 ± 0,91	0,48 ± 0,01	26,12 ± 1,50
EA3	21,28 ± 2,75	23,15 ± 2,14	18,68±2,31	ND	ND	8,95 ± 1,08	0,31 ± 0,02	5,55 ± 1,23
ME3	9,14 ± 1,02	20,18 ± 3,89	19,53±1,25	ND	ND	5,11 ± 1,12	0,33 ± 0,14	3,53 ± 1,78
PE4	25,48 ± 4,77	15,49 ± 3,25	16,15±2,15	0,22 ± 0,03	ND	9,09 ± 1,75	ND	6,13 ± 2,14
CL4	11,63 ± 0,22	16,62 ± 3,24	13,01±1,39	ND	ND	8,63 ± 1,90	0,14 ± 0,02	2,45 ± 0,86
EA4	15,55 ± 0,98	9,74 ± 0,28	24,82±3,22	ND	ND	8,76 ± 1,25	0,36 ± 0,19	3,07 ± 1,10
ME4	8,10 ± 1,15	20,66 ± 2,54	15,25±1,86	ND	ND	9,13 ± 2,35	0,37 ± 0,45	0,48 ± 0,15
PE5	28,97 ± 2,88	29,97 ± 4,12	23,33±3,25	0,27 ± 0,10	1,11 ± 0,01	4,94 ± 1,45	ND	6,34 ± 1,29
CL5	14,55 ± 1,15	28,18 ± 2,25	22,35±3,18	1,38 ± 0,78	0,66± 0,1 5	9,10 ± 2,35	ND	ND
EA5	37,81 ± 4,47	38,94 ± 6,71	34,38±1,33	59,92±0,96	38,62±3,17	45,75±0,96	30,87±0,90	6,83 ± 0,78
ME5	45,65 ± 8,55	49,54 ± 1,37	30,75±4,47	ND	ND	12,75±1,52	0,48 ± 0,01	14,79 ± 0,69

NB : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Oumtboul (propolis 1), Taref (propolis 2), Ouadsabt (propolis 3), Ain elhamra (propolis 4) et Ferdjiwa (propolis 5).

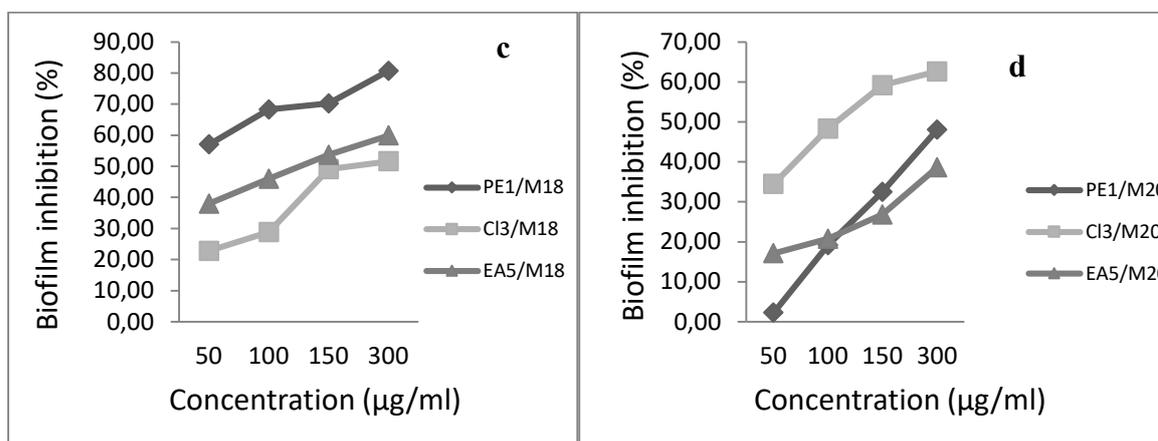
PE: extrait éther de pétrole  
AE : extrait acétate d'éthyle

Cl : extrait chloroformique  
ME : extrait méthanolique



a : Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de *S aureus* ATCC 29213

b : Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de MRSA-M10



c : Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de MRSA-18

d : Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de MRSA-20

PE1 : extrait d'éther de pétrole de propolis1 (Oum tboul).

Cl3 : extrait chloroformique de propolis3 (Ouaisabt).

EA5 : extrait acétate d'éthyle de propolis5 (Ferdjiwa).

ME5 : extrait Méthanolique de propolis5 (Ferdjiwa).

**Figure 18:** Effet des extraits de la propolis sur la formation du biofilm de *S. aureus* ATCC 29213 et des staphylocoques résistants à la méthicilline (MRSA10, MRSA18et MRSA20).

L'étude comparative de l'activité antibiofilm de nos extraits sur l'ensemble des souches testées montre que nos extraits sont plus actifs sur les souches de référence de *S. aureus* et les souches résistantes à la méthicilline, en particulier MRSA-18 et MRSA-20.

Nos résultats indiquent que l'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1), l'extrait chloroformique de la propolis de Wad sabt (Cl3) et l'extrait acétate d'éthyle et méthanolique de la propolis de Ferdjiwa (EA 5 et ME5) présentent les pourcentages d'inhibition les plus élevés avec des valeurs allant de  $6.83\% \pm 0.78\%$  jusqu'à  $80.72\% \pm 2.34\%$ . L'ensemble des extraits testés présente les valeurs les plus faibles pour l'irradiation d'*Y. enterocolitica* RSKK1501 ( $6.83\% \pm 0.78\%$  -  $26.12\% \pm 1.50\%$ ). Cette bactérie est la moins sensible aux extraits de propolis.

Les extraits éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1) et chloroformique de la propolis de Wad sabt (Cl3) ont démontré l'activité la plus élevée pour MRSA 18. Nos résultats suggèrent que l'activité antibiofilm des différents extraits de propolis varie significativement en fonction de la souche testée, de l'origine géographique et du solvant utilisé lors de l'extraction. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Ferdjiwa (EA5) semble agir de la même manière sur les deux souches de référence de *S. aureus*, MRSA10-1, MRSA18-3, *E. faecalis* ATCC19433, and *M. luteus* NRRL-B1013. Les différences observées entre ces souches sont non significatives. Cet extrait a montré une activité assez intéressante sur l'inhibition du biofilm formé par MRSA18-3 avec  $59.92\% \pm 0.96\%$ . Cependant, il agit faiblement sur l'inhibition de *Y. enterocolitica* RSKK1501 avec  $6.83\% \pm 0.78\%$ . Il est intéressant de noter que le même extrait ne présente aucune activité sur les souches MRSA18-3 and MRSA20-1. Par contre, cet extrait inhibe le biofilm formé par MRSA10-1 avec  $30.75\% \pm 4.47\%$ .

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Wojtyczka & KeRpa, 2013; Doganli, 2016). De plus, de nombreux auteurs ont démontré que les propolis algériennes sont plus actives sur *S. aureus* (Benhanifia et al., 2013 ; Nedji & Loucif-Ayad, 2014 ; Segueni et al., 2014; Boufadi et al., 2016) en comparaison avec *E. coli*, *P. aeruginosa* (Nedji & Loucif-Ayad, 2014 ; Segueni et al., 2014 ; Boufadi et al., 2016), *P. mirabilis* et *K. pneumoniae* (Segueni et al., 2014).

### III-I-1-2-Comptage des colonies : L'unité formatrice de colonies UFC

L'unité formatrice de colonies UFC est utilisée pour l'évaluation de l'activité antibiofilm en raison de sa stabilité et de la simplicité de l'analyse.

Nos résultats indiquent que parmi l'ensemble des extraits testés les extraits PE1, Cl3, EA5 et ME5 présentent une activité antibiofilm importante largement supérieure aux autres extraits étudiés (Tableau 16).

**Tableau 16** : Evaluation de l'activité antibiofilm par comptage des colonies

	Contrôle	PE1	CI3	EA5	ME5
<b><i>S. aureus</i> ATCC 29213</b>	2,725 x 10 <sup>7</sup> ± 0,125	1,64 x 10 <sup>5</sup> ± 0,01*	1,744 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	1,21 x 10 <sup>5</sup> ± 0,01*	1,58 x 10 <sup>5</sup> ± 0,02*
<b><i>S. aureus</i> ATCC 33862</b>	2,7 x 10 <sup>7</sup> ± 0,125	1,29 x 10 <sup>5</sup> ± 0,03*	1,3 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	1 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	1,4 x 10 <sup>5</sup> ± 0,2*
<b>MRSA 10-1</b>	1,21 x 10 <sup>7</sup> ± 0,15	4,4 x 10 <sup>5</sup> ± 1,2*	4,23 x 10 <sup>5</sup> ± 0,89*	7,98 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	5,08 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*
<b>MRSA 18-3</b>	2,1 x 10 <sup>7</sup> ± 0,1	3,78 x 10 <sup>4</sup> ± 0,45*	1,21 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	1,32 x 10 <sup>5</sup> ± 0,1*	2 x 10 <sup>7</sup> ± 0,2
<b>MRSA 20-1</b>	2,195 x 10 <sup>7</sup> ± 0,005	1,14 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	1,40 x 10 <sup>5</sup> ± 0,05*	1,053 x 10 <sup>5</sup> ± 0,399*	1,95 x 10 <sup>7</sup> ± 0,05
<b><i>E. faecalis</i> ATCC 19433</b>	4,65 x 10 <sup>7</sup> ± 0,05	3,162 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	6,96 x 10 <sup>5</sup> ± 0,44*	2,32 x 10 <sup>5</sup> ± 0,24*	8,6 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*
<b><i>M. luteus</i> NRRL B1013</b>	3,65 x 10 <sup>7</sup> ± 0,05	1,42 x 10 <sup>5</sup> ± 0,00*	3,4 x 10 <sup>7</sup> ± 0,00	1,35 x 10 <sup>6</sup> ± 0,15*	3,2 x 10 <sup>7</sup> ± 0,1
<b><i>Y. enterocolitica</i> RSKK 1501</b>	2,87 x 10 <sup>7</sup> ± 0,07	2,09 x 10 <sup>7</sup> ± 0,44	1,87 x 10 <sup>7</sup> ± 0,04	2,6 x 10 <sup>7</sup> ± 0,5	2,8 x 10 <sup>6</sup> ± 0,1

**NB** : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

PE1 : extrait d'éther de pétrole de propolis1 (Oum tboul).

CI3 : extrait chloroformique de propolis3 (Ouaisabt).

EA5 : extrait acétate d'éthyle de propolis5 (Ferdjiwa).

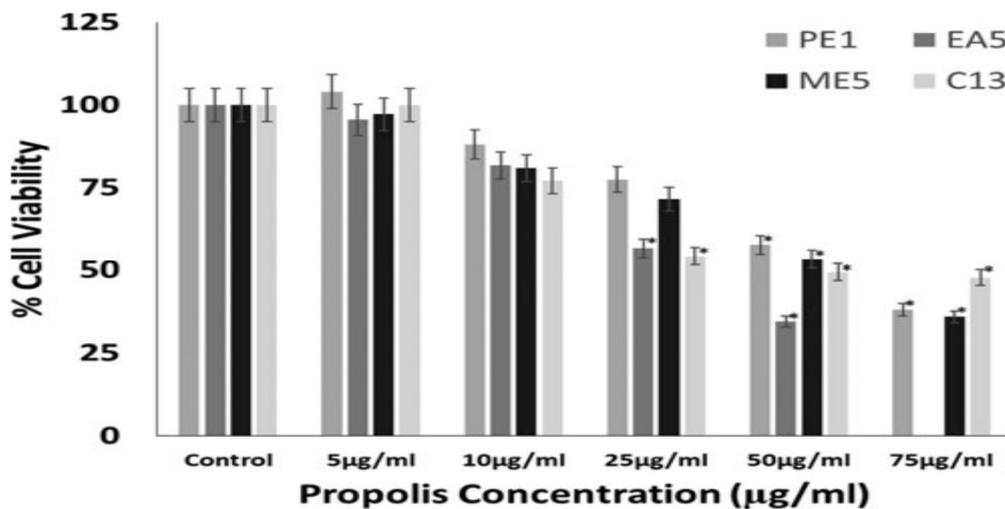
ME5 : extrait Méthanolique de propolis5 (Ferdjiwa).

**III-I-3-L'activité cytotoxique :**

Dans le but d'évaluer l'effet cytotoxique des propolis Algériennes sur les cellules d'adénocarcinome (Caco-2), les cellules ont été traitées pendant 48h par des concentrations allant de 5 à 75 µg/mL.

Nos résultats indiquent que les extraits de propolis testés possèdent un effet cytotoxique d'une manière dose dépendante. Une diminution de la viabilité cellulaire a été observée avec les concentrations les plus élevées. Les différences entre les extraits de propolis et le contrôle sont statistiquement significative aux concentrations 25, 50 et 75 mg/mL. L'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Ferdjiwa (EA5) est l'extrait le plus actif avec une valeur de EC50 de 32 mg/mL. Cependant, l'extrait méthanolique de la même propolis (E5) et l'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oum tboul (PE1) montent une activité modérée avec des valeurs de EC50 de 56 et 52 mg/mL respectivement. Enfin, l'extrait chloroformique de la propolis de wad sabt (C13) est le moins active avec EC50 de 59 mg/mL.

La viabilité des cellules en présence des différents extraits de propolis est représentée dans la figure 19.



PE1 : extrait d'éther de pétrole de propolis1 (Oum tboul).

C13 : extrait chloroformique de propolis3 (Owadsabt).

EA5 : extrait acétate d'éthyle de propolis5 (Ferdjiwa).

ME5 : extrait Méthanolique de propolis5 (Ferdjiwa).

**Figure 19 :** Cytotoxicité des extraits de propolis sur les cellules Caco-2 après 48 h de traitement

De nombreuses études sur la cytotoxicité des propolis Algériennes ont été réalisées. **Kebsa et al (2018)** ont rapporté que la propolis algérienne inhibait la croissance cellulaire et provoquait l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain chimio-résistantes.

La propolis turque présente un effet cytotoxique considérable sur les cellules tumorales mammaires MCF-7 (**Misir et al., 2020**) et la propolis de Bangkok sur les lignées cellulaires cancéreuses cervico-faciales métastatiques HNSCC (**Utispan et al., 2017**).

### **III-4- Analyse par chromatographie en phase liquide ultraperformante avec ionisation électro spray couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-ESI-MS/MS)**

Parmi les propolis testées, les propolis d'Oumtboul (propolis 1), Ouadsabt (propolis 3), et Ferdjiwa (propolis 5) ont démontré une activité antibiofilm très intéressante. Les extraits éther de pétrole, chloroformique, acétate d'éthyle et méthanolique étant les plus actifs. Ces extraits ont été analysés par Chromatographie en phase liquide ultraperformante avec ionisation électro spray couplée à la spectrométrie de masse en tandem (**UPLC-ESI-MS/MS**).

Un total de trente composés ont été utilisés comme standards pour l'identification des composés phénoliques des différents extraits de propolis: pyrogallol, acide homogentisique, acide 3,4-dihydroxybenzoïque, acide gentisique, pyrocatechol, galanthamine, acide *p*-hydroxy benzoïque , 3,4-dihydroxybenzaldéhyde, catéchine hydrate, acide vanillique, acide cafféique, acide syringique, vanilline, acide *p*-coumarique, acide férulique , épicatechine, catéchine gallate, rutine, acide trans-2-hydroxy cinnamique, myricétine, resvératrol, acide trans-cinnamique, lutéoline, quercétine, naringénine, génistéine, apigénine, kaempférol, hespéridine, et chrysine.

Les extraits testés sont : l'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1), l'extrait chloroformique de la propolis d'Ouadsabt (C13) et les extraits d'acétate d'éthyle et méthanolique de la propolis de Ferdjiwa (EA5, ME5). Les résultats de l'analyse UPLC-ESI-MS/MS sont rassemblés dans **le tableau 17**.

Tableau 17 : Analyse UPLC-ESI-MS/MS des extraits de propolis (µg /g)

Les composées	PE1	EA5	ME5	CI3
Pyrogallol	2,08 ± 0,12	ND	ND	3,12 ± 0,54
Acide Homogentisique	102,53 ± 1,02	1324,19 ± 10,77	1964,07 ± 10,53	2425,21 ± 9,56
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	252,23 ± 9,71	775,50 ± 12,52	985,35 ± 21,34	1002,14 ± 10,06
Acide gentisique	332,04 ± 10,41	3523,70 ± 19,56	6185,05 ± 20,46	5320,44 ± 9,32
Pyrocatechol	5,07 ± 0,98	175,20 ± 9,11	321,10 ± 10,57	235,01 ± 10,03
Galanthamine	ND	ND	ND	ND
Acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque	112,41 ± 1,57	2104,50 ± 6,75	3634,24 ± 8,57	1998,22 ± 10,11
3,4-dihydroxybenzaldéhyde	88,57 ± 5,58	1237,41 ± 9,57	541,40 ± 10,36	987,23 ± 10,47
Catéchine hydrate	ND	ND	ND	ND
Acide Vanillique	198,63 ± 5,41	2260,12 ± 10,33	4607,12 ± 8,65	3542,74 ± 9,65
Acide Caféique	4427,19 ± 8,74	15502,33 ± 14,78	55445,07 ± 23,35	24544,07 ± 22,05
Acide syringique	254,20 ± 3,74	2085,04 ± 9,07	1007,11 ± 10,57	1887,54 ± 11,57
Vanilline	15,08 ± 1,49	328,09 ± 9,44	356,21 ± 9,67	443,74 ± 10,20
Acide <i>p</i> -coumarique	463,34 ± 12,84	7108,30 ± 11,03	12537,30 ± 10,54	4599,41 ± 9,56
Acide Férulique	19833,11±21,32	99639,12 ± 22,20	198655,27± 18,50	100623,54± 20,44
Epicatechine	ND	ND	ND	ND
Catéchine gallate	1,14 ± 0,23	ND	32,56 ± 2,41	ND
Rutine	88,56 ± 4,07	697,21 ± 3,40	945,52 ± 8,53	547,85 ± 8,78
Acide <i>trans</i> -2-hydroxy cinnamique	657,21 ± 8,07	2236,07 ± 4,52	10025,21 ± 32,41	4821,47 ± 8,05
Myricétine	43,09 ± 2,02	225,12 ± 4,71	235,47 ± 9,60	200,81 ± 5,40
Resvératrol	ND	ND	ND	ND
Acide <i>trans</i> -cinnamique	118,30 ± 0,85	258,12 ± 0,99	338,65 ± 5,87	311,10 ± 2,33
Lutéoline	32,17 ± 0,99	534,11 ± 10,74	1,23 ± 0,20	641,42 ± 7,37
Quercétine	85,36 ± 3,07	127,17 ± 2,41	303,07 ± 10,58	257,49 ± 9,61
Naringénine	354,28 ± 10,11	3337,09 ± 10,05	2990,10 ± 9,34	2200,24 ± 22,37
Génistéine	299,72 ± 4,52	907,05 ± 9,44	1008,41 ± 8,90	1027,47 ± 8,58
Apigénine	8,99 ± 1,03	228,55 ± 2,47	225,71 ± 9,32	198,85 ± 9,23
Kaempférol	1227,22 ± 10,74	2317,07 ± 10,32	1531,50 ± 10,21	2047,21 ± 12,65
Hespéridine	2,18 ± 0,44	ND	39,91 ± 3,54	18,55 ± 1,61
Chryisine	9,37 ± 0,98	100,44 ± 5,24	21,75 ± 3,05	57,30 ± 8,35

NB : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

ND : non détecté

PE1 : extrait éther de pétrole de la propolis 1 (Oumtboul)

CI3 : extrait chloroformique de la propolis3 (Ouadsabt)

EA5 : extrait acétate d'éthyle de la propolis 5 (Ferdjiwa)

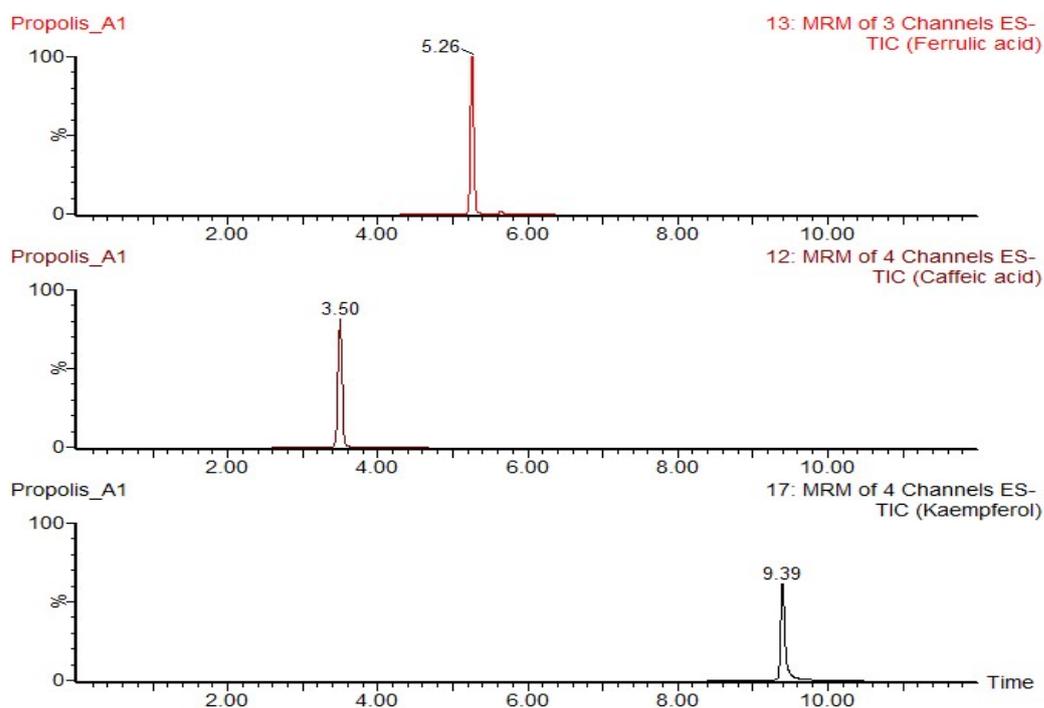
ME5 : extrait méthanolique de la propolis5 (Ferdjiwa)

La galantamine, l'epicatechine, l'hydrate de catéchine et le resvératrol n'ont pas été détectés dans tous les échantillons de propolis

La comparaison entre les différents extraits testés montre l'absence de galanthamine, catéchine hydrate, épicatechine et resvératrol dans l'ensemble des extraits. Le pyrogallol n'est présent que dans l'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1) et l'extrait chloroformique de la propolis d'Ouadsabt (Cl3). La Catéchine gallate n'est présente que dans l'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1) et l'extrait méthanolique de la propolis de Ferdjiwa (ME5). L'hésperidine n'est présente pas que dans l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Ferdjiwa (EA5).

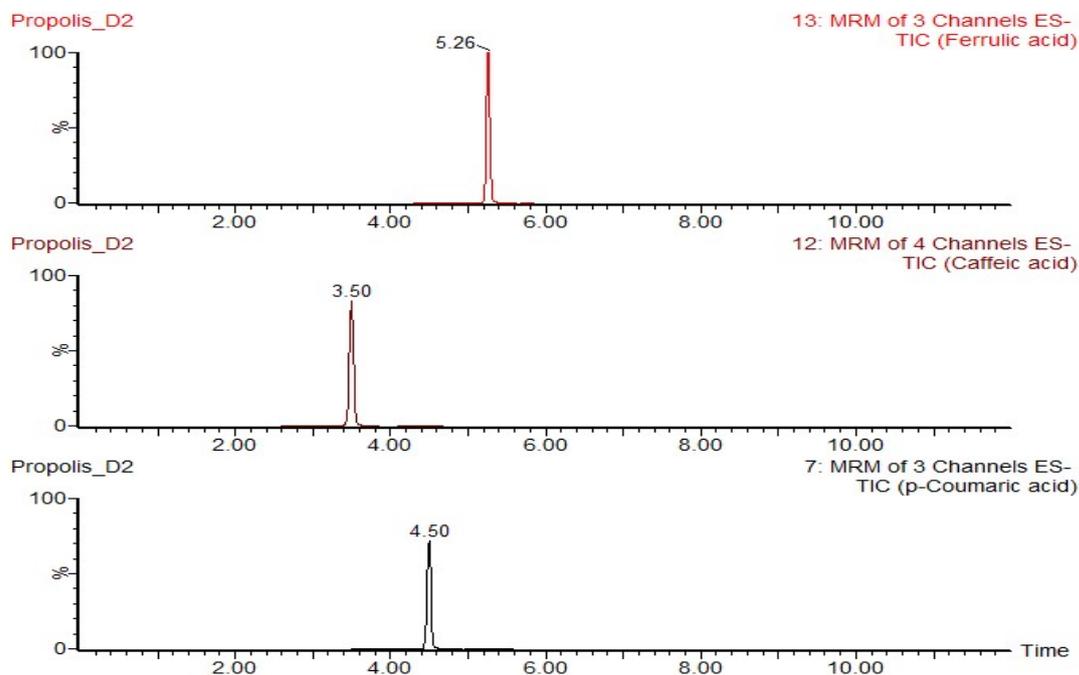
Nos résultats indiquent que la composition chimique des différents extraits varie qualitativement et quantitativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction et de la zone géographique de la propolis étudiée. Les principaux composés phénoliques détectés dans la présente étude sont : l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide gentisique, l'acide *p*-coumarique et le kampférol.

L'extrait éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1) contient majoritairement l'acide caféique avec une teneur  $(19833.11 \pm 21.32) \mu\text{g/g}$  suivi par l'acide férulique  $(4427.19 \pm 8.74) \mu\text{g/g}$  et enfin le kampférol  $(1227.22 \pm 10.74) \mu\text{g/g}$ .

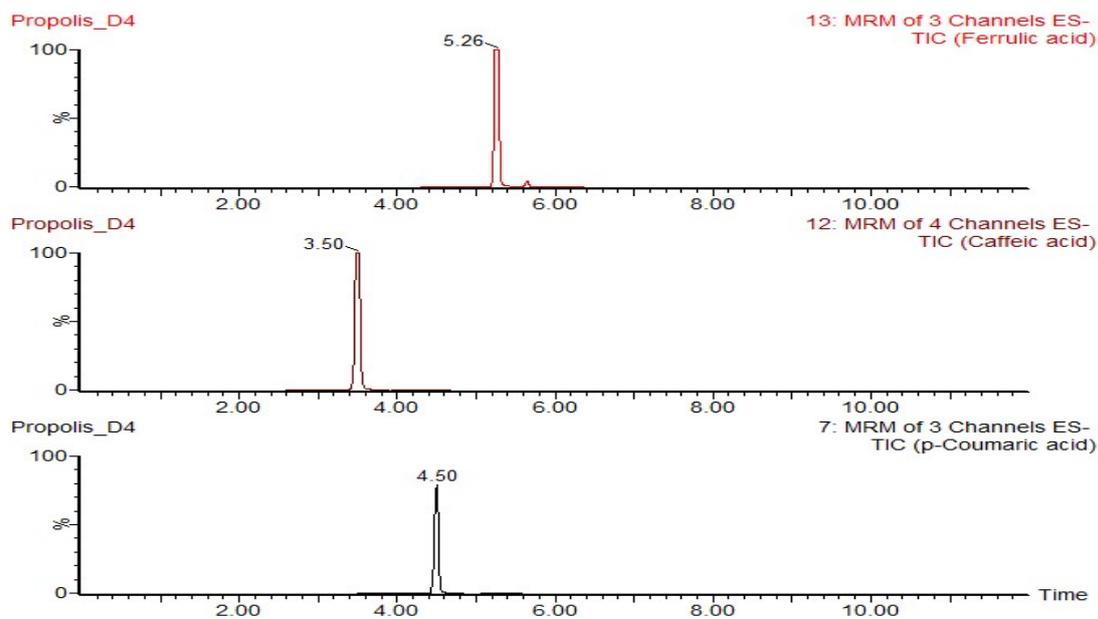


**Figure 20:** Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait PE1

L'extrait acétate d'éthyle (EA5) et méthanolique de la même propolis (ME5) sont plus riches en acide caféique, acide *p*-coumarique et en acide férulique. (**Figure 21, Figure 22**)

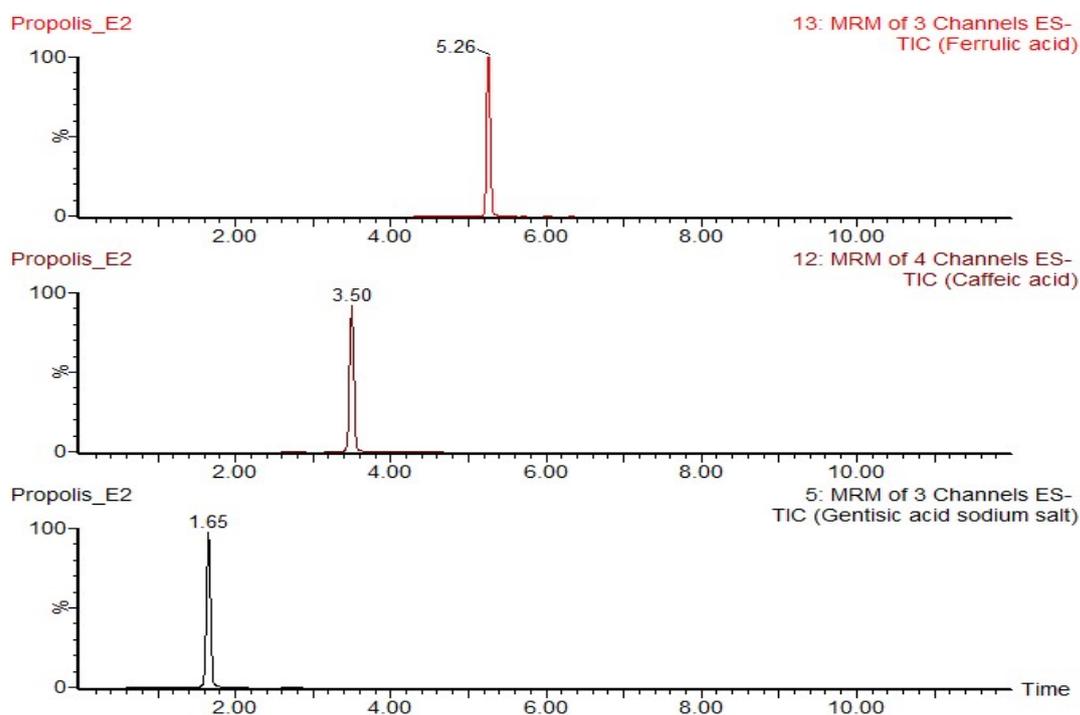


**Figure 21:** Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait EA5

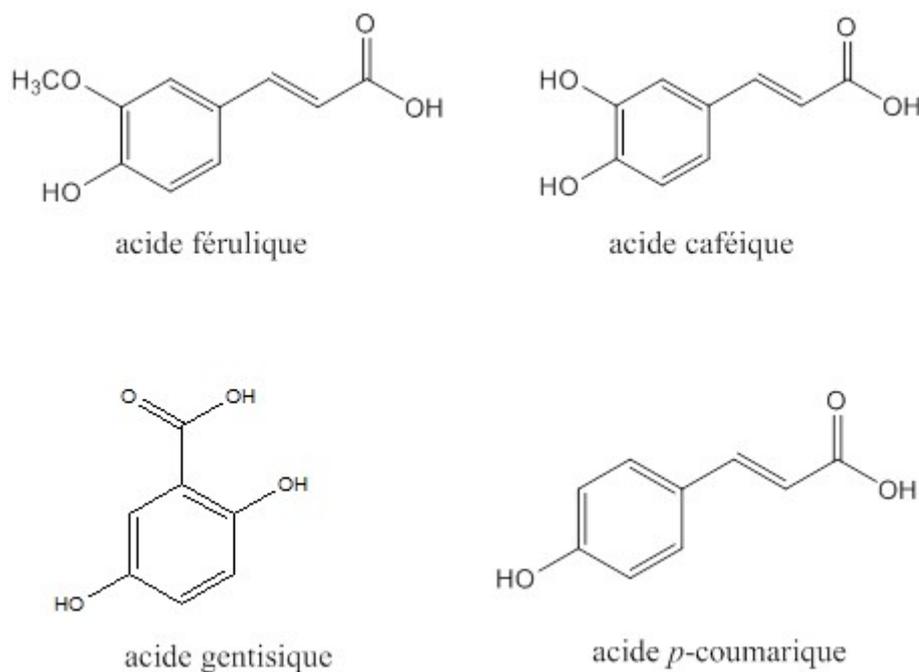


**Figure 22 :** Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait ME5

Enfin, l'extrait chloroformique de la propolis d'Ouadsabt CL3 est plus riche en acide caféique, acide férulique et acide gentisique (**Figure 23**).



**Figure 23:** Chromatogramme des principaux composés phénoliques présents dans l'extrait CL3



**Figure 24 :** les principaux composés phénoliques présents dans les extraits.

L'analyse ANOVA de nos résultats indique que l'origine géographique ainsi que le solvant utilisé lors de l'extraction influencent la composition chimique de la propolis en particulier sa composition en produits phénoliques. Les différences entre les produits identifiés ainsi que leurs teneurs sont statistiquement significative. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre les extraits acétate d'éthyle et méthanolique de la propolis de Ferdjiwa (EA5, ME5) pour l'acide syringique et le pyragallole. De plus, les extraits éther de pétrole de la propolis d'Oumtboul (PE1) et chloroformique de la propolis de wad sabb (C13) ne montrent aucune différence statistiquement significative pour le kaempferol et la génistéine.

Les composés majoritaires détectés et identifiés dans notre étude sont l'acide caféique et l'acide férulique. La teneur en acide férulique est six fois plus élevée que celle de l'acide caféique avec des concentrations de  $100.62 \pm 0.02$  mg/g pour C13 et  $19.83 \pm 0.02$  mg/g pour PE1. Par contre l'acide caféique ne représente que  $24.54 \pm 0.02$  mg/g pour C13 et  $4.427 \pm 0.008$  mg/g pour PE1.

Cette partie de notre travail avait pour but de comparer la composition chimique des propolis les plus actives sur l'irradiation du biofilm afin d'identifier les composés bioactifs. Ces propolis sont très riches en acide caféique et acide férulique qui sont considérés comme les composés majoritaires des propolis étudiées. Nos résultats suggèrent que ces composés pourraient être responsables de l'irradiation du biofilm.

De plus, les extraits testés sont plus actifs sur les souches standards de *S. aureus* et celles résistantes à la méthicilline (MRSA 10-1, 18-3, and 20-1). Il est fortement probable que les extraits de propolis avec des concentrations élevées en acide caféique et en acide férulique soient les plus actives sur l'inhibition du biofilm formé par les souches de staphylocoque. De nombreuses études ont rapporté que les acides caféique et férulique sont des composés bioactifs (Mirzoeva et al., 1997; Castaldo & Capasso, 2002; Veloz et al., 2015; El-Guendouz et al., 2016).

La propolis est considérée comme un puissant anti-staphylocoque. Son mécanisme d'action est jusqu'à présent inconnu. Selon de nombreuses études, la propolis inhibe la coagulase, l'un des facteurs de virulence du staphylocoque. La propolis réduit aussi la lipase (Scazzocchio et al., 2006).

La composition chimique des propolis étudiées indique que ces propolis sont de type peuplier. Bankova et al (2005) ont montré que les propolis riches en composés phénoliques tels que les flavones, flavonols, flavanones et dihydroflavonols

appartiennent à cette classe de propolis. Nos travaux sont en accord avec les travaux de **Piccinelli et al (2013)** qui ont confirmé la présence de ce type de propolis en Algérie. Nos analyses UPLC-ESI-MS/MS réalisés sur différents propolis algérienne ont détecté la présence des marqueurs chimiques de ce type de propolis. Tels que : la chrysine, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique...etc.

En raison de la faible quantité des extraits de ces propolis, nous avons choisi deux autres propolis pour continuer notre travail. Ces propolis sont aussi collectées de l'est algérien des wilaya de Mila (propolis 6) et de Skikda (propolis 7).

Dans cette partie de notre travail nous nous sommes intéressés à l'étude comparative des propolis citées précédemment. Cette comparaison est réalisée en fonction de leur profil chimique représenté par le taux des polyphénols et des flavonoïdes et leurs activités antioxydante et anticancéreuse.

### III-5- Étude de l'activité antioxydante

Cinq méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits chloroformique, acétate d'éthyle et méthanolique des deux propolis testées. Cette étude nous permettra de sélectionner les extraits les plus actifs pour des études plus approfondies.

#### III-5-1-Test de l'activité antiradicalaire au DPPH

Les résultats de l'activité antiradicalaire au DPPH sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (**Tableau 18, Figure 25**).

Les résultats illustrés dans le tableau 18 et la figure 25 montrent que les différents extraits présentent une activité antiradicalaire importante. L'ensemble des extraits étudiés ont éliminés presque 90% des radicaux libres, à l'exception des extraits chloroformique qui sont moins actifs par rapport aux valeurs des standards BHA et BHT (**Tableau 18, Figure 25**).

**Tableau 18 : Valeurs des IC50 des extraits de la propolis par le test DPPH**

Extrait	IC50 µg/mL(DPPH)
CI6	>200
AE6	46,35±0,88
ME6	20,17±1,14
CI7	>200
AE7	164,29±1,33
ME7	58,54±1,35
BHT	22,32±1,19
BHA	5,73±0,41

**NB :** les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

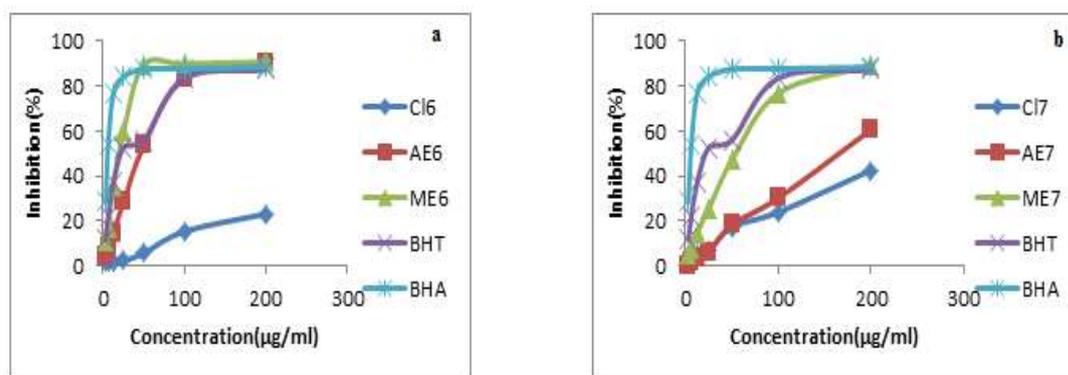
Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zones géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7),

PE: extrait éther de pétrole

CI : extrait chloroformique

AE : extrait acétate d'éthyle

ME : extrait méthanolique



a : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Mila

b : Inhibition du radical DPPH par la propolis de Skikda

**Figure 25** : Courbes d'inhibition du radical DPPH par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations

Les IC<sub>50</sub> des différents extraits testés varient significativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction. Les extraits méthanolique et acétate d'éthyle de la propolis de Mila sont les plus actifs avec des valeurs de  $20.17 \pm 1.14$  µg/mL et  $46,35 \pm 0,88$  µg/mL respectivement, suivi par l'extrait méthanolique de la propolis de Skikda avec des IC<sub>50</sub> de  $58.54 \pm 1.35$  µg/mL. Les extraits chloroformiques montrent la plus faible activité. Le BHA et le BHT utilisé comme standard dans ce travail ont montré une activité anti-radicalaire puissante avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $5.73 \pm 0.41$  et  $22.32 \pm 1.19$  µg/mL respectivement.

Nos résultats indiquent que la propolis de Mila présente l'activité antiradicalaire la plus intéressante avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> allant de  $20.17 \pm 1.14$  à  $46,35 \pm 0,88$  µg/mL. Ces valeurs sont très proche de celle du standard BHT (IC<sub>50</sub> =  $22.32 \pm 1.19$  µg/mL).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Bittencourt et al (2015)** qui ont reporté des valeurs d'IC<sub>50</sub> entre 21.50 et 78.77 µg/mL pour une propolis Brésilienne. Par contre, nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par **Hochheim et al (2019)**. Les IC<sub>50</sub> obtenues été de  $151.37 \pm 7.9$  µg/mL,  $311.47 \pm 8.2$  µg/mL,  $588.8 \pm 0.0$  µg/mL et  $> 1000$  µg/mL pour les extraits méthanol, acétate d'éthyle, butanol et dichlorométhane d'une propolis collectée du Brésil.

III-5-2- Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS

Les résultats de l'activité antiradicalaire à l'ABTS sont représentés par les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (Tableau 19, Figure 26).

Tableau 19 : Valeurs des IC50 des extraits de la propolis par le test ABTS

Extrait	IC50 µg/mL(ABTS)
Cl6	21.63±0.77
AE6	14.57±0.27
ME6	7.35±0.43
Cl7	80.42±2.87
AE7	62.42±2.04
ME7	21.44±1.41
BHT	1.29±0.30
BHA	1.81±0.10

NB : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

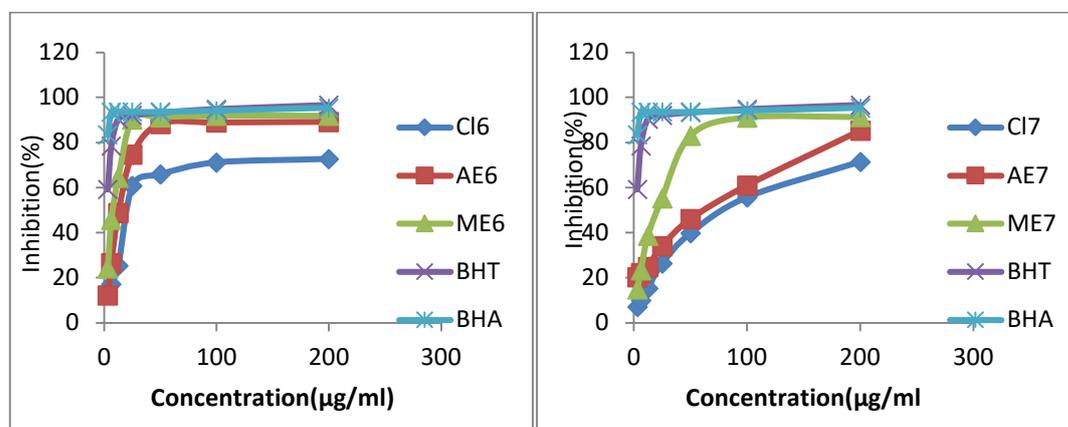
PE: extrait éther de pétrole

Cl : extrait chloroformique

AE : extrait acétate d'éthyle

ME : extrait méthanolique

Skikda)



a : Inhibition du radical ABTS par la propolis de Mila

b: Inhibition du radical ABTS par la propolis de Skikda

Figure 26 : Courbes d'inhibition du radical ABTS par les différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations

Les extraits de la propolis de Mila ont montré une meilleure activité inhibitrice du radical ABTS<sup>•+</sup>, en comparaison avec les extraits de la propolis de Skikda. Les IC50 obtenues (tableau 19) varient entre 7.35±0.43 et 80.42±2.87 µg/mL. L'extrait

méthanolique de la propolis de Mila représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de  $7.35 \pm 0.43$   $\mu\text{g/mL}$  suivi par les extraits acétate d'éthyle et l'extrait chloroformique avec des IC50 de  $14.57 \pm 0.27$  et  $21.63 \pm 0.77$   $\mu\text{g/mL}$  respectivement.

### III-5-3-Test du blanchissement du $\beta$ -carotène

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 20. Les valeurs des IC50 des différents extraits varient de  $8.92 \pm 1.39$  et  $76.94 \pm 3.21$   $\mu\text{g/mL}$ . Les extraits de la propolis de Mila ont montré une meilleur activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène, en comparaison avec les extraits de la propolis de Skikda. Parmi les extraits testés l'extrait chloroformique de la propolis de Mila représente la meilleure activité.

**Tableau 20** : Activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène par les extraits de deux propolis

Extrait	IC50 $\mu\text{g/mL}$ ( $\beta$ -carotène)
<b>CI6</b>	$8,92 \pm 1,39$
<b>AE6</b>	$35,73 \pm 0,19$
<b>ME6</b>	$8,94 \pm 0,04$
<b>CI7</b>	$76,94 \pm 3,21$
<b>AE7</b>	$73,34 \pm 0,22$
<b>ME7</b>	$56,72 \pm 1,67$
<b>BHT</b>	$1,05 \pm 0,01$
<b>BHA</b>	$0,90 \pm 0,02$

**NB** : les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3)

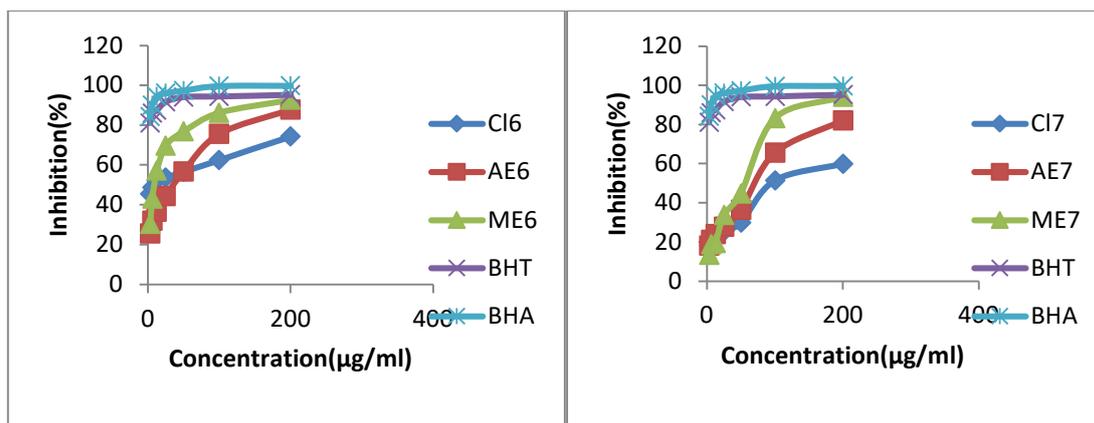
Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

PE: extrait éther de pétrole

Cl : extrait chloroformique

AE : extrait acétate d'éthyle

ME : extrait méthanolique



a : la propolis de Mila  
 b: la propolis de Skikda

**Figure 27 :** Courbes d’absorbance du test du blanchissement du  $\beta$ -carotène des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations

L’activité varie en fonction du solvant utilisé ainsi que la région géographique de la propolis étudiée. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Bouaroura et al (2021)**. Les valeurs des IC50 des différents extraits varient de  $7.53 \pm 0.30$  à  $85.79 \pm 1.46$   $\mu\text{g/mL}$ .

### III-5-4- Test de la Réduction du cuivre (CUPRAC)

La propolis de Mila est plus active et ceux pour l’ensemble des extraits testés. L’extrait méthanolique de la propolis de Mila présente une bonne activité ( $A_{0.5} = 12.60 \pm 0.67$   $\mu\text{g/mL}$ ), en comparaison avec le standard BHT ( $A_{0.5} = 9.62 \pm 0.87$   $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tableau 21: Valeurs A0.5 des extraits de la propolis par le test CUPRAC**

Extrait	A0.5 $\mu\text{g/mL}$ (CUPRAC)
CI6	120,18 $\pm$ 1,69
AE6	26,64 $\pm$ 0,74
ME6	12,60 $\pm$ 0,67
CI7	108,05 $\pm$ 0,69
AE7	74,87 $\pm$ 0,78
ME7	39,50 $\pm$ 0,41
BHT	9,62 $\pm$ 0,87
BHA	3,64 $\pm$ 0,19

**NB :** les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3)

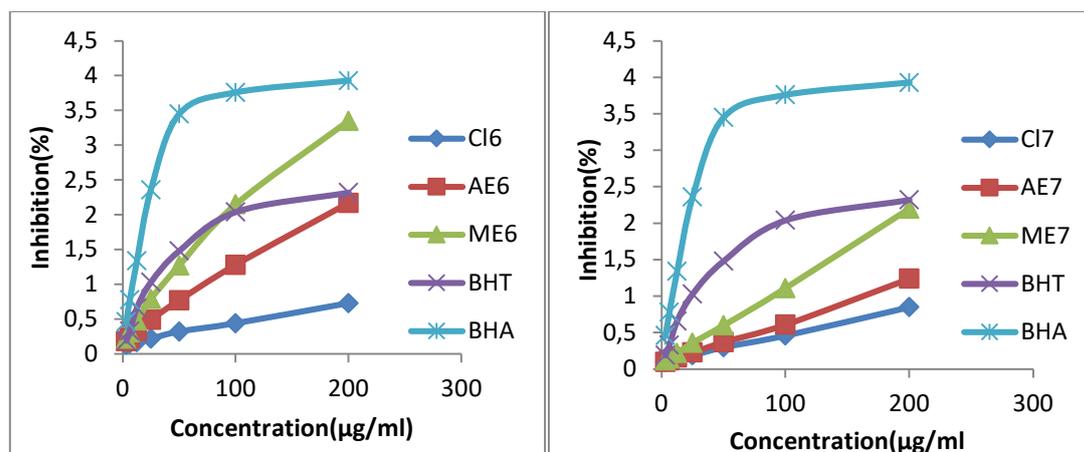
Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

PE: extrait éther de pétrole

Cl : extrait chloroformique

AE : extrait acétate d’éthyle

ME : extrait méthanolique



a : la propolis de Mila  
 b: la propolis de Skikda

**Figure 28 :** Courbes d’absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test CUPRAC

### III-5-5-Test de la réduction du Fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le tableau 22 représente la variation du pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits de la propolis étudiée. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus pour les quatre tests précédents. L’activité varie en fonction du solvant utilisé ainsi que la région géographique de la propolis étudiée. Les différences entre les extraits étudiés sont significatives.

**Tableau 22 : Valeurs IC50 des extraits de la propolis par le test FRAP**

Extrait	IC50 µg/mL (FRAP)
CI6	>200
AE6	66,73±2,99
ME6	28,74±1,26
CI7	>200
AE7	160,33±2,35
ME7	159,46±0,41
BHT	>50
BHA	8,41±0,67
Asc Acid	9,01±1,46

**NB :** les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

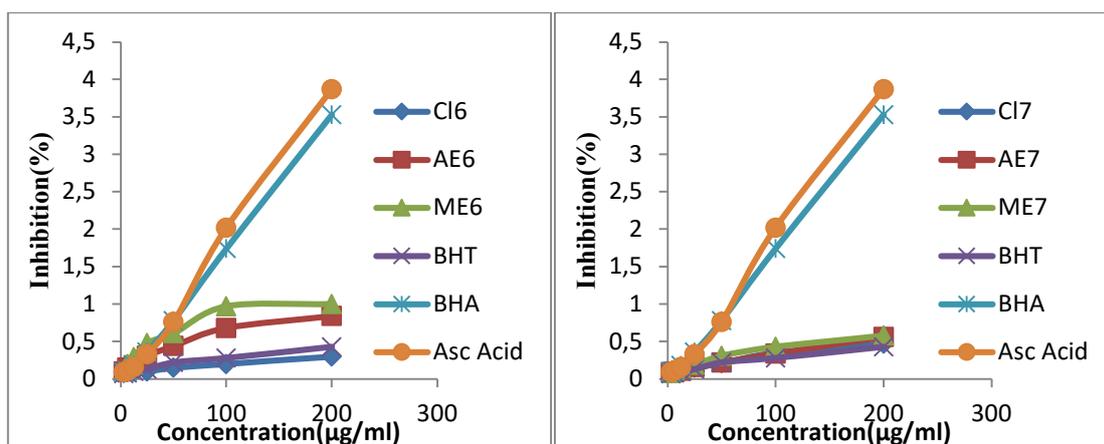
Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

PE: extrait éther de pétrole

Cl : extrait chloroformique

AE : extrait acétate d’éthyle

ME : extrait méthanolique



a : la propolis de Mila  
b: la propolis de Skikda

**Figure 29 :** Courbes d’absorbance des différents extraits de propolis en fonction de leurs concentrations pour le test FRAP

La propolis de Mila est plus active et ceux pour l’ensemble des extraits testés. L’extrait méthanolique de la propolis de mila avec une IC50 de  $28,74 \pm 1,26 \mu\text{g/mL}$  est proche de ceux rapportés par **Pratami et al (2018)** qui ont évalué l’activité antioxydante de l’extrait éthanolique de la propolis indonésienne. Les IC50 varient entre 26.41 et 34.62  $\mu\text{g/mL}$  pour le test FRAP.

### III-6-Dosage de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Les teneurs en composés phénoliques (TPC) et en flavonoïdes (TFC) ont été calculées à partir des courbes d’étalonnage ( $y=0,0051x \text{ [EGA]} +0,1731$ ;  $R^2 = 0,9964$ ) et ( $y=0,0066x \text{ [EQ]} - 0,0063$  ;  $R^2 = 0,9988$ ) et exprimées en mg équivalent d’acide gallique et mg équivalent de quercétine par 1g d’extrait de propolis (EAG mg/ g et EQ mg/g) respectivement (**Figure 30 et 31**).

La courbe d’étalonnage de l’acide gallique et de la quercétine sont représentées dans les figures ci-dessous :

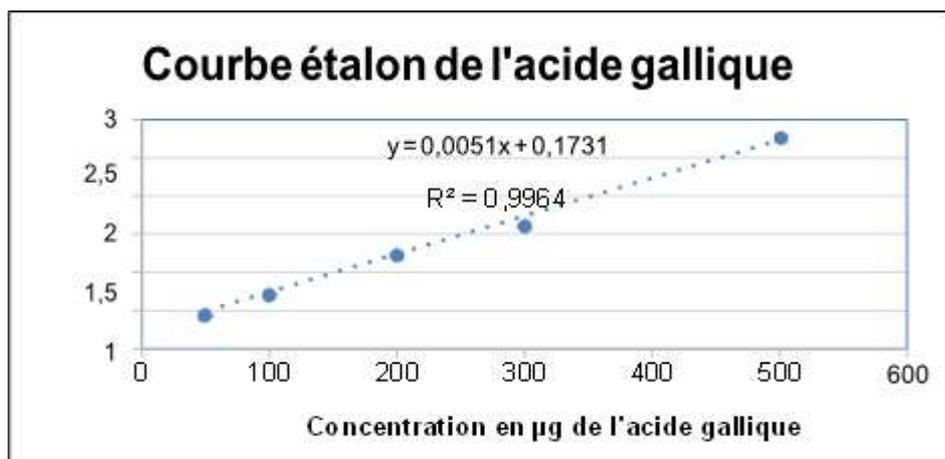


Figure 30: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

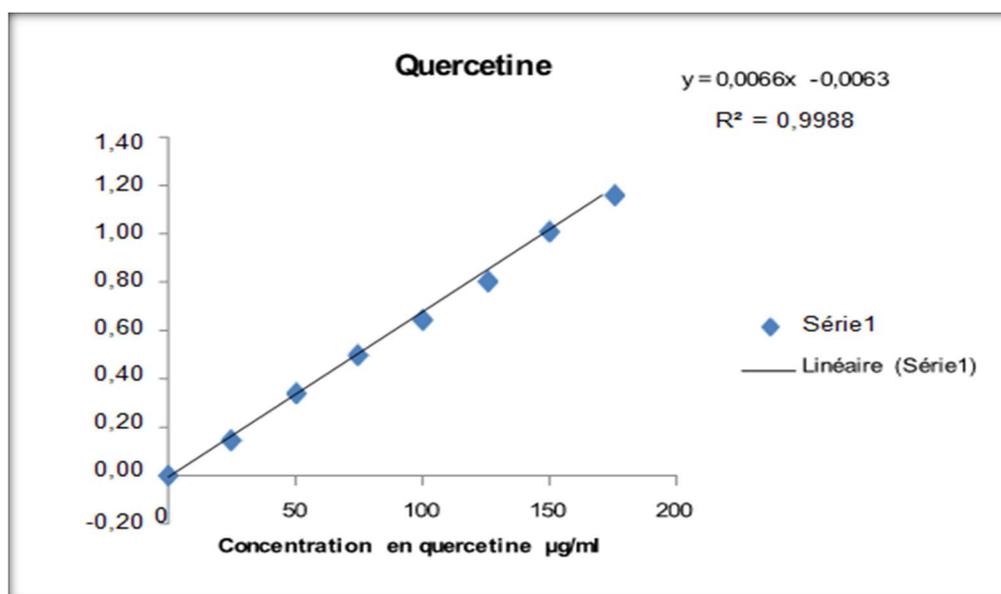


Figure 31: Courbe d'étalonnage de quercétine

Tableau 23 : Teneur en flavonoïdes et en polyphénols

Les extraits	Total polyphénols (mg/mL)	Total flavonoïdes (mg/mL)
PE6	5,36±1,14	0,38±0,41
Cl6	79,16±2,66	16,25±0,21
AE6	119,94±4,83	60,34±1,39
ME6	187,16±4,83	63,53±1,28
PE7	1,36±0,15	0,08±0,10

CI7	35,25±2,14	7,92±0,21
AE7	60,96±2,15	21,25±0,53
ME7	97,85±2,98	33,22±1,17

**NB** : les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3)

Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

PE: extrait éther de pétrole

CI : extrait chloroformique

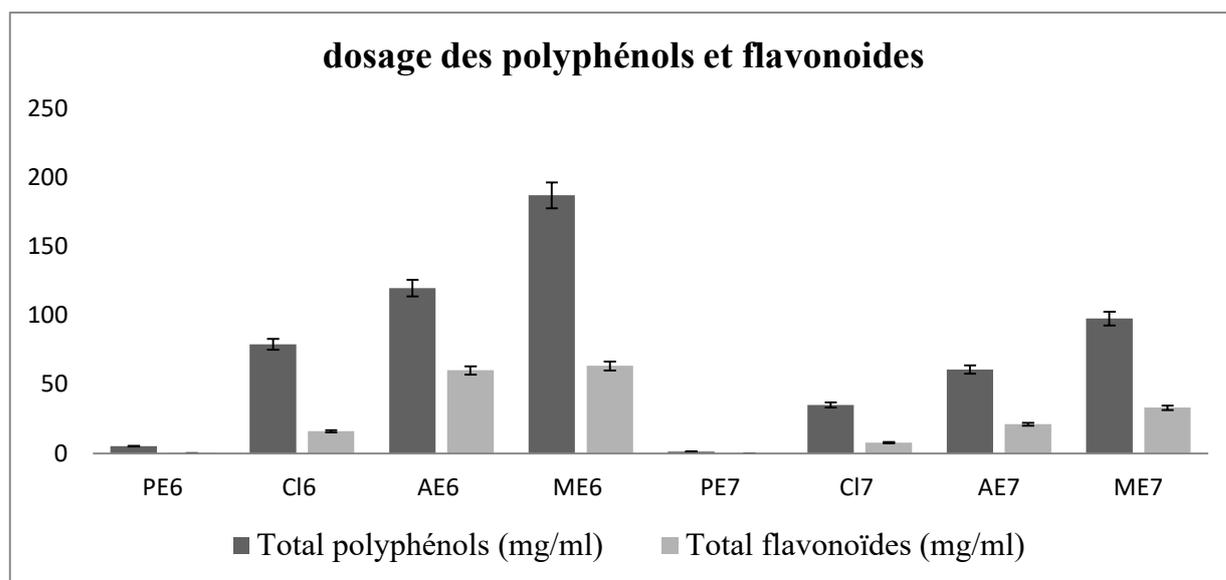
AE : extrait acétate d'éthyle

ME : extrait méthanolique

Les résultats (**Tableau 23**) obtenus varient entre  $1.36 \pm 0.15$  et  $187,16 \pm 4,83$  mg EGA/ g pour le TPC et entre  $0.08 \pm 0.10$  et  $63.53 \pm 1,28$  mg EQ / g pour le TFC. L'extrait éther de pétrole de la propolis de Skikda montre la teneur la plus faible. Comparé aux autres extraits testés l'extrait méthanolique de la propolis de Mila montre une meilleure richesse en polyphénols et en flavonoïdes. Les TPC et TFC des différents extraits testés ont diminué dans l'ordre suivant : extrait méthanolique > extrait acétate d'éthyle > extrait chloroformique > extrait éther de pétrole.

Concernant l'influence de la zone géographique sur les TPC et TFC étudiés. Nos résultats indiquent que les différences sont significatives. Les extraits de la propolis de Mila présentent des teneurs largement supérieures aux teneurs de la propolis de Skikda (**Figure 32**).

Notre étude indique que les TPC et TFC varient significativement en fonction du solvant utilisé lors de l'extraction et de la zone géographique de la propolis récoltée.



Les propolis testées sont récoltées à partir de différentes zone géographiques : Mila (propolis 6) et Skikda (propolis 7).

**Figure 32 : Dosage des flavonoïdes et des polyphénols**

La comparaison des teneurs en polyphénols totaux des extraits chloroformique, acétate d'éthyle et méthanolique des propolis testées avec celles rapportées dans la littérature montre qu'elles sont plus élevées que ceux rapportés par Rebiai et al, (2014) pour la propolis collectée de Khenchla et Ghardaia, respectivement (14,23 - 4,93 GAE  $\mu\text{g} / \text{mg}$  et 3,45 à 1,94 QE  $\mu\text{g} / \text{mg}$ ), et **Segueni et al (2017)** (0.81 $\pm$ 0,16- 8.97 $\pm$ 0.25 GAE mg/g et 0.57  $\pm$  0.01-3.53 $\pm$ 0.84 QE mg/g) pour la propolis collectée de Beni Belaid. Par contre, nos résultats sont inférieures à ceux rapportés par **Kumazawa et al (2004)** **Ahn et al (2007)** pour les échantillons chinois prélevés à Hebei (302 GAE  $\mu\text{g} / \text{mg}$  et 299 GAE  $\mu\text{g} / \text{mg}$ ). Nos résultats sont très proche de ceux rapportés par **Moreira et al (2008)** pour la propolis collectée dans la région de Fundão au Portugal (151,00 GAE  $\mu\text{g} / \text{mg}$ ) et **Choi et al (2006)** pour la propolis coréenne collectée à Yeosu (212,7 GAE  $\mu\text{g} / \text{mg}$ ).

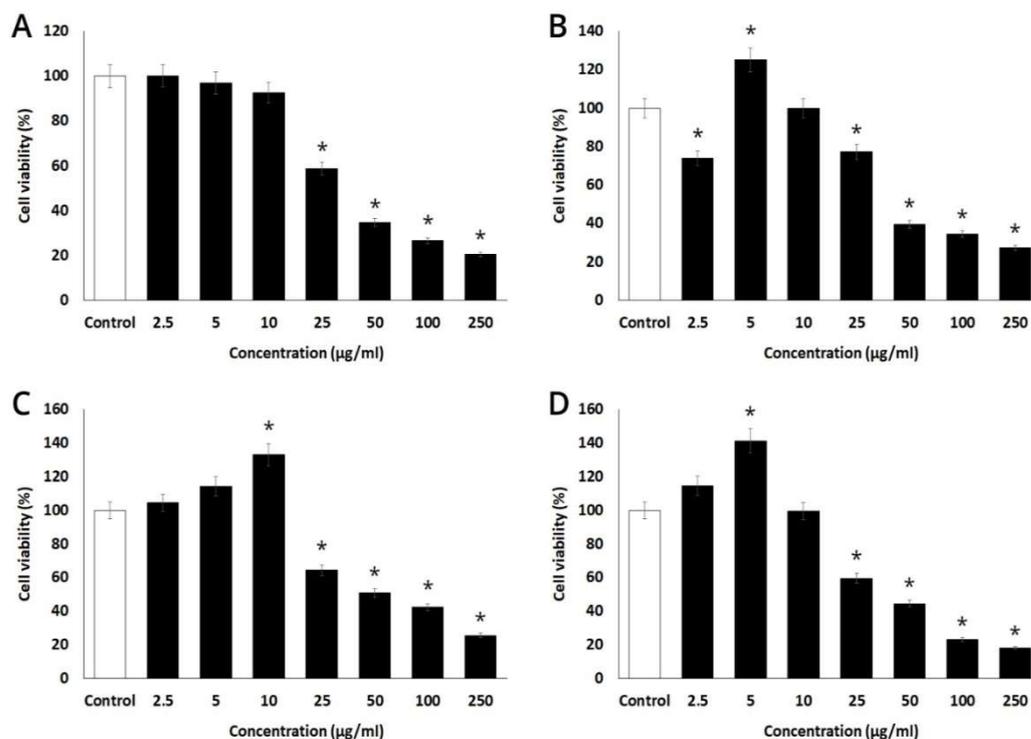
### III-I-6-L'activité cytotoxique :

L'effet cytotoxique des différents extraits de propolis de Mila a été déterminé sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 à l'aide du test MTT.

Les cellules ont été exposées à des concentrations croissantes des extraits testés allant de 2,5 à 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant 24 heures. Les extraits ont montré une activité cytotoxique sur les cellules MDA-MB-231 de manière dose-dépendante. Les valeurs EC50 varient entre 97 et 117  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figure 33**). L'extrait acétate d'éthyle représente l'extrait le plus actif avec une EC50 de 97  $\mu\text{g}/\text{mL}$  suivi par les extraits chloroformique, éther de pétrole et méthanolique.

Nos résultats sont conformes à ceux rapportés dans la littérature. **Xuan et al (2014)** ont étudié la sensibilité des cellules MCF-7 (la lignée de cellules tumorales mammaires) et MDA-MB-231 de l'extrait éthanolique d'une propolis collectée de Chine à 25, 50, 100 et 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La propolis testée inhibe significativement les cellules MDA-MB-231 de manière dose-dépendante et temp-dépendante. Les mêmes résultats ont été rapportés par **Milošević-Dorđević et al (2015)** pour deux échantillons de propolis serbes. De plus, l'extrait DMEM (milieu d'aigle modifié de Dulbecco) d'une propolis turque a également été testé sur la cytotoxicité, la prolifération et la motilité latérale dans des cellules MDA-MB-231. L'activité antiproliférative la plus élevée a été démontrée à 10 mg/mL pendant 24 et 72 h (**Uçar & Değer, 2019**).

**Brihoum et al (2018)** ont étudié l'effet inhibiteur d'un extrait éthanolique d'une propolis algérienne (EEP) sur la prolifération des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549). L'extrait testé a démontré un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules A549 à 24 et 72 heures de manière dose-dépendante.



**Figure 33 : Cytotoxicité des extraits de propolis sur les cellules MDA-MB-231**

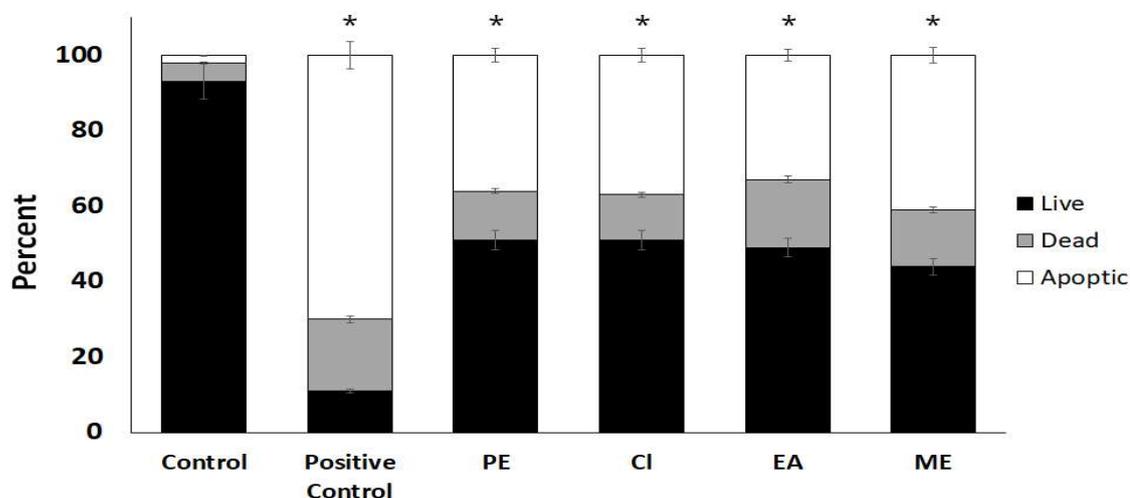
A: éther de pétrole    B: chloroforme    C: acétate d'éthyle    D: méthanol

### III-I-6-1-Mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP :

Dans le but de confirmer que la mort cellulaire induite par la propolis est de nature apoptotique et après traitement des cellules, un marquage par l'annexine V-EGFP suivie d'une analyse des cellules par cymomètre Arthur sont réalisés. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé comme contrôle positif pour l'apoptose.

Les résultats obtenus (**figure 34**) ont montré une augmentation significative des cellules apoptotiques. Le rapport de la population de cellules apoptotiques dans les cellules traitées était près de 6 à 10 fois plus élevé que la population des cellules contrôles. Nos résultats ont montré que les extraits de propolis provoquaient

l'apoptose et avaient un effet cytotoxique. De plus, dans toutes les cellules traitées, il y avait une diminution statistiquement significative du pourcentage de cellules vivantes. Nos résultats sont conformes aux recherches antérieures sur la propolis chinoise. **Xuan et al (2014)** ont analysé les effets de l'extrait éthanolique d'une propolis collectée de Chine sur l'annexine A7 (ANXA7), P53, les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène, NF- $\kappa$ B, p65 et le potentiel de membrane mitochondriale dans les cellules MCF-7 (lignée de cellules tumorales mammaires) et MDA-MB-231 (lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein). La propolis testée a causé une induction de l'expression d'ANXA7, du niveau de NF  $\kappa$ B, p65 et de ROS.



NB : les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (n=3)

PE: extrait éther de pétrole  
AE : extrait acétate d'éthyle

CI : extrait chloroformique  
ME : extrait méthanolique

**Figure 34 : Analyse de l'apoptose d'extraits de propolis de Mila par cytomètre à base d'images**

L'effet de régulation et d'inhibition des composés phénoliques sur le cycle cellulaire a été rapporté par certains chercheurs (**Popolo et al., 2009 ; Anantharaju, et al., 2016 ; Sánchez-Carranza et al., 2017**). Par exemple, la propolis chinoise a augmenté les protéines associées à la suppression tumorale p21CIP1 (inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1 ou protéine 1 interagissant avec CDK) et p53 dans la lignée cellulaire HCT116 (lignée cellulaire du cancer du côlon humain) et a induit l'apoptose (**Ishihara et al., 2009**). De même, une propolis d'origine turque a augmenté le niveau de protéines associées aux gènes P53, Bax et P21 (CDKN1A)

dans la lignée cellulaire du cancer du sein (MCF-7) et son activité a également été confirmée par western blot (**Misir et al., 2019**). Une propolis collectée du Japon a induit l'apoptose dans la lignée cellulaire de lymphome humain (**Motomura et al., 2008**).

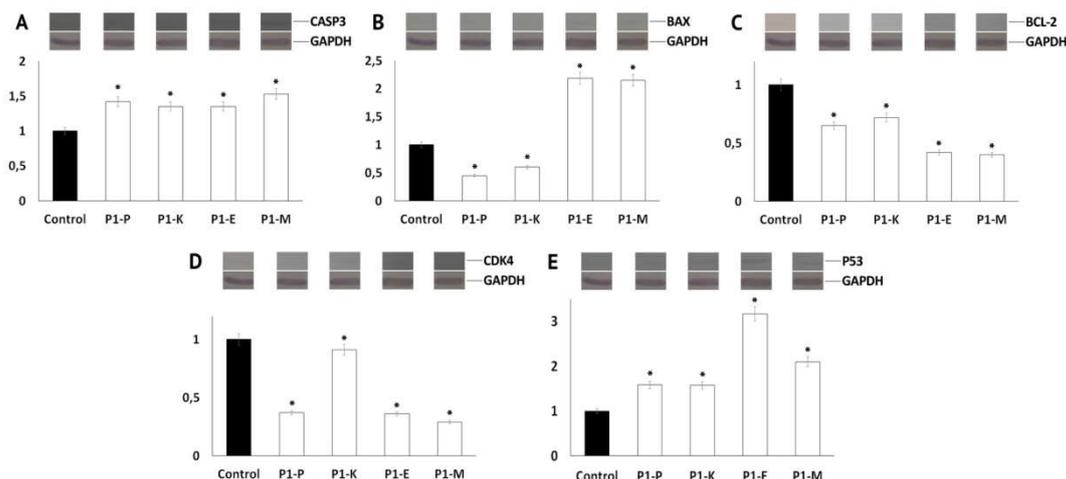
### III-I-6-2-Analyse par électrophorèse sur gel (western blot) :

L'analyse Western blot a été réalisée pour déterminer l'effet de la propolis au niveau des protéines impliquées dans l'apoptose et le cycle cellulaire.

Les résultats (**figure 35**) de l'analyse de la densitométrie du niveau des protéines Caspase 3 ont montré une augmentation significative de 1,42, 1,35, 1,35 et 1,53 fois dans les extraits PE, Cl, EA et ME respectivement ( $p < 0,05$ ) par rapport au contrôle. L'expression de Bax par contre dépend de l'extrait testé avec une diminution de son expression de 2 et 1,69 fois pour les extraits PE et Cl et une augmentation de 2,19 et 2,15 fois pour les extraits EA et ME, respectivement.

Les résultats de l'analyse de la densitométrie de Bcl-2 (**Figure 35**) ont indiqué que l'expression de Bcl-2 était diminuée de 1,56, 1,44, 2,38 et 2,43 fois dans les extraits PE, Cl, EA et ME respectivement. Similaire aux résultats obtenus pour Bcl-2, le niveau de protéine CDK-4 a diminué de manière significative après le traitement aux différents extraits de propolis avec des valeurs de 2,86, 1,13, 2,85 et 3,44 fois. Contrairement aux autres protéines, le niveau de la protéine P53 a augmenté de manière significative dans les cellules traitées avec les extraits PE, Cl, EA et ME (1,58, 1,57, 3,17 et 2,1 fois, respectivement).

**Kebsa et al (2018)** ont démontré qu'une propolis algérienne provoquait une inhibition de la croissance cellulaire sur les cellules d'adénocarcinome pulmonaire résistant A549/DOX en raison de l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire. La voie apoptotique intrinsèque a été induite par le traitement de propolis en raison de l'induction des activités caspase-3 et 9. L'extrait éthanol d'une propolis algérienne a également réduit la prolifération des cellules d'adénocarcinome de la prostate humaine sensibles aux androgènes (LNCaP), en arrêtant le cycle cellulaire à G0/G1 et en induisant l'apoptose (**Zabaiou et al., 2019**).



**Figure 35: Effets des extraits de Propolis de Mila sur l'expression de Caspase3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53.**

### III-I-6-3-Isolation d'ARN<sub>m</sub>, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel :

Les effets du traitement de la propolis sur l'analyse de l'expression génique de Caspase3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53 ont été étudiés dans les cellules MDA-MB-231. Les résultats de la PCR en temps réel des niveaux d'ARN<sub>m</sub> sont illustrés dans la **(Figure 36)**.

Le niveau d'ARN<sub>m</sub> de la caspase3 a été augmenté de 1,49, 1,62, 10,41 et 28,44 fois dans les cellules traitées avec les extraits PE, CI, EA et ME par rapport au contrôle ( $p < 0,05$ ). Cependant, le niveau d'ARN<sub>m</sub> de Bax des extraits PE et de CI ont été diminués de 8,6 et 6,98 fois, respectivement. A l'inverse, les extraits PE et de ME ont augmenté le niveau d'ARN<sub>m</sub> de Bax de 1,34 et 3,91 fois. D'autre part, les niveaux d'ARN<sub>m</sub> de Bcl-2 ont été diminués de 2,08, 1,36, 1,81 et 3,63 fois suite aux différents traitements aux extraits de propolis. Le niveau d'ARN<sub>m</sub> de P53 a été augmenté de 2,27, 3,16, 11,79 et 24,16 fois en raison du traitement des extraits PE, CI, EA, ME ( $p < 0,05$ ). De plus, le niveau d'ARN<sub>m</sub> de CDK-4 a été aussi diminué de manière significative (5,02, 1,38, 2,79 et 1,34 fois, respectivement).

Nos résultats sont en contradiction avec ceux rapportés dans la littérature. La propolis cubaine a provoqué une diminution de l'expression des gènes liés à l'apoptose tels que Caspase3, P53, p21 et Bax dans les cellules MDA-MB-231. Alors que l'expression de Bcl-2, Bcl-XL, Noxa et Puma n'ont pas été modifiée **(Frión-Herrera et al., 2019)**. La propolis brésilienne a provoqué une réduction du potentiel de membrane mitochondriale dans les cellule d'adénocarcinome pulmonaire humain A549 par

surexpression de Bax et Noxa et suppression de Bcl-XL. Alors que le niveau d'expression des gènes p53, Caspase3, Bcl-2 est resté inchangé, l'expression de p21 a augmenté (Frión-Herrera et al., 2015).

Une propolis brésilienne et l'acide caféique ont également été testés sur des cellules de carcinome épidermoïde laryngé humain (HEp-2). Les deux produits induisent l'apoptose. Seule la propolis régule l'expression de P53. L'expression de la caspase-3 a été augmentée suite au traitement à la propolis et cela a été corrélé à l'induction de l'apoptose précoce et tardive provoquée par la propolis et à l'acide caféique (da Silva et al., 2017).

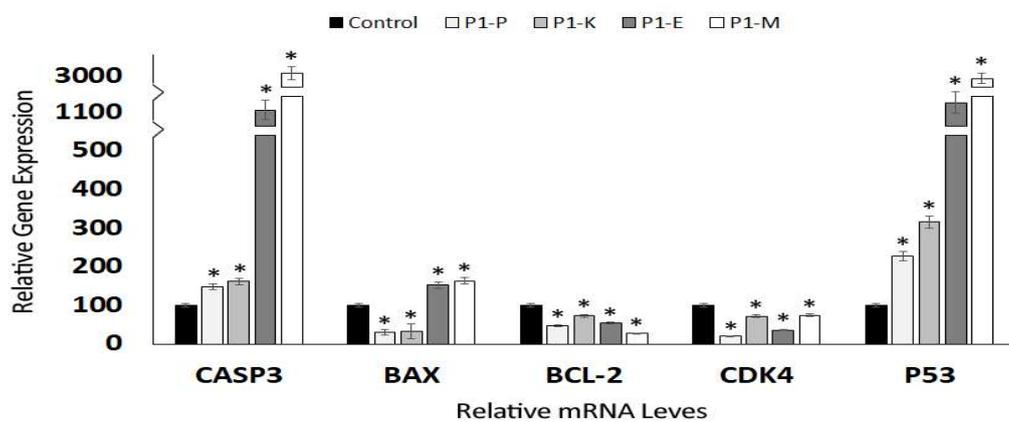


Figure 36: Expression des gènes Caspase3, Bax, Bcl-2, CDK-4 et P53 des cellules traitées et témoins.

### III-II-Étude phytochimique de la propolis de Mila

Les résultats des tests de l'activité antioxydante et cytotoxique nous ont permis de sélectionner la propolis la plus active (propolis de Mila). Pour la suite de notre travail nous avons choisi le bioguidage comme approche de recherche. Le bioguidage a été utilisé pour le choix des extraits qui vont subir une étude phytochimique. Par conséquent, seul les extraits chloroformique et acétate d'éthyle ont été étudiés.

Les composés isolés ont été identifiés par différentes analyses spectroscopiques (RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et UV-visible) et par comparaison avec la littérature. Cette étude a permis la séparation et l'identification de six composés.

#### III-II-1-Identification de produit isolé de l'extrait chloroformique :

##### III-II-1-1-Elucidation structurale du composé PCI34

Ce composé se présente sous forme de cristaux jaune. Le spectre UV-visible de ce composé présente dans le méthanol deux bandes d'absorption maximales à 276 et 331 nm caractéristique de la structure d'une flavone. La fluorescence noir-violette sous UV ainsi que la valeur de R<sub>f</sub> 0.69 dans les systèmes cyclohexane/acétate d'éthyle (5:5) suggèrent que ce produit est un flavone aglycone.

L'effet bathochrome de la bande I avec NaOH ( $\Delta\lambda=27$ ) nm avec la stabilisation de l'intensité est en faveur d'un hydroxyle libre en position 4'. Tandis que l'absence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm avec ce réactif est en faveur d'un OR en position 7. Cette substitution est confirmée par l'absence d'un déplacement bathochrome de la bande II du spectre en présence de NaOAc par rapport à celle du spectre méthanolique.

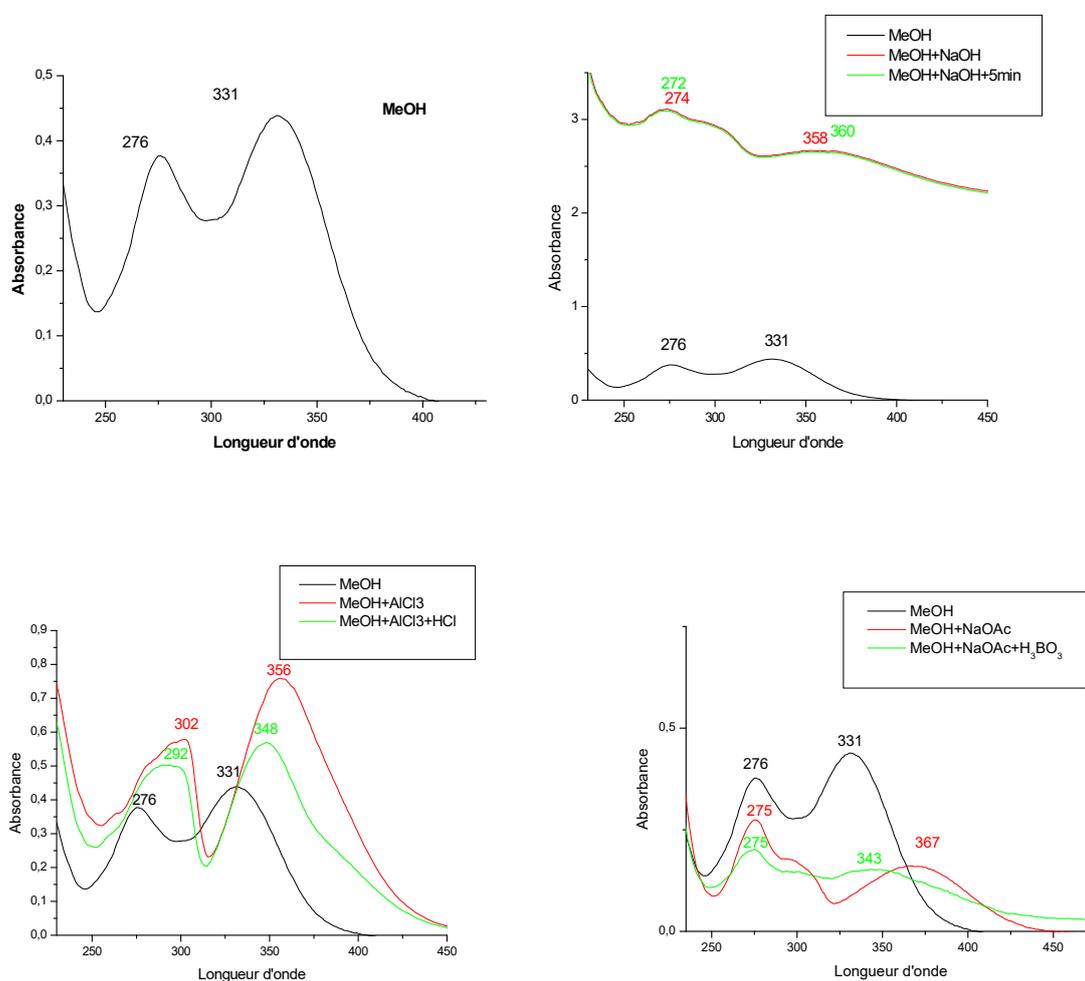
L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande I du spectre AlCl<sub>3</sub> + HCl par rapport à celui enregistré en présence d'AlCl<sub>3</sub> indique l'absence d'un système *ortho*-di-OH.

L'effet bathochrome ( $\Delta\lambda=+17$  nm) de la bande I du spectre après l'addition d'AlCl<sub>3</sub>+HCl par rapport au spectre MeOH indique la présence d'un OH en position 5 et une oxygénation en position 6.

A partir des résultats précédents on peut suggérer que le produit PCI34 soit une flavone avec des hydroxyles libres en positions 5, 4' et une substitution en position 7 (7-OR).

**Tableau 24** : Données de la série spectrale UV-Visible du composé PCI34

Réactif	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	331	276	Flavone
MeOH+NaOH	358	274	4'-OH et 7-OR
MeOH+AlCl <sub>3</sub>	356	302	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH
MeOH+AlCl <sub>3</sub> +HCl	348	292	5-OH et une oxygénation en position 6.
MeOH+ NaOAc	367	275	7-OR
MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	343	275	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH



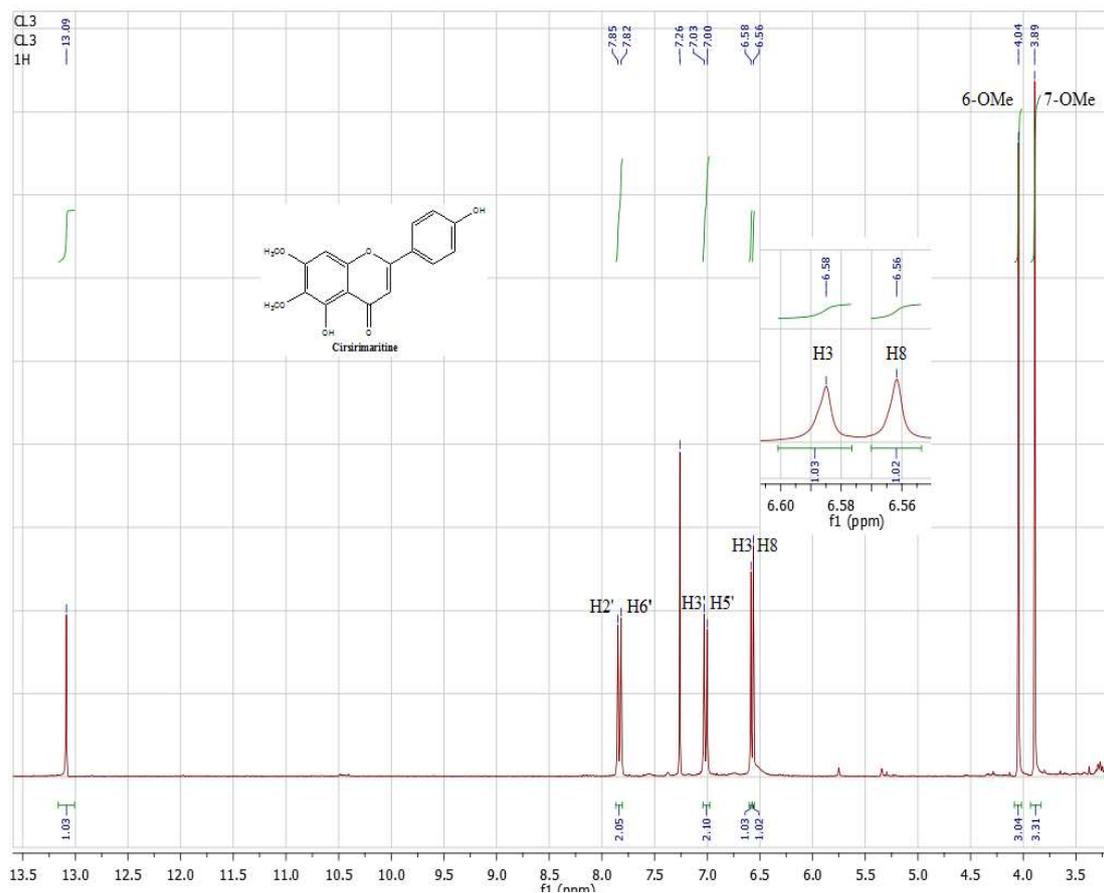
**Figure 37** : Série spectrale UV-Visible du composé PCI34

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H enregistré dans le CDCl<sub>3</sub> à 300 MHz (**Figure 38** et **Tableau 25**) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de flavone avec un noyau B substitué en position 4', un noyau A tri-substitué (5, 6, et 7) ou (5, 7, et 8), et la présence de deux groupements méthoxyles :

- Un singlet d'intégration 1H à  $\delta = 13,09$  ppm attribuable au proton d'hydroxyle en position 5.
- Un doublet d'intégration 2H à 7,83 ppm avec une constante de couplage ( $J=9$  Hz) correspondant au proton H-2', H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H à 7,02 ppm avec une constante de couplage ( $J=9$  Hz) correspondant au proton H-3', H-5'.
- Un singlet d'intégration 1H à 6,58 ppm attribuable à H-3.
- Un singlet d'intégration 1H à 6,56 ppm attribuable à H-8.
- Deux singlets à 4,04 et 3,89 ppm intégrant 3H chacun attribués à deux groupements méthoxyles en positions (6 et 7) ou (7 et 8).

**Tableau 25 : Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCI34.**

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	$J$ (Hz)	Attribution
13,09	s	1H	-	5-OH
7,83	d	2H	9	H-2' et H-6'
7,02	d	2H	9	H-3' et H-5'
6,58	s	1H	-	H-3
6,56	s	1H	-	H-8
4,04	s	3H	-	7-O-Me
3,89	s	3H	-	6-O-Me



**Figure 38:** Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé PC134

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C du produit réalisé dans CDCl<sub>3</sub> à 75.5 MHz (**Figure 39**) présente 15 signaux de carbones caractéristiques des flavonoïdes, dont deux groupements méthoxyles. Le spectre confirme que le composé est une flavone par le déplacement du carbone du carbonyle C4 à 183.09 ppm et la présence du signal de carbone C3 à 103.84 ppm. La présence d'un signal à 93.48 ppm indique que le carbone en position 8 porte un proton et que les deux méthoxyles sont portés par C6 à 61.02 ppm et C7 à 55.68 ppm.

**Tableau 26 :** Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PC134

Carbone	Déplacement chimique
2	164,26
3	103,84
4	183,09
5	153,24
6	130,42

7	155,11
8	93,48
4'	162,71
9	152,25
10	105,82
1'	123,60
2',6'	128,18
3',5'	114,62
6-OCH3	61,02
7-OCH3	55,68

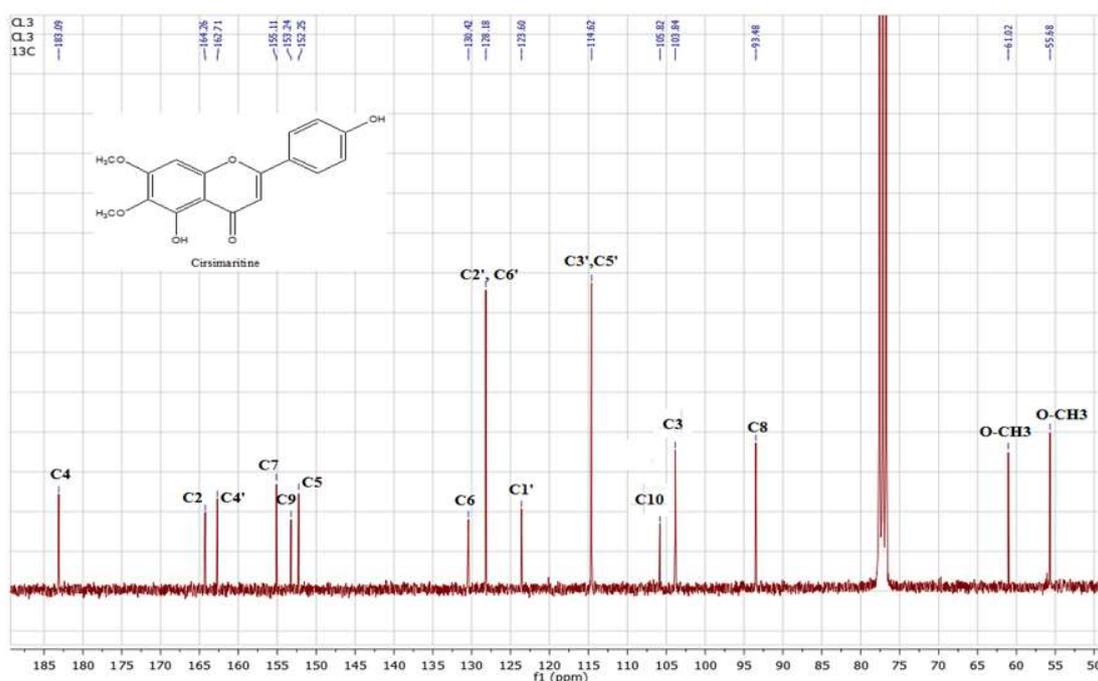


Figure 39 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du composé PCI34

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) du composé PCI34 nous oriente vers la structure : 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone connu sous le nom cirsimaritine. Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Isobe et al., 2006 ; Hernández-Bolio et al., 2015 ; Sen et al., 2017).

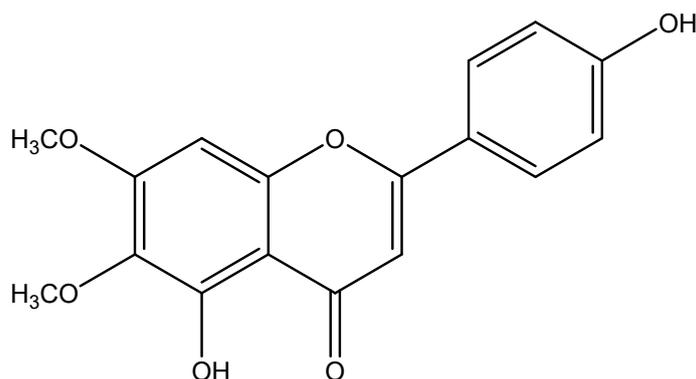


Figure 40: 4',5'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine)

La Cirsimaritine possède de nombreuses activités biologiques telles que : une activité antimicrobienne contre de nombreuses souches bactériennes comme *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris* (Miski et al., 1983), une activité antioxydante (Malmir et al., 2015). Des études ont montré que la cirsimaritine a une activité anticancéreuse significative contre le cancer du sein, les lignées cellulaires normales (L-929, fibroblaste de souris) et certaines lignées cellulaires cancéreuses humaines (MCF-7 ; carcinome du col de l'utérus, PC-3 ; carcinome de la prostate et carcinome du sein) (Sen et al., 2017) ainsi que les cellules COLO-205 (carcinome du côlon humain) (Bai et al., 2011).

### III-II-2-Identification des produits isolés de l'extrait acétate d'éthyle :

#### III-II-2-1-Elucidation structurale du composé PAC27

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune. Le spectre UV-visible présente deux bandes d'absorption à 371 et 277 nm ce qui nous oriente vers une structure de type flavonol.

La fluorescence jaune sous UV ainsi que la valeur de Rf 0.89 dans le système cyclohexane/acétate d'éthyle (5:5) suggèrent que ce produit est un flavonol aglycone.

L'examen du spectre RMN-<sup>1</sup>H enregistré dans chloroforme à 300 MHz et son étalement (**Figure 41 et tableau 27**) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un doublet dédoublé d'intégration 2H à  $\delta = 8,20$  ppm avec constante de couplage (8.1-1.9 Hz) correspondant au proton H-2', H-6'.
- Un multiplet d'intégration 3H à  $\delta = 7,50$  ppm correspondant au proton H-3', H-4', H5'.
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6,50$  ppm avec constante de couplage ( $J=2.1$ ) correspondant au proton H-8.
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6,37$  ppm avec constante de couplage ( $J=2.1$ ) correspondant au proton H-6.
- Un singulet à 3,88 ppm intégrant 3H attribué au groupement O-CH<sub>3</sub>.

**Tableau 27: Données RMN-<sup>1</sup>H du composé PCI27.**

$\delta$ (ppm)	Multiplicité	Intégration	$J$ (Hz)	Attribution
8.20	dd	2H	8,1-1,9	H-2', H-6'
7.50	m	3H	-	H-3', H-4', H5'
6.50	d	1H	2,1	H-8
6.37	d	1H	2,1	H-6
3.88	s	3H	-	O-Me

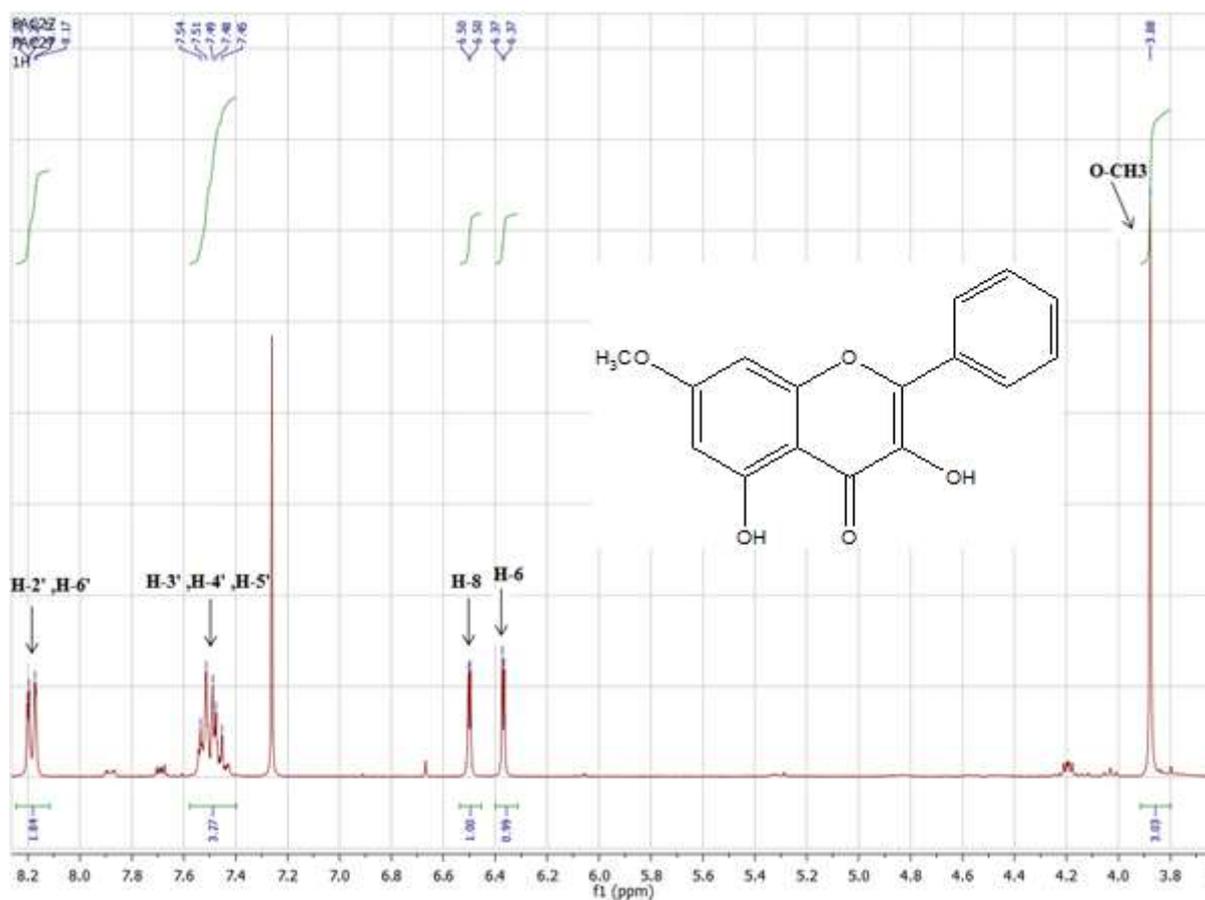


Figure 41 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé PAC27

La structure de ce composé est encore confirmée par le spectre RMN-<sup>13</sup>C (figure 42) par les signaux caractéristiques suivant : δ = 145,39 ppm (C-2), δ = 136,72 ppm (C-3), δ = 175,61 ppm (C-4), δ = 160,98 ppm (C-5), δ = 92,38 ppm (C-6) , δ = 166,10 ppm (C-7), δ = 98,18 ppm (C-8), δ = 157,16 ppm (C-9), δ = 104,16 ppm (C-10), δ = 130,85 ppm (C-1'), δ = 130,43 ppm (C-4'), δ = 128,77 ppm (C-2',C-6'), δ = 127,76 ppm (C-3',C-5').

Toutes les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C sont regroupées dans le tableau 29.

Tableau 28 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PCI27

Carbone	Déplacement chimique
2	145,39
3	136,72
4	175,61
5	160,98
6	92,38

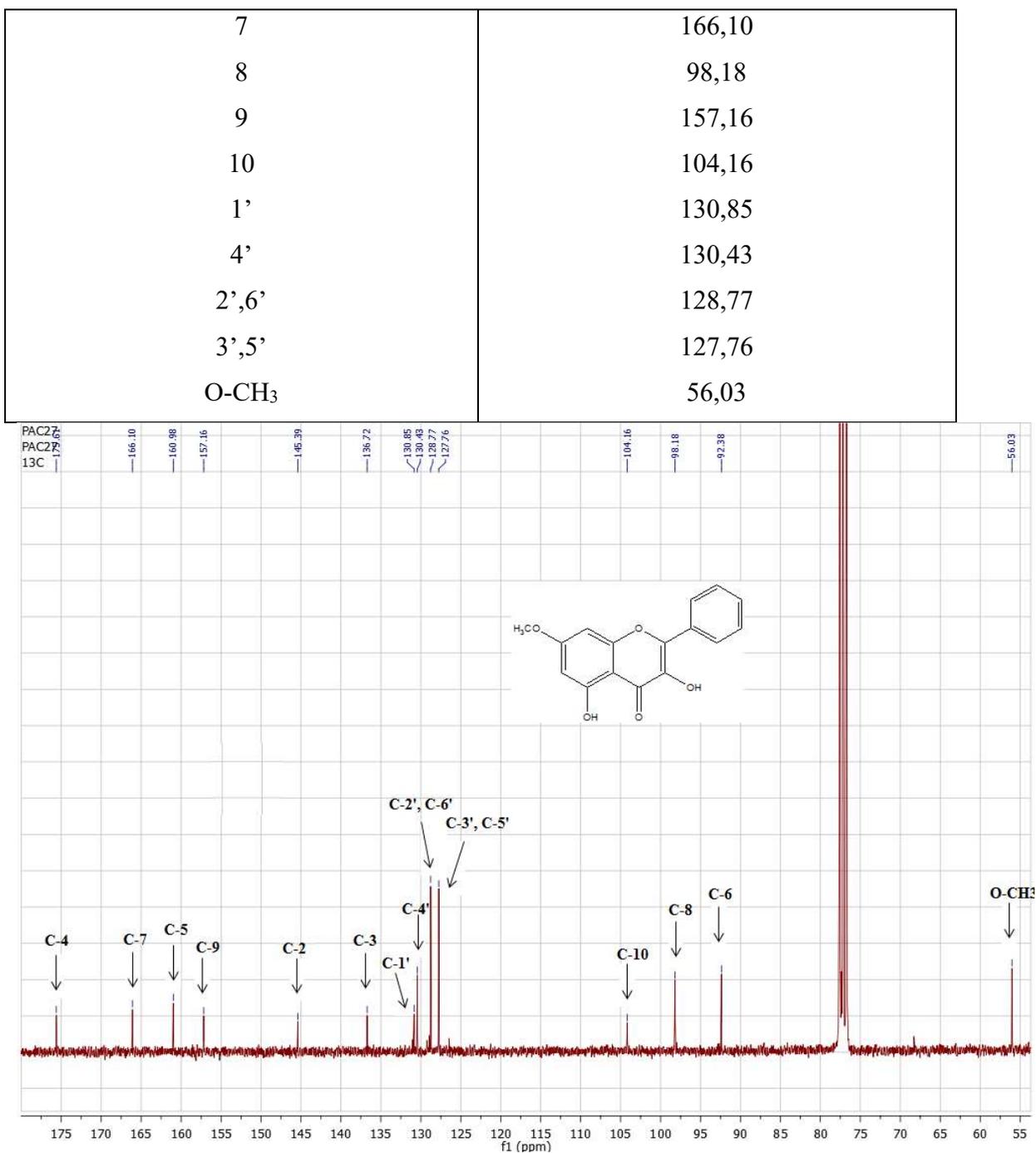
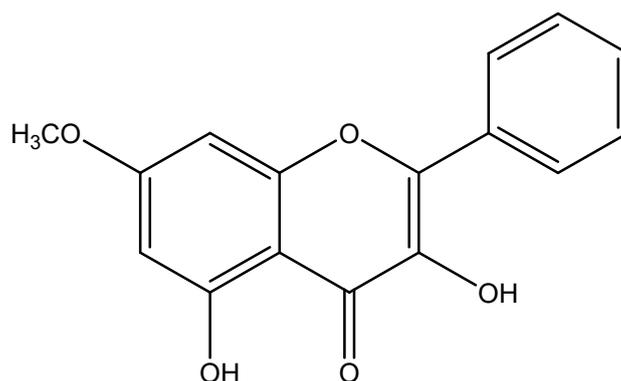


Figure 42 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé PAC27.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) du composé PAC27 nous oriente vers la structure : 7-méthoxy 3, 5 dihydroxyflavonol (Galangine 7-méthoxy ou izalpinine) (Figure 43) connu sous le nom izalpinine. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Mancipe et al (2023).



**Figure 43 : 3, 5-dihydroxy-7-méthoxy flavone (Galangine 7-méthoxy ou Izalpinine)**

L'**izalpinine** est une dihydrochalcone qui a des propriétés anti inflammatoires (Mancipe et al., 2023). Elle a également une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain à morphologie épithéliale (HT-29). (Chen et al., 2005)

#### III-II-2-2-Elucidation structurale du composé PAC48

Ce composé se présente sous forme de poudre jaune. Le spectre UV-visible (**tableau 29, figure- 44**) présente deux bandes d'absorption à 267 et 354 nm ce qui nous oriente vers une structure de type d'un flavonol substitué en position 3.

La fluorescence violette sous UV ainsi que la valeur de Rf 0.54 dans le système cyclohexane/acétate d'éthyle (5:5) suggèrent que ce produit est un flavonol aglycone.

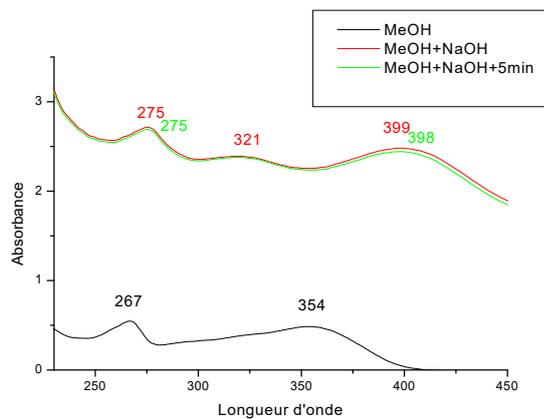
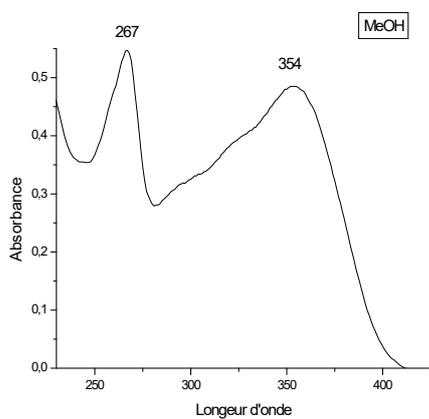
- L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I de  $\Delta\lambda = + 45$  nm avec augmentation de l'intensité indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.

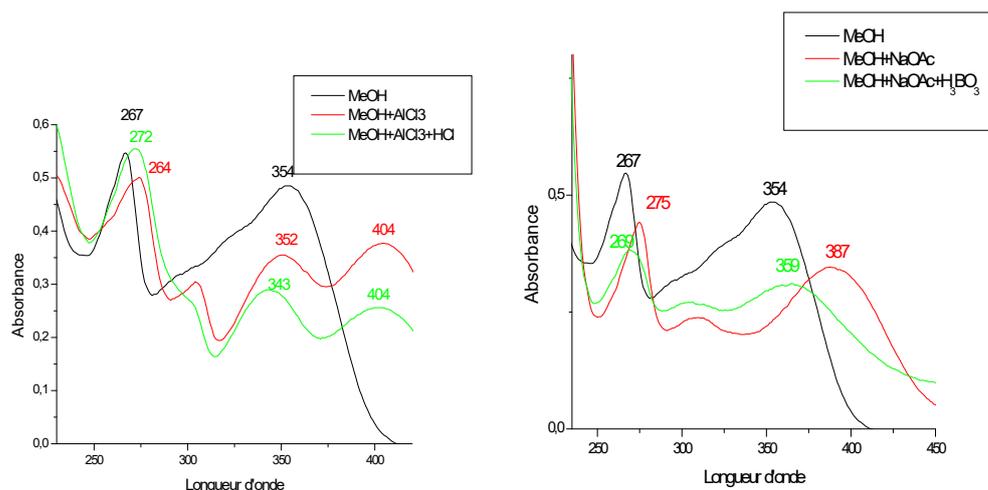
-la présence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm indique la présence d'un OH libre en position 7. Cette hypothèse est confirmée par le déplacement bathochrome de  $\Delta\lambda = +8$  nm de la bande II du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport au MeOH.

- Un effet bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu  $AlCl_3$   $\Delta\lambda = + 50$  nm comparativement à celui enregistré dans le MeOH indiquant la présence d'un OH libre en position 5 et groupe méthoxy en position 3.

**Tableau 29:** Données de la série spectrale UV-Visible du composé PAC48

Réactif	Bande I	Bande II	Nouvelle bande	commentaire
MeOH+PAC48	354	267	-	flavonol substitué en position 3
MeOH+ PAC48+NaOH	399	275	321	OH en C-4' OH en C-7
MeOH+ PAC48 +AlCl <sub>3</sub>	404	264	352	-
MeOH+ PAC48+AlCl <sub>3</sub> +HCl	404	272	343	OH libre en C-5
MeOH+ PAC48+NaOAC	387	275	-	-
MeOH+PAC48+NaOAC+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	359	269	-	-





**Figure 44 : Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC48**

Le spectre RMN du proton enregistré dans le  $\text{CDCl}_3$  à 300 MHz et son étalement (**Figure 45 et tableau 30**) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta = 7,91$  et  $\delta = 6,86$  ppm ( $J = 9\text{Hz}$ ) attribuables respectivement à H-2', H-6' et H-3', H-5' indiquant la substitution du noyau B en position 4'.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta = 6,32$  ppm et le second à  $\delta = 6,18$  ppm ( $J = 2,1$  Hz) attribuables respectivement à H-8 et H-6, confirmant l'hydroxylation des positions 5 et 7.
- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta = 3,71$  ppm correspondant au  $\text{OCH}_3$ .

Tableau 30 : Données de la spectroscopie de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) du composé PAC48

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.91	d	2H	9	H-2', H-6'
6.86	d	2H	9	H-3', H5'
6.32	d	1H	2,1	H-8
6.18	d	1H	2,1	H-6
3.71	s	3H	-	O-Me

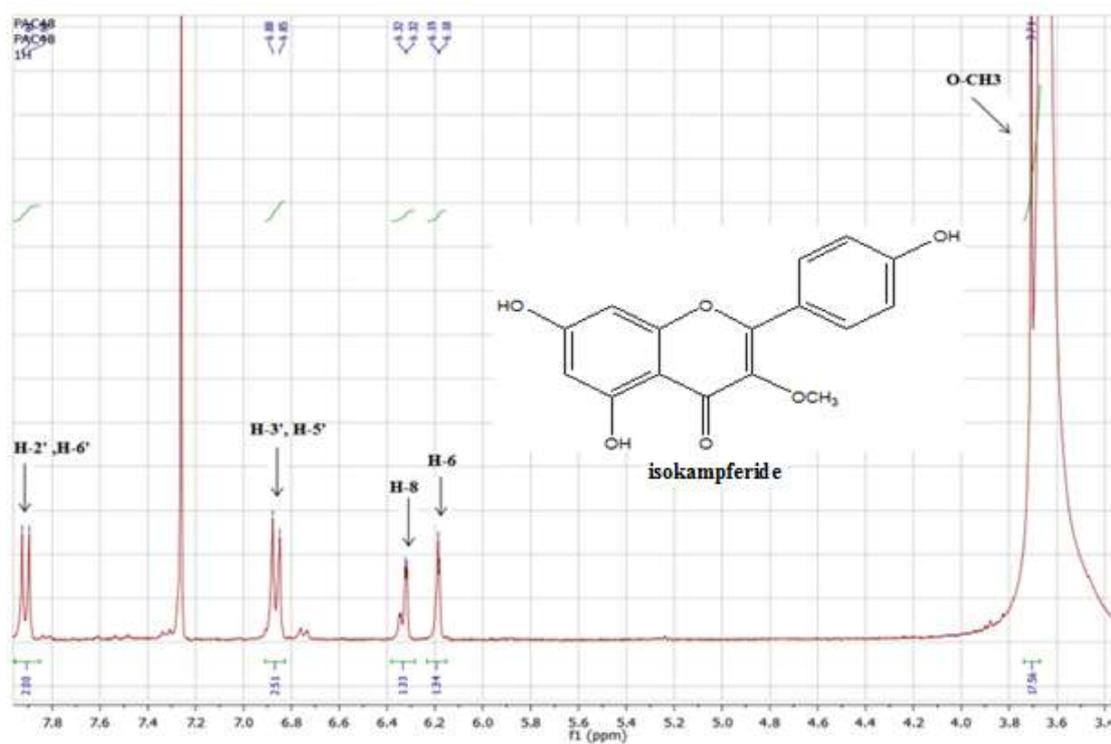


Figure 45 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé PAC48

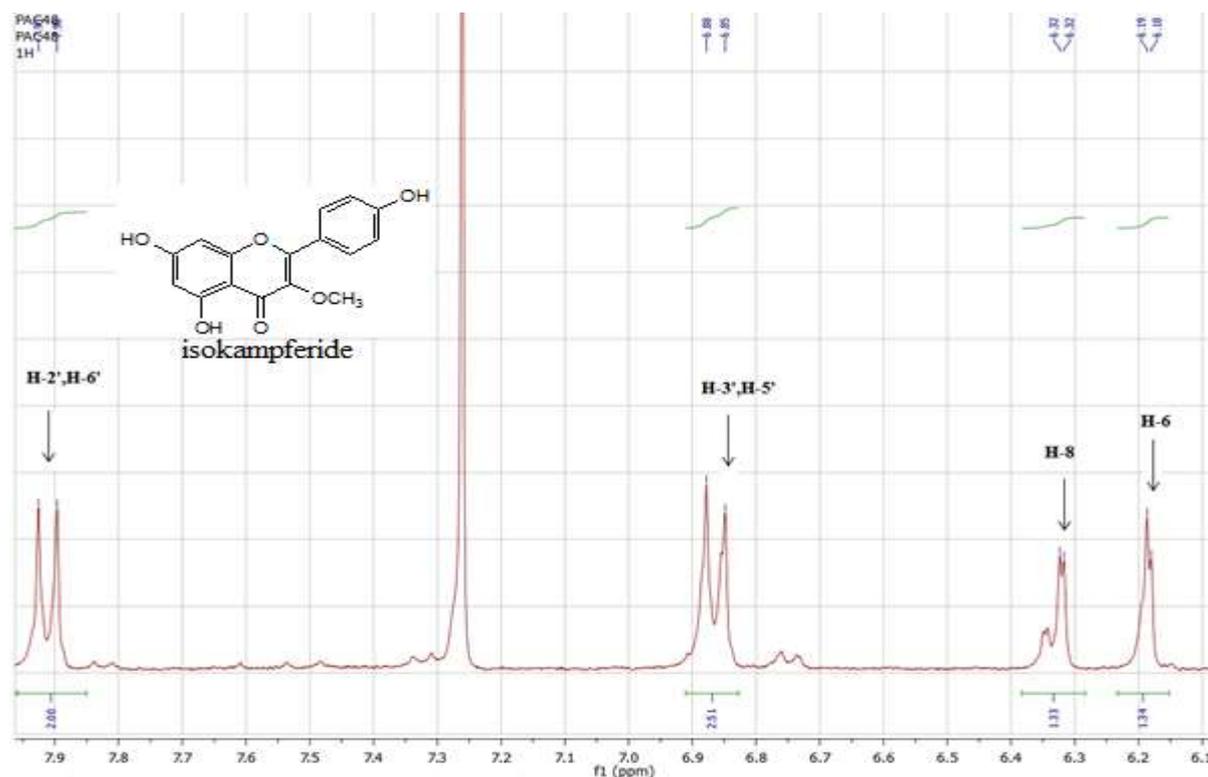


Figure 46 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé PAC48 (étalement)

La structure de ce composé est encore confirmée par le spectre RMN <sup>13</sup>C (figure 47) par les signaux caractéristiques suivant : δ = 129,61 ppm (C-3), δ = 178,71 ppm (C-4), δ = 161,41 ppm (C-5), δ = 94,08 ppm (C-6), δ = 163,94 ppm (C-7), δ = 98,87 ppm (C-8), δ = 156,98 ppm (C-9), δ = 105,08 ppm (C-10), δ = 121,56 ppm (C-1'), δ = 159,77 ppm (C-4'), δ = 130,31 ppm (C-2',6') et δ = 115,61 ppm (C-3',5').

Toutes les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C sont regroupées dans le tableau 32.

Tableau 31: Données RMN-<sup>13</sup>C du composé PAC48.

Carbone	Déplacement chimique
3	129,61
4	178,71
5	161,41
6	94,08
7	163,94
8	98,87
9	156,98
10	105,08
1'	121,56

4'	159,77
2',6'	130,31
3',5'	115,61

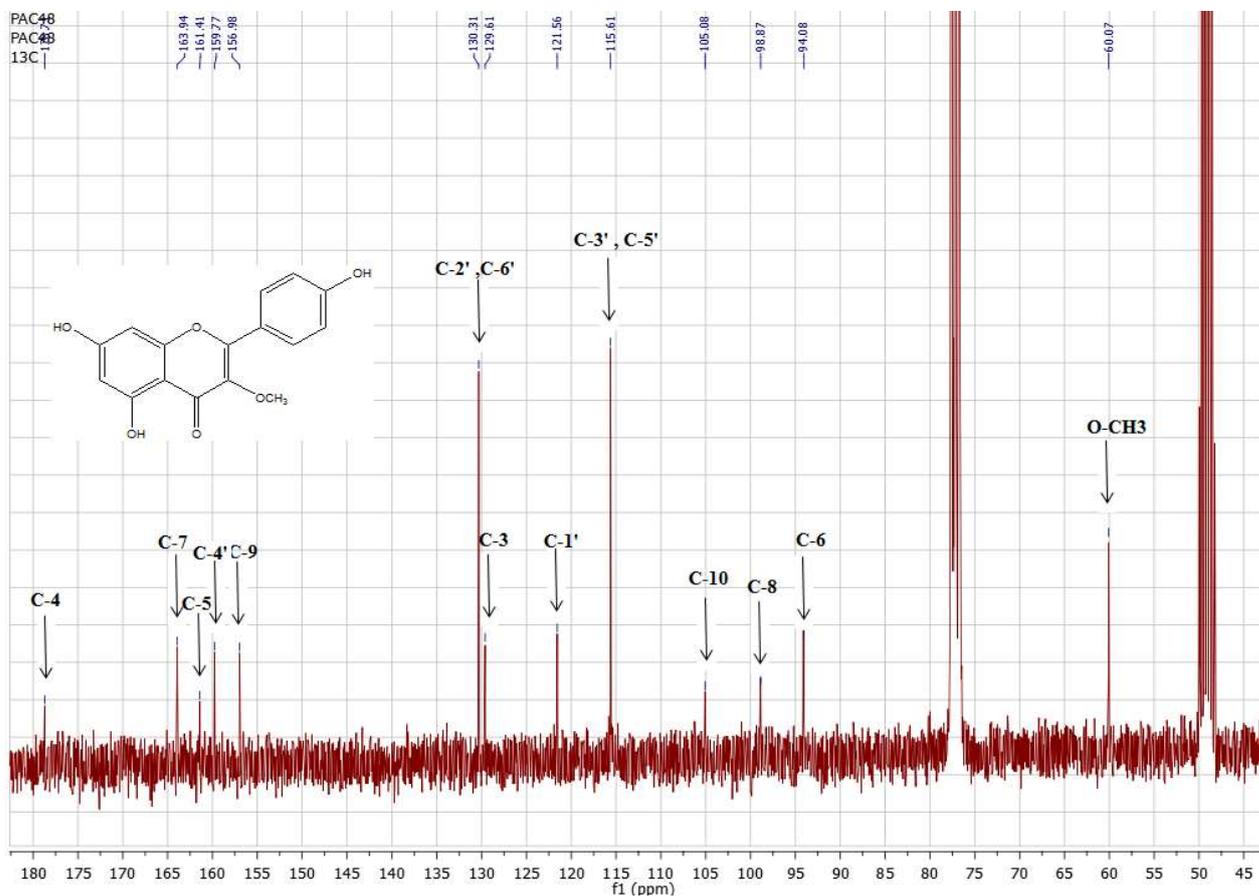


Figure 47 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé PAC48.

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure : 4', 5, 7-trihydroxy-3-méthoxyflavone (**isokampferide**) (Figure 48). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Bicha et al (2011).

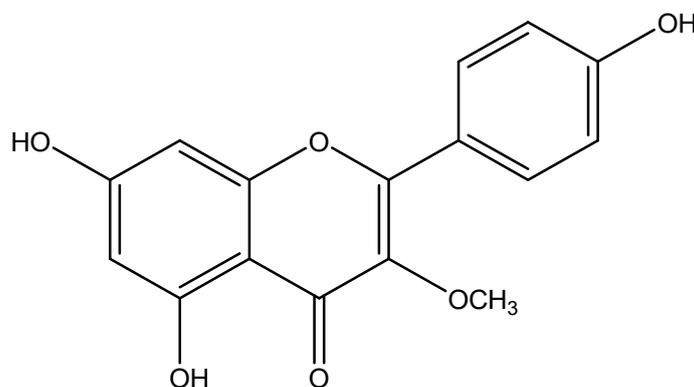


Figure 48: 4',5,7-trihydroxy-3- méthoxyflavone (isokampferide)

L'isokaempféride est une flavone qui a des propriétés antioxydante et anticholinestérase (Muhammad et al., 2015 ;Tra et al., 2021 ), et aussi une activités anti-inflammatoire principalement par inhibition de la libération de TNF- $\alpha$  induite par les lipopolysaccharides (Leal et al ., 2009).

### III-II-2-3-Elucidation structurale du composé SN10

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune. Le spectre UV-visible (tableau 32, figure 49) présente une bande d'absorption à 289 nm et un épaulement aux environs de 324 nm caractéristiques d'une structure de type flavanone ou dihydroflavonol.

La florescence violette sous UV ainsi que les valeurs de Rf 0,43 et 0,44 dans les systèmes cyclohexane / éther di éthylique (5:5) et cyclohexane/acétate d'éthyle (7 :3) suggèrent que ce produit est un flavonoïde aglycone.

Le spectre UV-visible (tableau 32, figure 49) présente une bande d'absorption à 289 nm et un épaulement aux environs de 324 nm caractéristiques d'une structure de type flavanone ou dihydroflavonol.

Le déplacement bathochrome de  $\Delta\lambda=+35\text{nm}$  de la bande II dans le spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport à celui du méthanol indique la présence d'un hydroxyle libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de  $\Delta\lambda=+19\text{ nm}$  de la bande II dans le spectre enregistré en présence de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  par rapport à celui du méthanol indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

La comparaison entre le spectre  $\text{AlCl}_3$  et  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  au niveau de la bande II (pas d'effet bathochrome) montre l'absence d'un système ortho di-OH. Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I après l'addition de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  par rapport au spectre MeOH.

Les résultats sont résumés dans le **tableau 32** et présentés dans la **figure 49**.

Tableau 32 : Maximums d'absorption du composé SN-10 dans le spectre UV-visible.

Réactif	Bande II	Epaulement
MeOH+SN10	289	324
MeOH+SN10+NaOH	315	-
MeOH+SN10+AlCl <sub>3</sub>	310	378
MeOH+SN10+ AlCl <sub>3</sub> +HCl	308	373
MeOH+SN10+NaOAc	324	-
MeOH+SN10+ NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	293	325

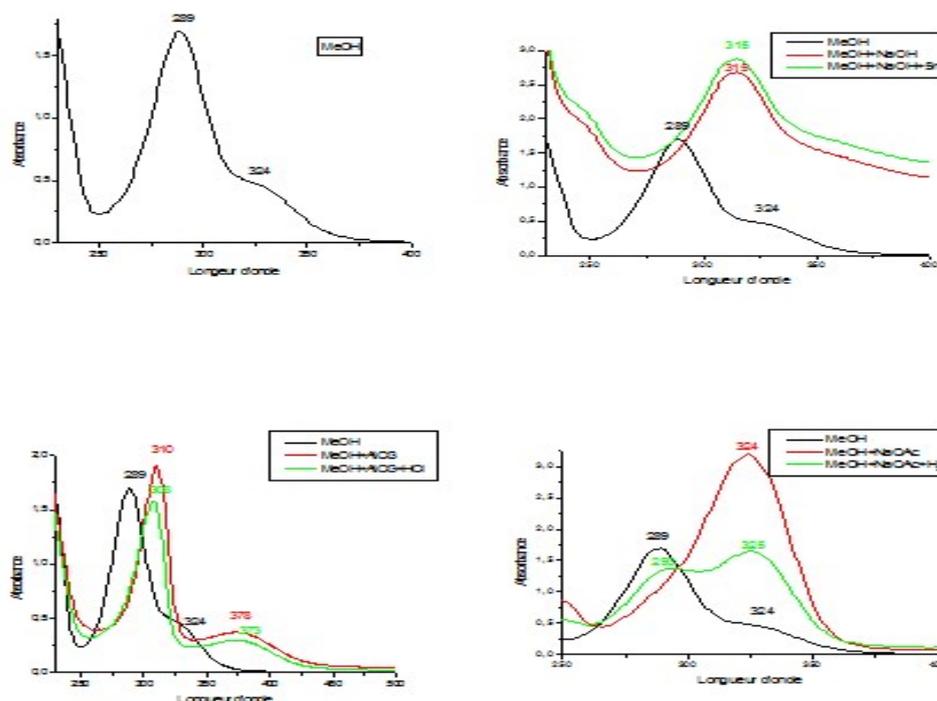


Figure 49: Spectres d'absorption UV-Visible du composé SN10

Le spectre RMN du proton enregistré dans le CDCl<sub>3</sub> à 300 MHz et son étalement (Figure 50, tableau 34) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 12,05$  ppm attribuable au OH en position 5.
- Un multiplet d'intégration 5H à  $\delta = 7,43$  ppm caractéristiques des protons H-2', H- 3', H-4', H-5', H-6'.

- Un singulet d'intégration 2H à  $\delta = 6,00$  ppm correspondant au proton H6 et H-8.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta = 5,42$  ppm avec constante de couplage ( $J=12$  et 3 Hz) correspondant au proton H-2 d'une flavanone avec une orientation *bêta* d'après la biogénèse.
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta = 3,09$  ppm avec constante de couplage ( $J=18$  et 12 Hz) correspondant au proton H-3a
- Un doublet de doublet d'intégration 1H à  $\delta = 2,81$  ppm avec constante de couplage ( $J=18$  et 3 Hz) correspondant au proton H -3b

**Tableau 34 : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) du composé SN-10**

$\delta$ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	Attributions
12,05	1H	s	-	5-OH
7,43	5H	m	-	H2',H3',H4',H5',H6'
6,00	2H	s	-	H-6 et H-8
5,42	1H	dd	12-3	H-2
3,09	1 H	dd	18-12	H-3a
2,81	1H	dd	18-3	H-3b

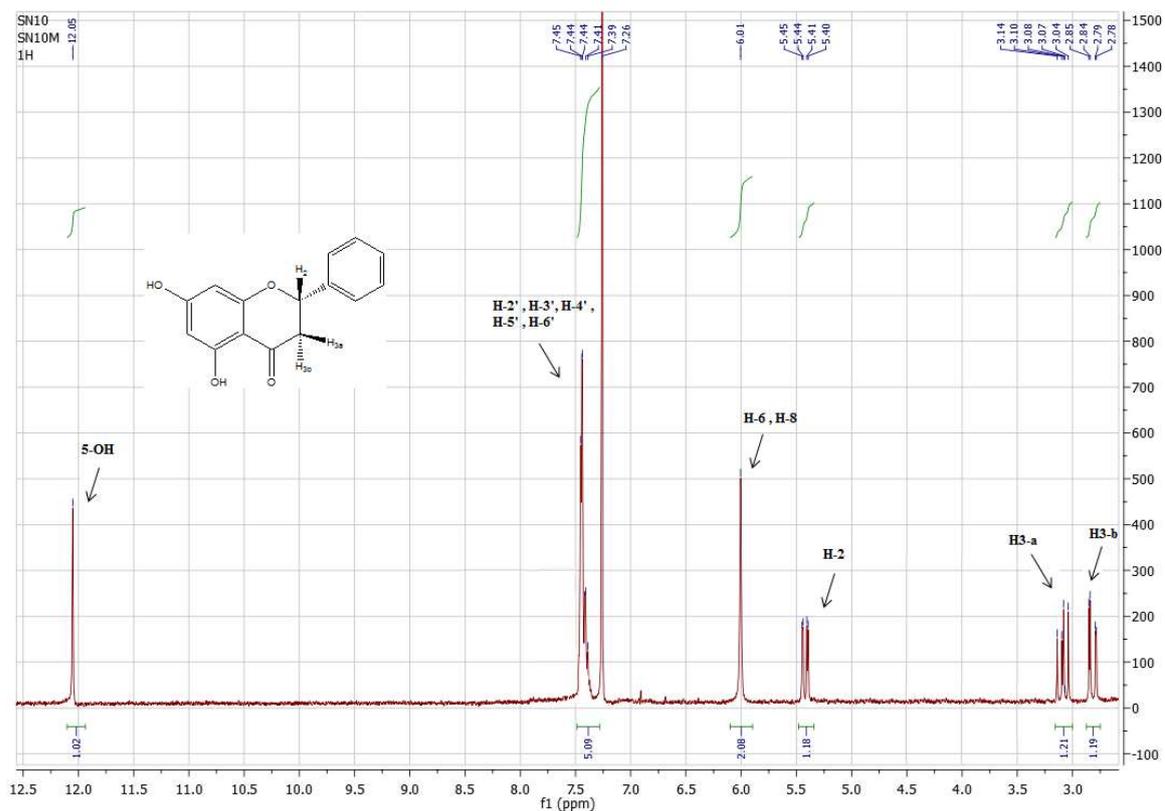


Figure 50: Spectre RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé SN10

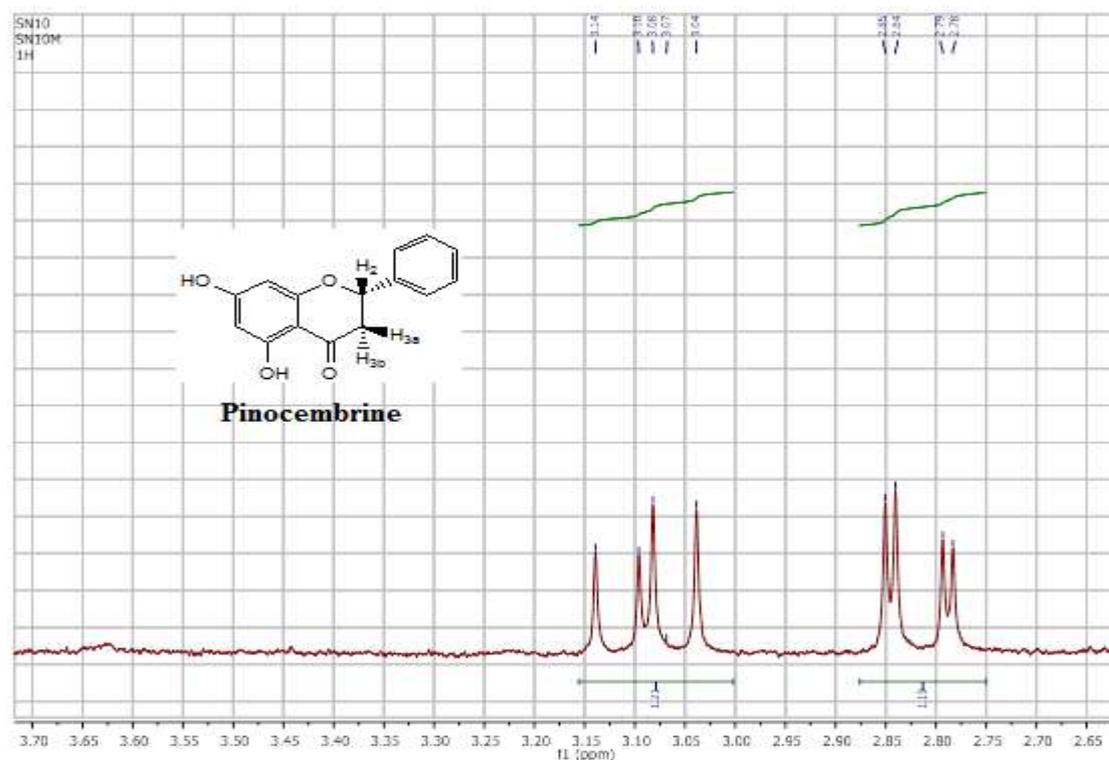
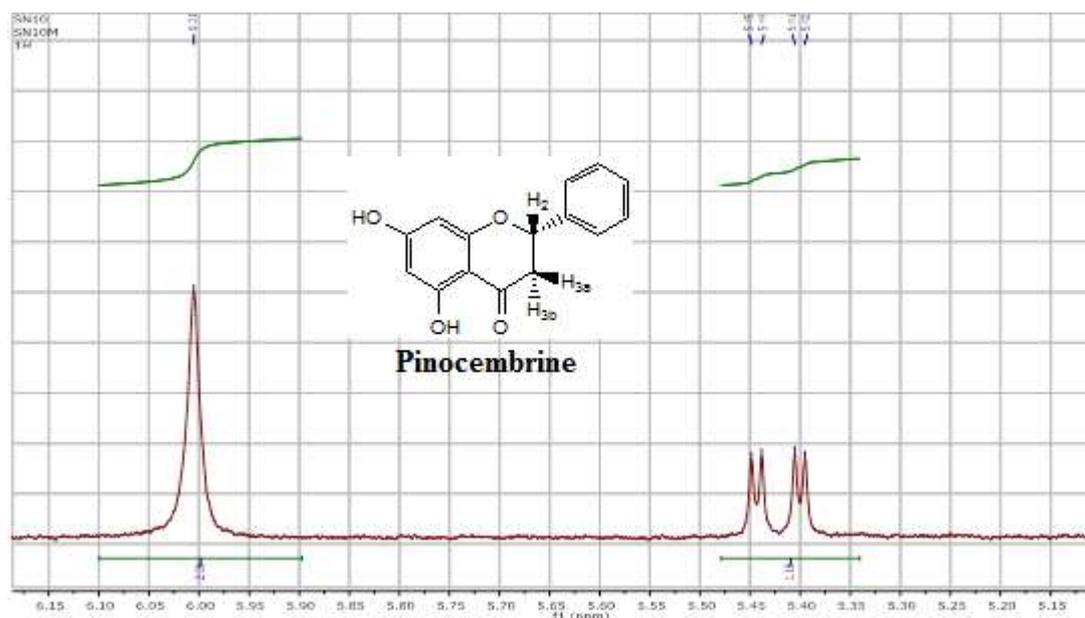


Figure 51: Spectre RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé SN10 (étalement)



**Figure 52: Spectre RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé SN10 (étalement)**

Le spectre RMN-<sup>13</sup>C (**Figure 53**) enregistré dans CDCl<sub>3</sub> à 100 MHz révèle la présence de 15 atomes de carbones. Nous observons des signaux situés dans la zone [126,29- 138,44 ppm] correspondent aux groupements CH du cycle B [C-1', C-2', C-3', C-4', C-5'et C-6']. Les autres signaux sont attribués d'une part aux groupements du cycle A [C-6 (96,91ppm), C-8 (95,64ppm), C-5 (164,48ppm), C-7 (168,00ppm), C-9 (163,28ppm) et C-10 (103,3ppm)] et d'autre part à ceux du cycle C [C-2(79,36 ppm) , C-3 (43,49 ppm) et C-4 (195,90 ppm) ].

Toutes les données relatives au spectre RMN-<sup>13</sup>C sont regroupées dans le tableau 35.

Tableau 35 : Données RMN-<sup>13</sup>C du composé SN10.

Carbone	Déplacement chimique
2	79,36
3	43,49
4	196,90
5	164,48
6	96,91
7	168,00
8	95,64
9	163,28
10	103,3
1'	138,44
2',6'	126,29
3',5',4'	129,03

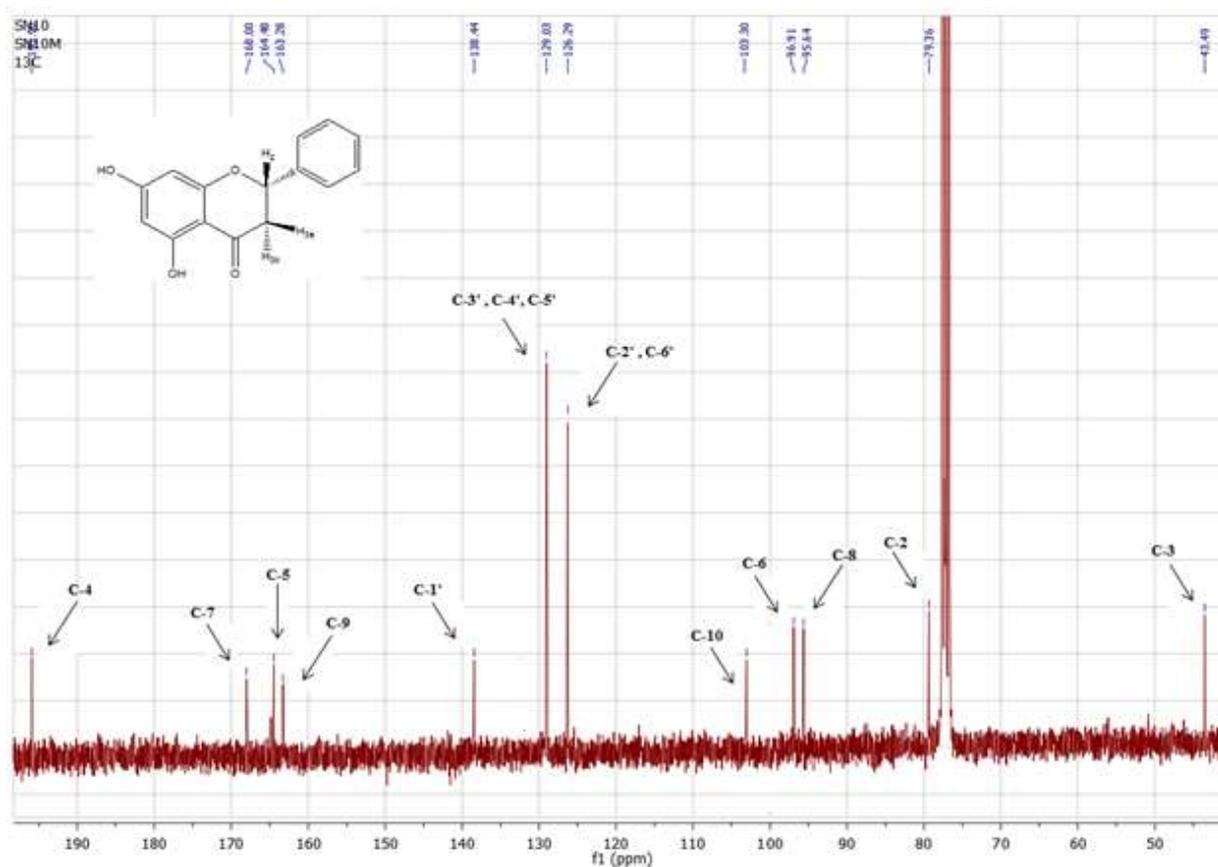
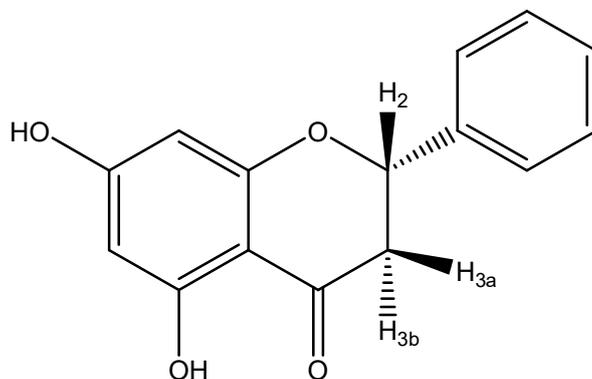


Figure 53: Spectre RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé S10.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN du proton du composé SN-10 nous oriente vers la structure : 5,7-dihydroxyflavanone (Pinocembrine). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Burke & Nair (1986)** ; **Bertelli (2012)** **Bouaroura et al (2019)**.



**Figure 54: 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine).**

La pinocembrine est considérée comme un marqueur de la propolis de type peuplier. Elle a été isolée à partir de plusieurs propolis telles que les propolis récoltées en Algérie (**Bouaroura et al., 2019**), Brésil (**Adelmann, 2007**), Mexique (**Granados-Pineda, 2018**), Chili (**Saavedra, 2016**), Argentine (**Quiroga, 2006**)...etc

La pinocembrine possède de nombreuses activités biologiques telles que : activité antibactérienne (**Simirgiotis, 2008**), activité anti-inflammatoire (**Arslan, 2011**), activité anticancéreuse (**Punvittayagul, 2012** , **Rasul, 2013**)...etc. Des études ont montré que la pinocembrine a un potentiel en tant que médicament pour traiter l'ischémie cérébrale, l'hémorragie intracérébrale, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose ainsi que d'autres maladies (**Lan et al., 2016** ; **Lan et al., 2017**).

### III-II-2-4-Elucidation structurale du composé PAC79

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune. Le spectre UV-visible (**tableau 36, figure 55**) présente deux bandes d'absorption à 268 et 334 nm ce qui nous oriente vers une structure de type flavone.

La fluorescence violette sous UV ainsi que la valeur de Rf 0,65 dans le système cyclohexane/acétate d'éthyle (5:5) suggèrent que ce produit est un flavone aglycone.

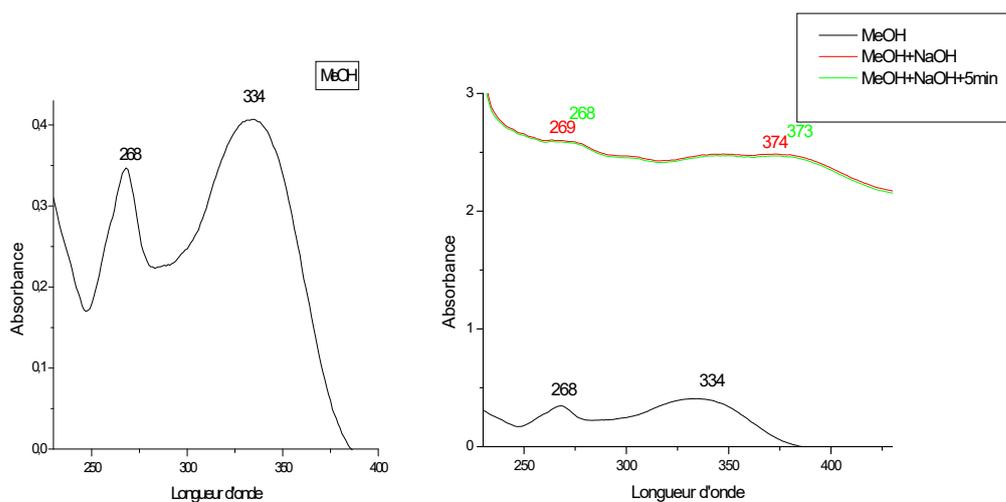
-Le déplacement bathochrome de la bande I du spectre enregistré en présence de NaOH  $\Delta\lambda = +40$  nm sans diminution de l'intensité est en faveur de la présence d'un OH libre en position 4'.

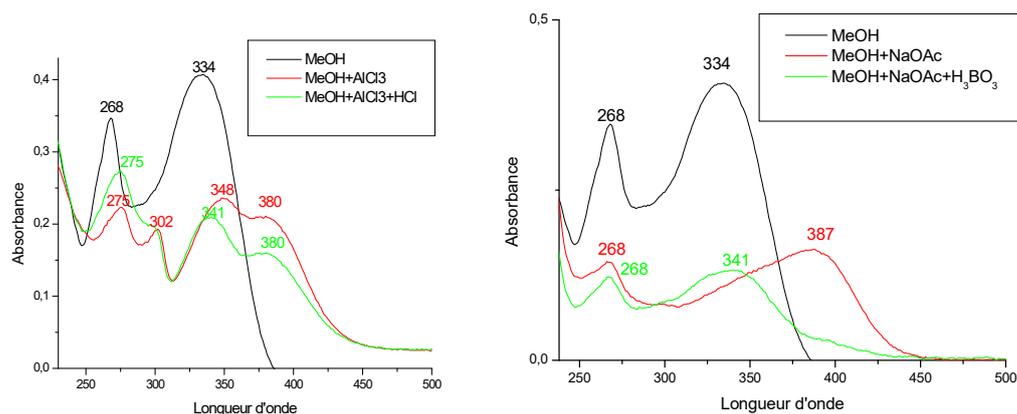
- L'absence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm indique l'absence d'un OH libre en position 7. Ceci est confirmé par l'absence d'un déplacement bathochrome de la bande II du spectre enregistré en présence de NaOAc par rapport au spectre enregistré dans le MeOH.

- Le déplacement bathochrome de la bande I dans le spectre enregistré dans le milieu  $AlCl_3$   $\Delta\lambda = + 46$  nm comparativement à celui enregistré dans le MeOH indique la présence d'un OH libre en position 5.

**Tableau 36 :** Maximums d'absorption du composé PAC79 dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II
MeOH+PAC79	334	268
MeOH+ PAC79+NaOH	374	269
MeOH+ PAC79 +AlCl <sub>3</sub>	380	275
MeOH+ PAC79+AlCl <sub>3</sub> +HCl	380	275
MeOH+ PAC79+NaOAc	387	268
MeOH+PAC79+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	341	268





**Figure 55: Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC79**

Le spectre RMN du proton enregistré dans le  $\text{CDCl}_3$  à 300 MHz et son étalement (**Figure 56 et tableau 37**) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta = 7.71$  et  $\delta = 6.86$  ppm, ( $J=9\text{Hz}$ ) attribuables respectivement à H-2', H-6' et H-3', H-5' indiquant la substitution du noyau B en position 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 6,50$  ppm correspondant au proton H-3 ce qui confirme la structure d'une flavone.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta = 6,44$  ppm et le second à  $\delta = 6,29$  ppm ( $J= 2,1$  Hz) attribuables respectivement à H-8 et H-6.
- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta = 3,81$  ppm correspondant au  $\text{OCH}_3$ .

**Tableau 37 : Données RMN-  $^1\text{H}$  du produit PAC79**

$\delta$ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	Attributions
7,71	2H	d	9	H-2' et H-6'
6,86	2H	d	9	H-3' et H-5'
6,50	1H	s	-	H-3
6,44	1H	d	2.1	H-8
6,29	1H	d	2.1	H-6
3,81	3H	s	-	OMe

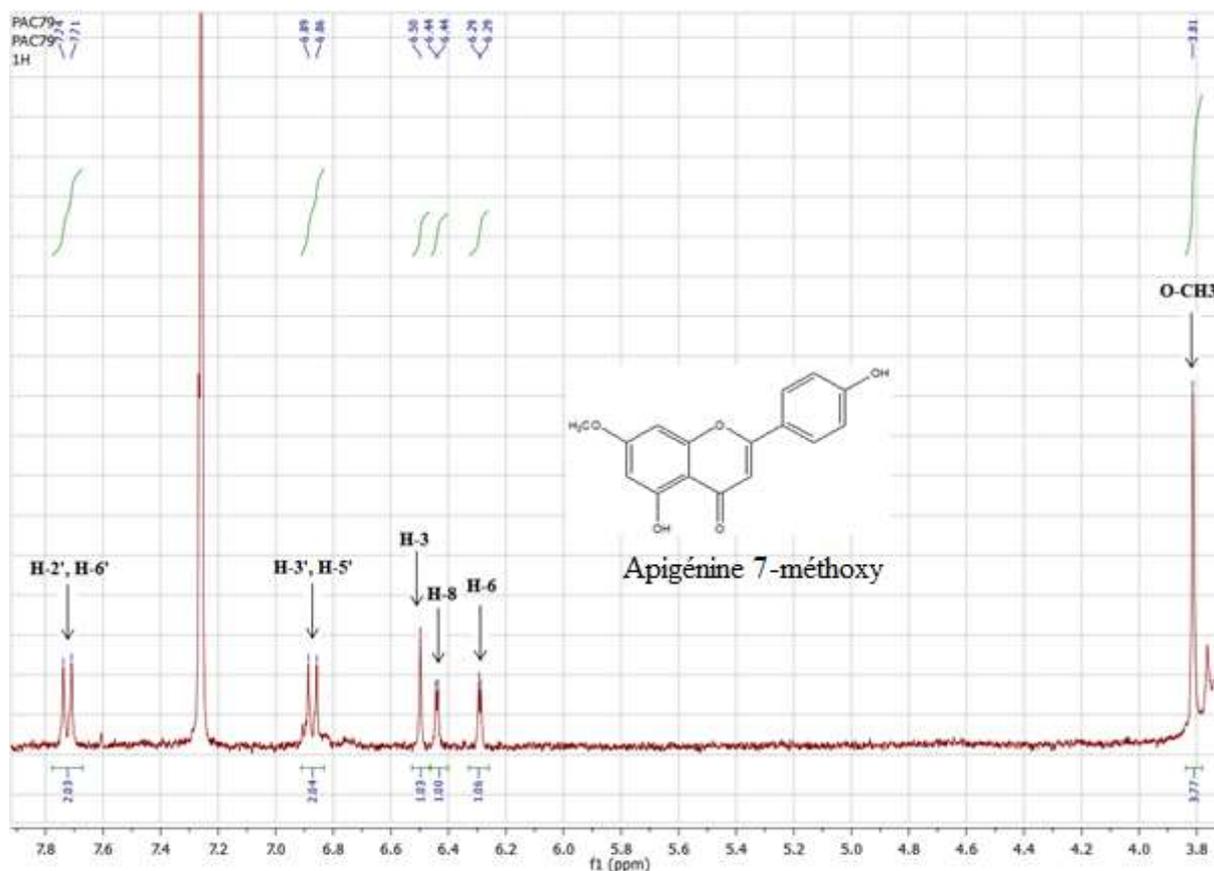


Figure 56: Spectre RMN-  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ppm) du produit PAC79.

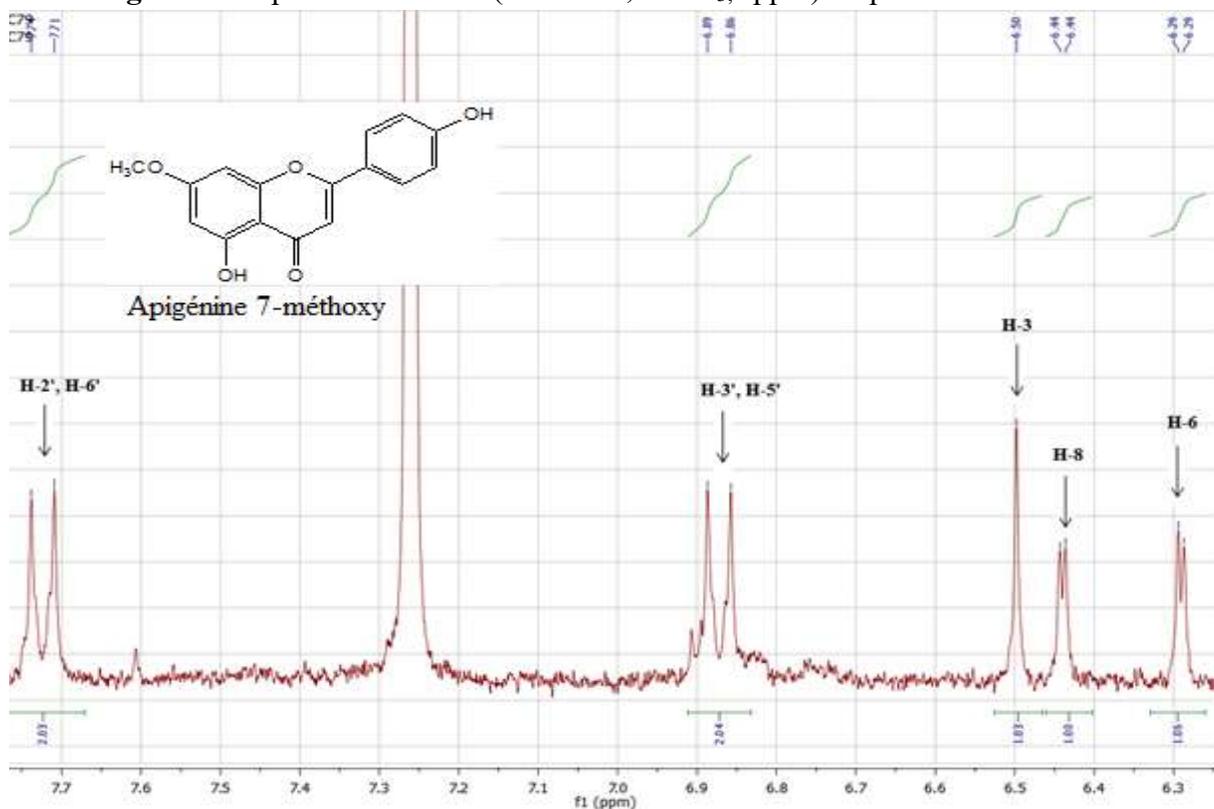
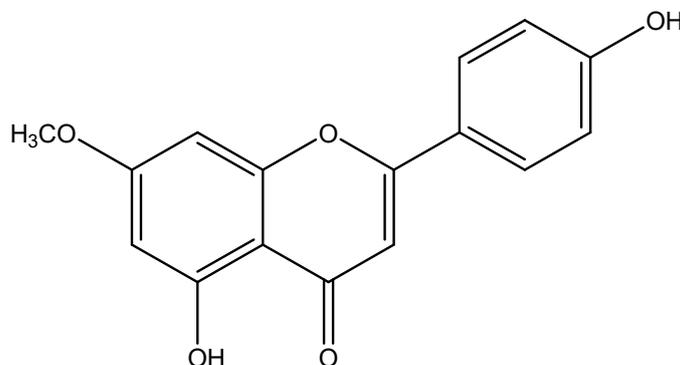


Figure 57: Etalement du spectre RMN-  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ppm) du produit PAC79

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN du proton du composé PAC79 nous oriente vers la structure : apigénine 7-méthoxy (**Genkwanin**). Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Lin et al., 2001**).



**Figure 58: Apigénine 7-méthoxy (Genkwanin)**

**Genkwanin** est une flavone qui a des propriétés antibactérienne (**Cottigli et al., 2001**), antioxydante et anti inflammatoire (**El Menyiy et al., 2001**). Elle a également une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires de cancer du côlon humain HT-29 et SW-480 (**Wang et al., 2015**), et contre les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 (**Zhang et al., 2018 ; Li et al., 2021**).

### III-II-2-5-Elucidation structurale du composé PAC91

Ce composé se présente sous forme de cristaux jaune. Le spectre UV-visible (**tableau 38, figure 59**) présente deux bandes d'absorption à 282 et 332 nm ce qui nous oriente vers une structure de type flavone.

La fluorescence violette sous UV ainsi que les valeurs de Rf de 0.12 et 0,30 dans les systèmes cyclohexane/acétate d'éthyle (5:5) et cyclohexane / éther di éthylique (5:5) suggèrent que ce produit est un flavone aglycone.

-L'effet bathochrome de  $\Delta\lambda=52$  nm de la bande I dans le spectre en présence de NaOH par rapport au spectre méthanolique sans diminution de l'intensité est en faveur de la présence d'un hydroxyle libre en position 4'.

-la présence d'une nouvelle bande entre 320-330 nm indique la présence d'un OH libre en position 7.

-L'effet bathochrome de  $\Delta\lambda=50$  nm de la bande I du spectre méthanol +  $\text{AlCl}_3$  +  $\text{HCl}$  par rapport au spectre méthanolique indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

-L'absence de déplacement de la bande I du spectre enregistré en présence de  $\text{NaOAc}$  +  $\text{H}_3\text{BO}_3$  par rapport à celui du méthanol indique l'absence d'un système ortho dihydroxyle sur le noyau B.

**Tableau 38** : Maximums d'absorption du composé **PAC91** dans le spectre UV-visible.

Réactifs	Bande I	Bande II
MeOH+PAC91	332	282
MeOH+ PAC91+NaOH	384	275
MeOH+ PAC91 + $\text{AlCl}_3$	338	281
MeOH+ PAC91+ $\text{AlCl}_3$ + $\text{HCl}$	382	278
MeOH+ PAC91+NaOAC	382	267
MeOH+PAC91+NaOAC+ $\text{H}_3\text{BO}_3$	344	271

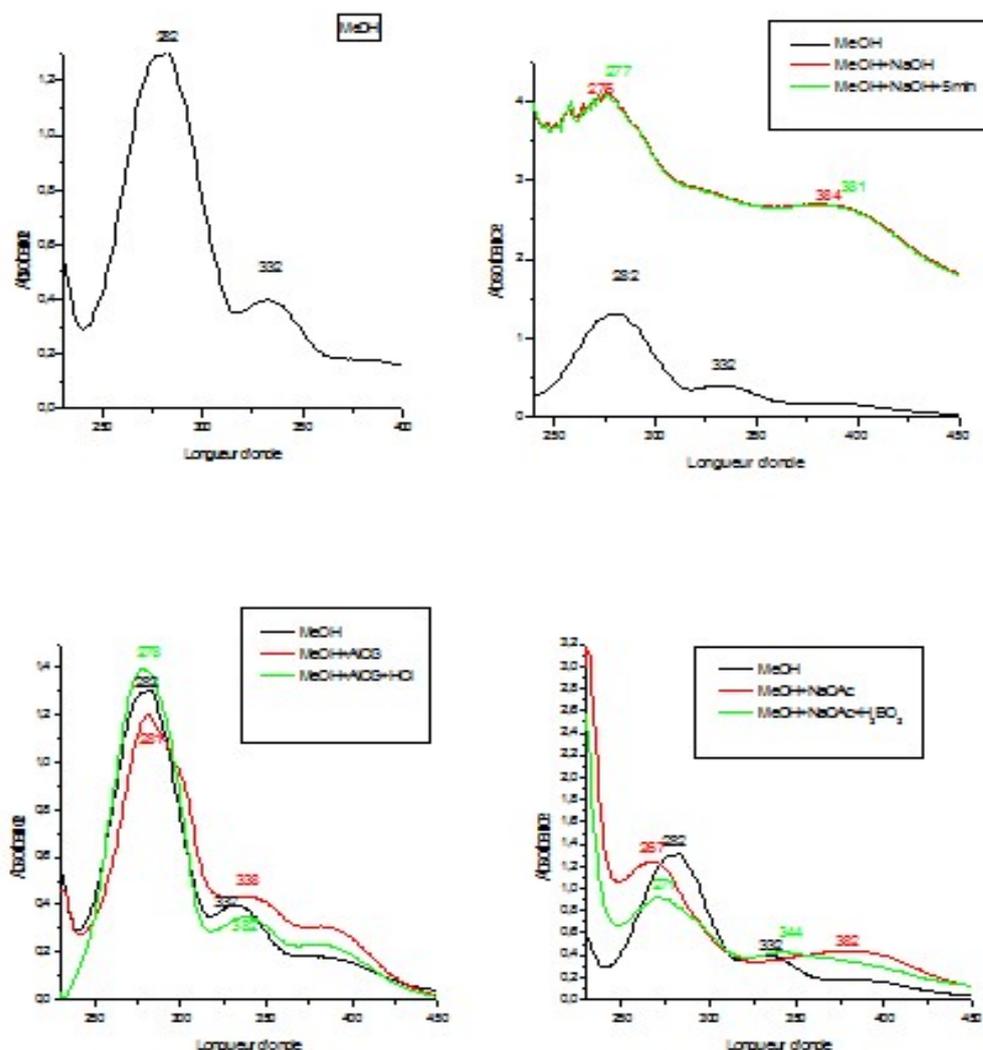


Figure 59: Spectres d'absorption UV-Visible du composé PAC91

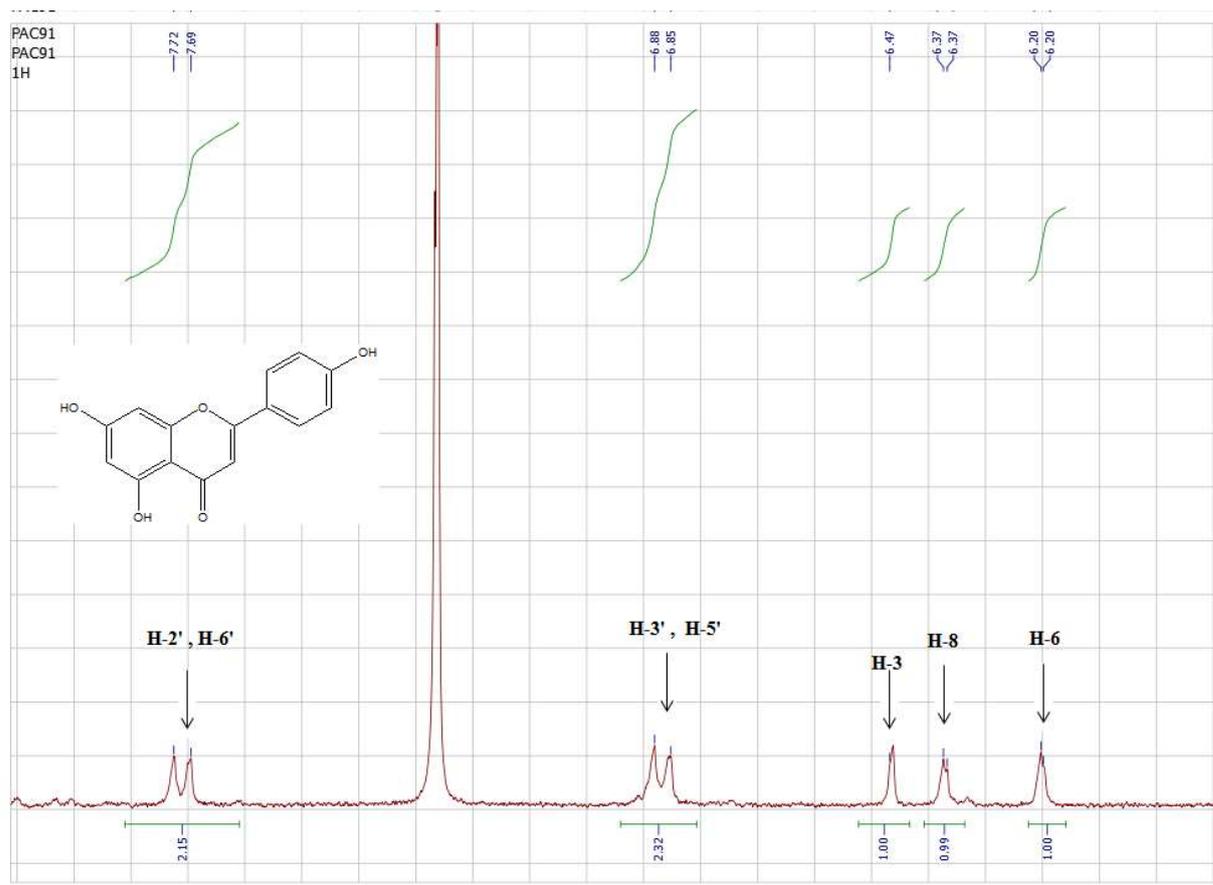
Le spectre RMN du proton enregistré dans le  $\text{CDCl}_3$  à 300 MHz et son étalement (Figure 60 et Tableau 39) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta = 7,70$  ppm avec une constante de couplage ( $J=9$  Hz) correspondant aux protons H-2' et H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H à  $\delta = 6,85$  ppm avec constante de couplage ( $J=9$  Hz) correspondant aux protons H-3' et H-5'.
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta = 6,46$  ppm correspondant au proton H-3.
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6,37$  ppm avec constante de couplage ( $J=2.1$  Hz) correspondant au proton H-8.

- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta = 6,20$  ppm avec constante de couplage ( $J=2.1$ ) correspondant au proton H-6

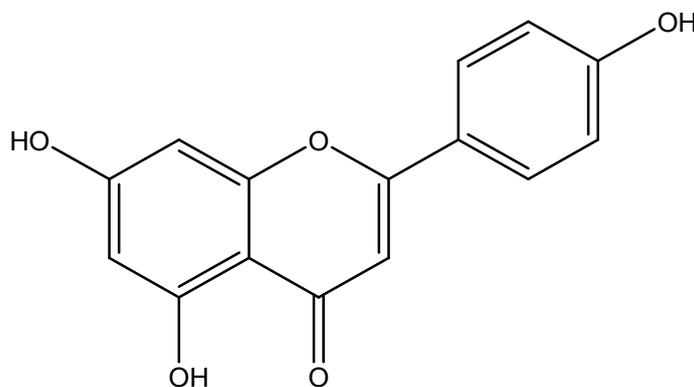
**Tableau 39** : Données RMN-  $^1\text{H}$  du produit PAC91.

$\delta$ ppm	Intégration	Multiplicité	Constante de couplage (Hz)	Attributions
7,70	2H	d	9	H-2' et H-6'
6,85	2H	d	9	H-3' et H-5'
6,46	1H	s	-	H-3
6,37	1H	d	2.1	H-8
6,20	1H	d	2.1	H-6



**Figure 60**: Spectre RMN-  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ppm) du produit PAC91.

Le spectre UV en présence des différents réactifs ainsi que le spectre RMN du proton du composé PAC91 nous oriente vers la structure : 5, 7, 4'-trihydroxyflavone (apigénine). Nos résultats sont en accord avec la littérature (**Kumar et al ., 2018 ; Saeed Tavakoli et al., 2022**).



**Figure 61: 4', 5, 7-trihydroxyflavone (apigénine).**

L'apigénine est une flavone qui a des propriétés anti inflammatoires (**Kumar et al., 2018**). Elle a également une activité cytotoxique contre la lignée cellulaire du cancer de la prostate humaine (**Ren et al., 2003**) et une activité antioxydante (**Husain Set al., 1987 ; Son et al., 2018**).

### Référence :

- Adelmann, J., Passos, M., Breyer, D. H., dos Santos, M. H. R., Lenz, C., Leite, N. F., ... & Fontana, J. D. (2007). Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(1), 174-178.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383-1392.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G., & Madhunapantula, S. V. (2016). An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutrition journal*, 15(1), 1-16.
- Arslan, S., Ozbilge, H., Kaya, E. G., & Er, O. (2011). In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Saudi Med J*, 32(5), 479-83.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C. S., Shao, X., Pan, M. H., ... & Ho, C. T. (2011). Flavonoid glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and anti-inflammatory effects. *Fitoterapia*, 82(2), 168-172.
- Benhanifia, M., Mohamed, W. M., Bellik, Y., & Benbarek, H. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western Algeria. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(12), 2521-2527.
- Bittencourt, M. L., Ribeiro, P. R., Franco, R. L., Hilhorst, H. W., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76, 449-457.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M. (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: Antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.
- Bouaroura, A., Segueni, N., Erenler, R., May, A., Bensouici, C., Akkal, S., & Rhouati, S. (2021). Phytochemical Investigation of Phenolic Constituents and In vitro Evaluation of Antioxidant Activity of Five Algerian Propolis. *Current Bioactive Compounds*, 17(8), 79-87.

- Bouaroura, A., Segueni, N., Diaz, J. G., Bensouici, C., Akkal, S., & Rhouati, S. (2019). Preliminary analysis of the chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian propolis. *Natural Product Research*, 1-5. 10, 617-627.
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Nève, J., Van Antwerpen, P., & Riazi, A. (2016). Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(12), 2613-2620.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 1–6.
- Chen, J. J., Lee, H. H., Duh, C. Y., & Chen, I. S. (2005). Cytotoxic chalcones and flavonoids from the leaves of *Muntingia calabura*. *Planta medica*, 71(10), 970-973.
- Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., & Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Cottigli, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C. O. S. T. A. N. T. I. N. O., Caus, M., Pompei, R. A. F. F., & Bonsignore, L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4), 302-305.
- da Silva, L. M., Frión-Herrera, Y., Bartolomeu, A. R., Gorgulho, C. M., & Sforcin, J. M. (2017). Mechanisms involved in the cytotoxic action of Brazilian propolis and caffeic acid against HEP-2 cells and modulation of P-glycoprotein activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(11), 1625-1633.
- Doganli, G. A. (2016). Phenolic Content and Antibiofilm Activity of Propolis Against Clinical MSSA Strains. *Records of Natural Products*.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Lourenc,o, J., Costa, A., ... Faleiro, M. (2016). Impact of biohybrid magnetite nanoparticles and Moroccan propolis on adherence of methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1208.
- El Menyiy, N., Aboulaghras, S., Bakrim, S., Moubachir, R., Taha, D., Khalid, A., ... & Bouyahya, A. (2023). Genkwanin: An emerging natural compound with multifaceted pharmacological effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115159.
- Ey, P. L., & Ashman, L. K. (1986). [48] The use of alkaline phosphatase-conjugated anti-immunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. In *Methods in enzymology* (Vol. 121, pp. 497-509). Academic Press.

-Frión-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., & Sforcin, J. M. (2019). The cytotoxic effects of propolis on breast cancer cells involve PI3K/Akt and ERK1/2 pathways, mitochondrial membrane potential, and reactive oxygen species generation. *Inflammopharmacology*, 27, 1081-1089.

-Frión-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., & Sforcin, J. M. (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(10), 1448-1456.

-Granados-Pineda, J., Uribe-Uribe, N., García-López, P., Ramos-Godínez, M. D. P., Rivero-Cruz, J. F., & Pérez-Rojas, J. M. (2018). Effect of pinocembrin isolated from Mexican brown propolis on diabetic nephropathy. *Molecules*, 23(4), 852.

-Hernández-Bolio, G. I., Torres-Tapia, L. W., Moo-Puc, R., & Peraza-Sánchez, S. R. (2015). Antigiardial activity of flavonoids from leaves of *Aphelandra scabra*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 233-237.

-Hochheim, S., Guedes, A., Faccin-Galhardi, L., Rechenchoski, D. Z., Nozawa, C., Linhares, R. E., ... & Cordova, C. M. M. D. (2019). Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 339-350.

-Husain, S. R., Cillard, J., & Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489-2491.

-Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y., & Suzui, M. (2009). Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology reports*, 22(2), 349-354.

-Isobe, T., Doe, M., Morimoto, Y., Nagata, K., & Ohsaki, A. (2006). The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1039-1041.

-Kebasa, W., Lahouel, M., Rouibah, H., Zihlif, M., Ahram, M., Abu-Irmaileh, B., ... & Al Shhab, M. (2018). Reversing multidrug resistance in chemo-resistant human lung Adenocarcinoma (A549/DOX) cells by Algerian Propolis through direct inhibiting the P-gp Efflux-pump, G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis induction. *Anti-Cancer*

*Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(9), 1330-1337.

-Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.

-Kumar, K. S., Sabu, V., Sindhu, G., Rauf, A. A., & Helen, A. (2018). Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. *International immunopharmacology*, 59, 157-167.

-Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.

-Lan, X., Wang, W., Li, Q., & Wang, J. (2016). The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications. *Molecular neurobiology*, 53, 1794-1801.

-Lan, X., Han, X., Li, Q., Li, Q., Gao, Y., Cheng, T., ... & Wang, J. (2017). Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. *Brain, behavior, and immunity*, 61, 326-339.

-Leal, L. K. A. M., Canuto, K. M., da Silva Costa, K. C., Nobre-Júnior, H. V., Vasconcelos, S. M., Silveira, E. R., ... & de Barros Viana, G. S. (2009). Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(3), 198-205.

-Li, Q., Zhang, P., & Cai, Y. (2021). Genkwainin suppresses MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity by inhibiting TLR4/MyD88/NLRP3 inflammasome pathway in a cellular model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 87, 62-69.

-Lin, J. H., Lin, Y. T., Huang, Y. J., Wen, K. C., Chen, R. M., Ueng, T. H., & Liao, C. H. (2001). Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis Genkwae* Flos. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9(1), 7.

-Malmir, M., Gohari, A. R., Saeidnia, S., & Silva, O. (2015). A new bioactive monoterpene-flavonoid from *Satureja khuzistanica*. *Fitoterapia*, 105, 107-112.

-Mancipe, J. C., Vargas-Pinto, P., Rodríguez, O. E., Borrego-Muñoz, P., Castellanos Londoño, I., Ramírez, D., ... & Pombo, L. M. (2023). Anti-Inflammatory Effect of Izalpinin Derived from *Chromolaena leivensis*:  $\lambda$ -Carrageenan-Induced Paw Edema and In Silico Model. *Molecules*, 28(9), 3722..

- Milošević-Đorđević, O., Grujičić, D., Radović, M., Vuković, N., Žižić, J., Marković, S. (2015). In vitro chemoprotective and anticancer activities of propolis in human lymphocytes and breast cancer cells. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 571-581.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239–246.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239–246.
- Misir, S., Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., & Hepokur, C. (2020). Effect of Turkish propolis on miRNA expression, cell cycle, and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) cells. *Nutrition and cancer*, 72(1), 133-145.
- Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C., & Mabry, T. J. (1983). Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *Journal of Natural Products*, 46(6), 874-875.
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*, 46(11), 3482-3485.
- Motomura, M., Kwon, K. M., Suh, S. J., Lee, Y. C., Kim, Y. K., Lee, I. S., ... & Kim, C. H. (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 61-67.
- Muhammad, A., Tel-Cayan, G., Öztürk, M., Nadeem, S., Duru, M. E., Anis, I., ... & Shah, M. R. (2015). Biologically active flavonoids from *Dodonaea viscosa* and their structure–activity relationships. *Industrial Crops and Products*, 78, 66-72.
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., & Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 30.
- Nedji, N., & Loucif-Ayad, W. (2014). Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(6), 433-437.

- Popolo, A., Piccinelli, L. A., Morello, S., Cuesta-Rubio, O., Sorrentino, R., Rastrelli, L., & Pinto, A. (2009). Antiproliferative activity of Brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Natural Product Communications*, 4(12), 1711-1716.
- Pratami, D. K., Mun'im, A., Sundowo, A., & Sahlan, M. (2018). Phytochemical profile and antioxidant activity of propolis ethanolic extract from *Tetragonula* bee. *Pharmacognosy Journal*, 10(1).
- Punvittayagul, C., Pompimon, W., Wanibuchi, H., Fukushima, S., & Wongpoomchai, R. (2012). Effects of pinocembrin on the initiation and promotion stages of rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(5), 2257-2261.
- Quiroga, E. N., Sampietro, D. A., Soberon, J. R., Sgariglia, M. A., & Vattuone, M. A. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 103-110.
- Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., & Li, X. (2013). Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed research international*, 2013.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal research reviews*, 23(4), 519-534.
- Saavedra, N., Cuevas, A., Cavalcante, M. F., Dörr, F. A., Saavedra, K., Zambrano, T., ... & Salazar, L. A. (2016). Polyphenols from Chilean propolis and pinocembrin reduce MMP-9 gene expression and activity in activated macrophages. *Biomed research international*, 2016.
- Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., ... & González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, 22(4), 666.
- Scazzocchio, F., D'Auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161(4), 327-333.
- Segueni, N., Belabed, K., Bousseboua, H., Moussaoui, F., Zellagui, A., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2014). Antibacterial activity of two Algerians propolis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(1), 106-110.

- Sen, A., Ozbas Turan, S., & Bitis, L. (2017). Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 541-546.
- Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., & Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & shellfish immunology*, 62, 57-67.
- Son, N. T., Oda, M., Hayashi, N., Yamaguchi, D., Kawagishi, Y., Takahashi, F., ... & Fukuyama, Y. (2018). Antimicrobial activity of the constituents of *Dalbergia tonkinensis* and structural-bioactive highlights. *Natural Product Communications*, 13(2).
- Tavakoli, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Dehaghi, N. K., Yaghoobi, M., Hajiaghaee, R., Gholami, A., & Ghafarzadegan, R. (2022). Isolation and purification of apigenin, quercetin and apigenin 7-O-glycoside from *Apium graveolens* L., *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, *Allium cepa* L., respectively. *Journal of Medicinal Plants*, 21(83), 62-76.
- Tra, N. T., Cham, B. T., Ha, N. T., Anh, L. T. T., & Tuyen, N. V. (2021). Antioxidant Constituents from the Stem and Leaf of *Helicteres hirsuta Loureiro*. *The Natural Products Journal*, 11(5), 592-599.
- Utispan, K., Chitkul, B., & Koontongkaew, S. (2017). Cytotoxic activity of propolis extracts from the stingless bee *Trigona sirindhornae* against primary and metastatic head and neck cancer cell lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(4), 1051.
- Uçar, M., & Değer, O. (2019). Evaluation of cytotoxic and wound healing effect of DMEM extracts of Turkish propolis in MDA-MB-231 cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(2), 321-325.
- Veloz, J. J., Saavedra, N., Lillo, A., Alvear, M., Barrientos, L., & Salazar, L. (2015). Antibiofilm activity of Chilean propolis on *Streptococcus mutans* is influenced by the year of collection. *BioMed Research International*, 2015.
- Wang, X., Song, Z. J., He, X., Zhang, R. Q., Zhang, C. F., Li, F., ... & Yuan, C. S. (2015). Antitumor and immunomodulatory activity of genkwanin on colorectal cancer in the APCMin/+ mice. *International immunopharmacology*, 29(2), 701-707.
- Wojtyczka, R. D., Kępa, M., Idzik, D., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Dziedzic, A., & Wąsik, T. J. (2013). In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of Polish

propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. *Evidence-based complementary and alternative Medicine*, 2013.

-Xuan, H., Li, Z., Yan, H., Sang, Q., Wang, K., He, Q., ... & Hu, F. (2014). Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

-Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Buñay-Noboa, J., Marceau, G., Sapin, V., ... & Lobaccaro, J. M. A. (2019). Ethanolic extract of Algerian propolis decreases androgen receptor transcriptional activity in cultured LNCaP cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 189, 108-115.

-Zhang, H. W., Hu, J. J., Fu, R. Q., Liu, X., Zhang, Y. H., Li, J., ... & Gao, N. (2018). Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K $\gamma$  mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), 11255.

### Conclusion générale

La propolis est une résine présente sur les bourgeons, jeunes rameaux, blessures de certains arbres et arbustes. Cette résine est récoltée par les abeilles et utilisée pour colmater les trous et pour assurer une parfaite étanchéité de la ruche associée à une excellente asepsie. Ce produit occupe de plus en plus une place de choix en thérapeutique. Les recherches entreprises sur la propolis ont permis de montrer que celle-ci pouvait être une alternative efficace dans bon nombre de troubles et pathologies, mais également en association avec certains traitements pharmacologiques.

Le but de notre travail a été l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de quelques propolis algériennes. Au début de ce travail, nous avons choisi cinq propolis collectées dans différentes zones géographiques de l'Est Algérien : Ouadsabt, Ain elhamra et Ferdjiwa situées dans la wilaya de Mila, Oumtboul, Taref situées dans la wilaya de Taref. Les extraits testés ont été obtenus par macération dans quatre solvants différents : éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol. Dans un premier temps nous avons effectué une étude comparative de l'activité antibiofilm de cinq propolis et leur cytotoxicité sur les cellules d'adénocarcinome (Caco-2). Les composés des extraits les plus actifs ont été identifiés par analyse UPLC-ESI-MS/MS. Les tests de l'activité antibiofilm ont démontré que les extraits sont plus actifs sur les souches de staphylocoque standard et résistant à la méthicilline (MRSA-18 et MRSA-20). De plus les propolis testées sont très actives sur les cellules Caco-2.

Les principaux composés phénoliques détectés dans la présente étude sont : l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide gentisique, l'acide *p*-coumarique et le kampférol. En second lieu, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de deux autres propolis par cinq méthodes différentes (DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotène, CUPRAC, FRAP) et nous avons effectué une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux. L'étude des mécanismes de cytotoxicités sur la lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB-231 a été réalisée en adoptant plusieurs tests tels que l'évaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT, la mesure de l'apoptose par marquage à l'annexine V-EGFP, l'électrophorèse sur gel et le western blot et l'isolation d'ARN<sub>m</sub>, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel. Notre étude indique que la propolis la plus active (Mila) présente un effet antioxydant très intéressant. Cette propolis agit sur les

cellules MDA-MB-231 en induisant l'apoptose par augmentation des concentrations des protéines Bax, caspase 3 et p53 ainsi qu'une diminution des protéines Bcl2 et CDK-4. Ces résultats sont confirmés par l'étude de l'ARNm et l'ADNc.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la composition chimique des extraits les plus actifs (l'extrait chloroformique et l'extrait acétate d'éthyle de la propolis de Mila). Après l'extraction, séparation et purification, nous avons obtenus 6 produits à l'état pur. La détermination structurale de ces composés a été réalisée à l'aide des différentes techniques spectroscopiques de RMN mono dimensionnelle (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C) ainsi que la spectrométrie UV-visible. Les 6 composés isolés sont identifiés comme suit :

- 4',5 -dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine).
- Galangine 7-méthoxy (izalpinine).
- 4',5, 7-trihydroxy-3- méthoxyflavone (isokampferide).
- 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine).
- Apigénine 7-méthoxy (Genkwanin).
- 4', 5, 7 -trihydroxyflavone (apigenine).

L'analyse UPLC-ESI-MS/MS ainsi que l'étude phytochimique ont permis la séparation et l'identification de plusieurs composés qui sont considérés comme des marqueurs de la propolis de type peuplier confirmant que l'ensemble des propolis étudiées sont de ce type.

Ce travail a fait l'objet de deux publications internationales, quatre communications internationales et deux communications nationales.

Plus d'études nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action de nos propolis sur de l'irradiation du biofilm et pour déterminer les composés bioactifs afin de permettre une utilisation potentielle de ces extraits.

Concernant l'effet anticancéreuse, plus de travaux sont indispensables pour déterminer les autres produits bioactifs et évaluer l'effet des nos extraits sur d'autres lignées de cellules cancéreuses.

## **Résumé :**

Notre étude s'intéresse à l'investigation de la composition chimique et des activités biologiques des propolis Algérienne. Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à plusieurs propolis de l'Est Algérien. Une étude comparative en fonction de leur activité antibiofilm et de leur cytotoxicité a été réalisée. De plus, une analyse par UPLC-ESI-MS/MS des extraits les plus actifs a aussi été réalisée. En second lieu, nous avons étudié le pouvoir antioxydant de deux autres propolis par cinq méthodes différentes. Nous avons effectué une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux. La propolis de Mila a enregistré les activités antioxydantes les plus élevées. Ce résultat nous a encouragés à étudier l'activité anticancéreuse des extraits de cette propolis. Cette propolis agit sur les cellules MDA-MB-231 en induisant l'apoptose par augmentation des concentrations des protéines Bax, caspase 3 et p53 ainsi qu'une diminution des protéines Bcl2 et CDK-4. Ces résultats sont confirmés par l'étude de l'ARNm et de l'ADNc.

Dans la deuxième partie de notre travail nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la propolis la plus active. Après l'extraction, séparation et purification, nous avons obtenus 6 flavonoïdes à l'état pur (5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine), 7-méthoxy 3, 5 dihydroxyflavonol (Galangine 7-méthoxy), 4',5,7-trihydroxy-3-méthoxyflavone (isokampferide), 5,7-dihydroxyflavanone (Pinocembrine), Apigénine 7-méthoxy (Genkwanine) et l'Apigénine. Notre étude a démontré que l'ensemble des propolis étudiées sont probablement de type peuplier.

## **Mot clés :**

Propolis, étude comparative, activité antibiofilm, cytotoxicité, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes, UPLC-ESI-MS/MS.

## **Abstract**

Our study is interested in the investigation of the chemical composition and the biological activities of Algerian propolis.

In the first part of our study we examined several propolis harvested from Algerian East in order to compare their antibiofilm and cytotoxicity activities, In addition, the UPLC-ESI-MS/MS analysis of the most active extracts was also evaluated. In the second part we studied the antioxidant capacity of two other propolis by five different methods. The total phenolic and flavonoid contents were evaluated. Propolis of Mila exhibited the highest antioxidant activity. This result encouraged us to study the cytotoxicity activity of the extracts of this propolis. This propolis acts on MDA-MB-231 cells by inducing apoptosis by increasing the concentrations of Bax, caspase 3 and p53 proteins as well and decreasing Bcl2 and CDK-4 proteins. These results are confirmed by the study of mRNA and cDNA.

In the last part of our work we were interested in the chemical composition of Algerian propolis. After extraction, separation and purification, we obtained 6 pure flavonoids 5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (Cirsimaritine), 7-methoxy 3,5 dihydroxyflavonol (Galangine 7-methoxy), 4',5,7-trihydroxy-3-methoxyflavone (isokampferide), 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine), Apigenin 7-methoxy (Genkwanin) and Apigenin.

Our study demonstrated that all the studied propolis are probably of the poplar type.

### **Key-words:**

Propolis, comparative study, antibiofilm activity, antioxidant activity, cytotoxicity activity, flavonoids, UPLC-ESI-MS/MS.

## المخلص

نهتم من خلال دراستنا بالتركيب الكيميائي والانشطة البيولوجية للعكبر الجزائري. في الجزء الاول من عملنا قمنا بالمقارنة بين عدة انواع من عكبر الشرق الجزائري وفقا لنشاطها المضاد للبيوفيلم و المضاد للسرطان للمستخلصات. وقمنا بتحديد المركبات للمستخلصات الاكثر نشاطا باستخدام

### UPLC-ESI-MS/MS

في الجزء الثاني قمنا بالمقارنة بين نوعين اخرين من العكبر الجزائري وفقا لنشاطها المضاد للاكسدة وقمنا بتحديد مجموع محتويات الفلافونويد وعديدات الفينول من مستخلصات عينات العكبر. عكبر ميلية سجلت اعلى نشاط مضاد للاكسدة . شجعتنا هذه النتيجة على دراسة النشاط المضاد للسرطان لمستخلصات هذه العكبر. يعمل هذا العكبر على خلايا MDA-MB-231 عن طريق تحفيز موت الخلايا المبرمج عن طريق زيادة Bax و caspase 3 و p53 وكذلك انخفاض بروتينات CDK-4 و Bcl2 تم تأكيد هذه النتائج من خلال دراسة mRNA و cDNA .

سمح لنا هذا الجزء الثاني من عملنا باجراء اول تصنيف للعكبر المدروس واختيار اكثر المستخلصان نشاطا لاجراء التحليل الكيميائي . بعد القيام بفصل وتنقية مختلف المركبات تعرفنا على 6 فلافونويدات 5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (Cirsimaritine), 7-methoxy 3, 5 dihydroxyflavonol (Galangine 7-methoxy), 4',5,7-trihydroxy-3-methoxyflavone(isokampferide), 5,7-dihydroxy-flavanone (Pinocembrine), Apigénine , 7-methoxy 1' Apigénine (Genkwanin).

من المحتمل أن يكون كل العكبر الذي تمت دراسته من نوع الحور.

### الكلمات المفتاحية

العكبر. النشاط المضاد للبيوفيلم. النشاط المضاد للسرطان. النشاط المضاد للاكسدة. الفلافونويد

### UPLC-ESI-MS/MS