

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



Université Mohamed Khider Biskra  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Réf:.....

Mémoire de Fin d'Etudes  
En vue de l'obtention du diplôme:

**MASTER**

Filière : Biochimie  
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

*Thème*

**Etude de l'activité antibactérienne de propolis**

**Devant le jury:**

*Président:* Ghiti Hassina

*Promoteur:* Bediada Ibtissem Kahina

*Examineur :* Abekhti Abd ElKader

**Présenté par :**

Khelil Salima

**Promotion : Juin 2014**

# Remerciement

*Je vais d'abord remercier dieu, pour me donner la puissance et de la patience pour faire ce travail pour ramasser tous les temps l'espoir et le rêve d'obtenir cette étape de ma vie, et de donner ma famille peu de bonheur pour leurs fatigue, leurs incertitude afin de fournir à toutes les exigences de l'étude*

J'exprime mon profond remerciement et ma vie reconnaissance à M<sup>me</sup> *Bediada Atissem Kahina*, enseignantes à l'Université de Biskra, pour avoir encadré et dirige ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'accordée m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie les membres de jury M<sup>me</sup> *Ghiti Hassina* et Mr *Abakhti A. Kader* d'avoir bien voulu de juger ce travail.

Je remercie *Khdelil khaled*, docteur au laboratoire de bactériologie au l'Hôpital de Hakim Sâaden Biskra.

Je remercie beaucoup mes copines *Fiana, Sara* pour les sympatriques moments qu'on a passes ensemble et pour ses aides.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participe de prés ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace :*

*Je dédie ce travail à tous ceux que j'aime et que j'estime en particulier :*

- *A mes parents qui m'ont toujours soutenue avec beaucoup d'amour.*

- *A mes sœurs **Radhia** et **Lamia**, leurs enfants*

- *A mes frères **Youcef**, **Nabil**, **Samir** et leurs femmes et aussi leur enfants pour leur amour, leur patience et leur soutien éternel*

- *Pour mon petit frère **Baha** que je l'aime trop en raison de son grand cœur et son beau regard à la vie*

- *A mes cousins et cousines, mes tantes et mes oncles.*

- *A mes chers amis **Hocine**, **Rokaya**, **Mimi**, **Faiza**, **Sara**, **Safa**, **Amira***

*Sans doute, sans oublier, tous les plus grands amis qui venaient dans le monde.*

*Zhelil salima*



# Sommaire

Abréviations.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des photos.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Introduction générale.....	1

## Chapitre I : Généralités sur la propolis

I.1. Définition.....	3
I.2. Historique.....	4
I.3. Origine botanique.....	5
I.4. Récolte.....	6
I.4.1. Période de la récolte.....	6
I.4.2. Par les abeilles.....	6
I.4.3. Récolte de la propolis par l'apiculteur.....	7
I.5. Composition chimique.....	8
I.6. Caractères organoleptique..... ct.....	9
I.6.1. Couleur.....	9
I.6.2. Consistance.....	10
I.6.3. Odeur.....	10
I.6.4. Saveur.....	10
I.6.5. Densité.....	10
I.6.6. Solubilité.....	11
I.7. Activité biologiques de propolis.....	11

<b>I.7.1.</b> Activité antimicrobienne.....	11
<b>I.7.1.1.</b> Activité antibactérienne.....	12
<b>I.7.1.2.</b> Activité antifongique.....	12
<b>I.7.1.3.</b> Activité antiviral.....	12
<b>I.7.1.4.</b> Activité antiparasitaire.....	12
<b>I.7.2.</b> Activité anti tumoral.....	12
<b>I.7.3.</b> Activité antioxydant.....	12
<b>I.7.4.</b> Activité anti inflammatoire.....	13
<b>I.8.</b> Toxicité.....	13
<b>I.9.</b> Conservation.....	13

## **Chapitre II : Activité antibactérienne**

<b>II.1.</b> Définition de l'activité antibactérienne.....	15
<b>II.2.</b> Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	15
<b>II.3.</b> Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	15
<b>II.3.1.</b> Aromatogramme.....	15
<b>II.3.2.</b> Microatmosphère.....	17
<b>II.3.3.</b> Méthode de dilution.....	18
<b>II.3.3.1.</b> Dilution en bouillons.....	18
<b>II.3.3.2.</b> Dilution de gélose.....	18
La lecture.....	19

## **Chapitre III : Matériels et méthodes**

<b>III.1.</b> Matériels e réactifs utilises.....	20
<b>III.2.</b> Présentation de la matière première.....	20
<b>III.3.</b> Extraction.....	20

<b>III.4.</b> Test de l'activité antibactérienne.....	23
<b>III.4.1.</b> Souches bactériennes testes.....	23
<b>III.4.2.</b> Conservation des souches.....	23
<b>III.4.3.</b> Milieu de culture.....	24
<b>III.4.4.</b> Repiquage.....	24
<b>III.4.5.</b> Préparation de l'inoculum.....	24
<b>III.4.6.</b> Préparation de standard de McFarland.....	24
<b>III.4.7.</b> Antibiotiques.....	26
<b>III.5.</b> Calcul de rendement.....	26
<b>III.6.</b> Activité antibactérienne.....	26
<b>III.6.1.</b> Aromatogramme.....	26
1. Préparation des disques.....	26
2. Réalisation de l'aromatogramme.....	26
3. Application des disques.....	27
<b>III.6.2.</b> Méthode de dilution en milieu liquide.....	28

## **Chapitre IV : résultats et discussion**

<b>IV.1.</b> Extraction.....	29
<b>IV.2.</b> Calcul de rendement.....	29
<b>IV.3.</b> Activité antibactérienne.....	30
<b>IV.3.1.</b> Aromatogramme.....	30
<b>IV.3.2.</b> Méthodes de dilution.....	30
1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	34
2. Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	40

**Conclusion**

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# **Synthèse bibliographique**

# **Introduction**

## Introduction générale

Depuis l'époque d'Aristote, la propolis était appelé les larmes des arbres. Elle (colle d'abeille) est une substance résineuse complexe recueillie par les abeilles à partir des bourgeons et les exsudats de certain sources végétales voisines leurs ruche pour boucher les trous dans le ruche ( **BoryanaTrusheva et al., 2011; Thirugnanasampandan1et al., 2012; Maria Migueletal., 2013; Michelle Cristiane Búfalo et al., 2013; Nada Ořsolíc et al., 2013; Paulo Barbeira et al., 2013**).

Les abeilles utilisent cette substance pour se protéger contre les insectes et les micro-organismes, pour sceller les fissures et cavités de leur emboîtement, et pour la préparation aseptique du compartiment de la reine. La propolis est également utilisé pour embaumer envahisseurs morts, évitant ainsi leur décomposition, ce qui provoquerait la croissance nuisible des micro-organismes dans la ruche (**Ortrud Monika Barth et al., 2013**).

La propolis a été utilisée en médecine populaire dans le monde entier depuis plusieurs siècles depuis environ 300 avant JC. La propolis est riche en constituants biochimiques (**Narimane Segueni et al., 2010; Ghassan Sulaimanetal., 2011; Jin-Chul Ahn et al., 2013; Rezzan Aliyazicioglu et al., 2013**).

Elle est composée de 50% de résine, 30% de cire, 10% d'huile essentiel et 5% de pollen, 5% de différent composés organiques. Les propriétés de propolis sont fortement dépend leur origine botaniques Des études antérieures de la propolis sont nombreux, et ont montré que la composition chimique de la propolis dépend la végétation de la région d'où il a été recueilli, et les caractères climatiques la saison et les différences géographiques (**Galvoet al., 2007; Shigenori Kumazawa et al., 2008; Safa Shaheen et al., 2011; Katarína Hroboňova et al., 2013**),

Elle a été signalés à présenter plusieurs effets biologiques, y compris un action immun modulateur, anti-inflammatoire, antioxydant, antiviraux et des propriétés antibactériennes, anti-ulcère et la capacité d'inhiber la division cellulaire, elle a utilise aussi comme anesthésie local, elle a présenté une activité hépato protecteur, Pour cette raison, La propolis est

largement utilisée dans les aliments et boissons à améliorer la santé et prévenir les maladies telles que l'inflammation, les maladies cardiaques, le diabète et le cancer (**Azza et al., 2009; Cui-Ping Zhang et al., 2010; Rui Cai et al.,2012; Hongzhuan Xuan et al., 2011; Tomazevica et al., 2013; Yoshihiro Okamoto et al., 2013**).

Cette étude est réalisée afin de tester l'activité antibactérienne de propolis et d'exploiter ses vertus. Elle a été motivée par:

- La volonté de valoriser un sous-produit de la ruche.
- Avoir une connaissance sur les effets thérapeutiques de propolis. Afin d'améliorer son utilisation.

Notre document sera donc subdivisé en quatre chapitres, initié par une recherche bibliographique sur un abrégé de l'histoire et l'étymologie de la propolis d'abeille, ainsi que son utilisation au cours des siècles et ses activités biologiques. Quant au deuxième chapitre qui élucide les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier chapitre (3<sup>ème</sup> chapitre) présente les méthodes et les techniques qui servent la réalisation de ce travail à savoir :

- L'extraction par l'éthanol avec pourcentage d'eau durant une semaine.
- Evaluation de son activité antibactérienne par la détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide.

En fin, le quatrième chapitre discute les résultats obtenus dans cette étude.

# **Chapitre I: Généralités sur la propolis**

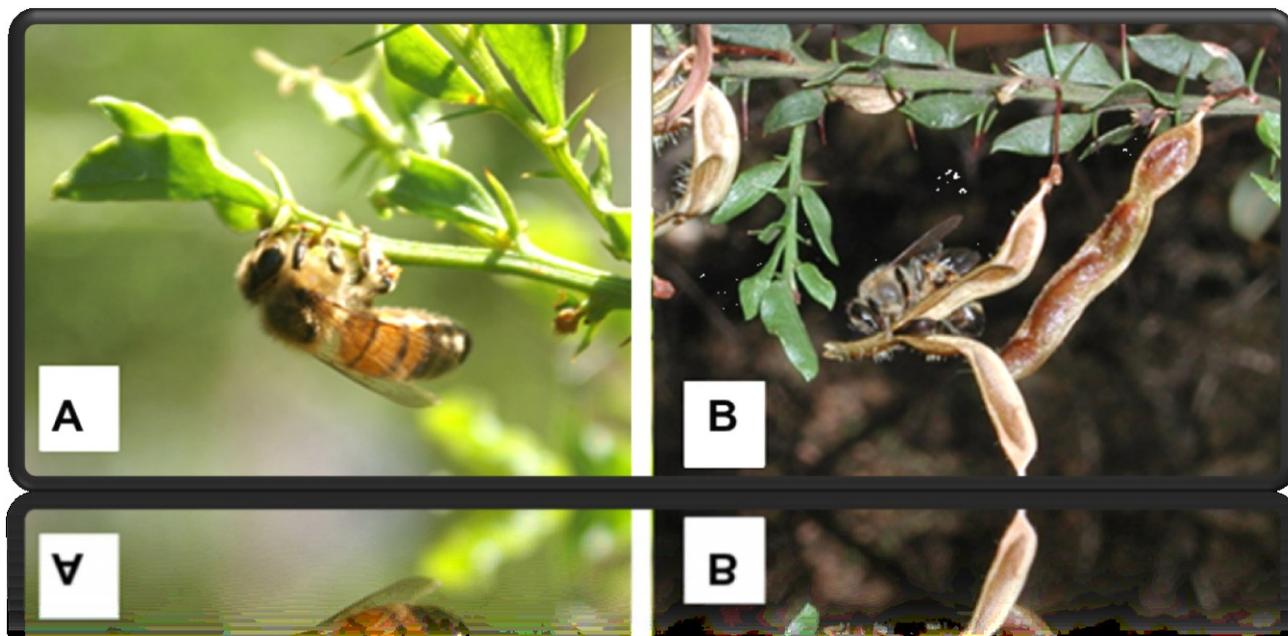
## I.1. Définition:

La propolis ou colle d'abeille est un produit résineux naturel recueillies auprès des bourgeons et des exsudats de certains arbres et des plantes récolté par les abeilles et considéré comme une barrière protectrice contre leurs ennemis ( **Luís Dias et al., 2010; Costel Sârbu et al., 2012; Federica Pellati et al., 2013; Sirivan Athikomkulchai et al., 2013; Soraia Falcão et al., 2013; Angélica Silva et al., 2014; Sherine Rizk et al., 2014; Wael Semida et al., 2014**).

Les composants volatils de la propolis diffèrent sensiblement selon leurs origines géographiques et botaniques, principalement parce que les abeilles recueillent les résines et les exsudats de plantes à partir des sources végétales disponibles. Les sources botaniques les plus importantes de la propolis sont : peupliers (*Populus*), bouleaux (*Betula*), saules (*Salix*), ormes (*Ulmus*), pins (*Pinus*), chênes (*Quercus*), cyprès (*Cupressus*), frênes (*Fraxinus*), épicéa (*Picea*), aulne (*Alnus*) et lemarronnier d'Inde (*Aesculushippocastanum*) (**Cheng et al., 2013; Jaqueline Ferreira Campos et al., 2014**).

La détermination de l'origine botanique de la propolis n'est pas une tâche simple et deux approches ont été appliquées: la comparaison de la composition chimique et l'analyse palynologique (**Begoña Giménez-CassinaLópez et al., 2014**).

La propolis est caractérisé par un ensemble de propriétés biologiques, en effet elle présente une activité antibactériennes, antivirales, antifongique, anti-inflammatoire antioxydant, immunostimulant (**Viuda Martoset al., 2008; Maria Valente et al., 2010; Akio Iio et al., 2012; Federica Pellati et al., 2013; Lagouri Prasianaki et al., 2014**).



**Figure I.1.** Abeilles collecte résine (A) / exsudation de la tige et la gousse (B).

(Van Tran *et al.*, 2012).

## I.2. Historique:

La propolis a été utilisé dans la médecine populaire depuis environ 300 ans avant JC, les peuples anciens comme l’Egyptiens, Grecs, Romain et Incas utilisent les propriétés de la propolis (Abhishek Parolia *et al.*, 2010; Narimane Segueni *et al.*, 2010; Adriana Andrade Carvalho *et al.*, 2012; Nebojša Potkonjak *et al.*, 2012; Bodiniet *al.*, 2013).

Les Egyptiens ont bénéficié des propriétés anti-putréfaction de la propolis pour embaumer leurs morts (José Mauricio Sforcin *et al.*, 2011).

La propolis a été utilisée comme antiseptique et comme agent cicatrisant par les médecins grecs et romains. Les Grecs utilisaient la propolis comme un ingrédient principal d’un parfum exquis appelée « polyanthus », tandis que les anciens Juifs considèrent comme un médicament « tsori » (Abhishek Parolia *et al.*, 2010).

A la fin du 21<sup>ème</sup> siècle, l'important marché de la propolis existe en Russie et Allemagne, son utilisation continue aujourd'hui comme un remède populaire et est disponible en état pur ou combine avec d'autres produits naturels, des produits cosmétique et en tant que constituant d'aliment de santé (Segueni Narimane et al., 2011).

### **I.3. Origine botanique:**

La composition chimique de la propolis est très variable et complexe, en raison de la biodiversité de la végétation de chaque région visitée par les abeilles. Bien qu'il existe quelques exceptions, la principale source de la propolis dans les zones tempérées est l'exsudat de bourgeon des espèces de peuplier avec des flavones, des acides phénolique. Cela a été conclu à partir d'études réalisées avec la propolis de l'Europe, la Nouvelle-Zélande, et en Asie. Des exceptions peuvent être trouvées, par exemple, le type trouvé dans la Russie de bouleau de propolis, qui a son origine dans les espèces comme *Betula verrucosa*, où les principaux composés sont des flavones différents de ceux trouvés dans la propolis des peupliers. Aussi un type de propolis Méditerranée a été trouvé en Sicile, Malte Creteand, dont les composés principaux sont des diterpènes probablement son origine dans l'usine de conifères du genre *Cupressaceae*. (Silvana Libério et al., 2009; Michelle Cristiane Búfalo et al., 2013; Soraia. Falcão et al., 2013; Nadjat Debbache et al., 2014).

.Dans les régions tropicales où il n'y a pas de peupliers, les abeilles trouvent d'autres sources végétales pour la production de propolis. Dans les Sonoran Désert, *Ambrosia deltoidea* a été considérée comme la source végétale (Silvana Falcão et al., 2009).

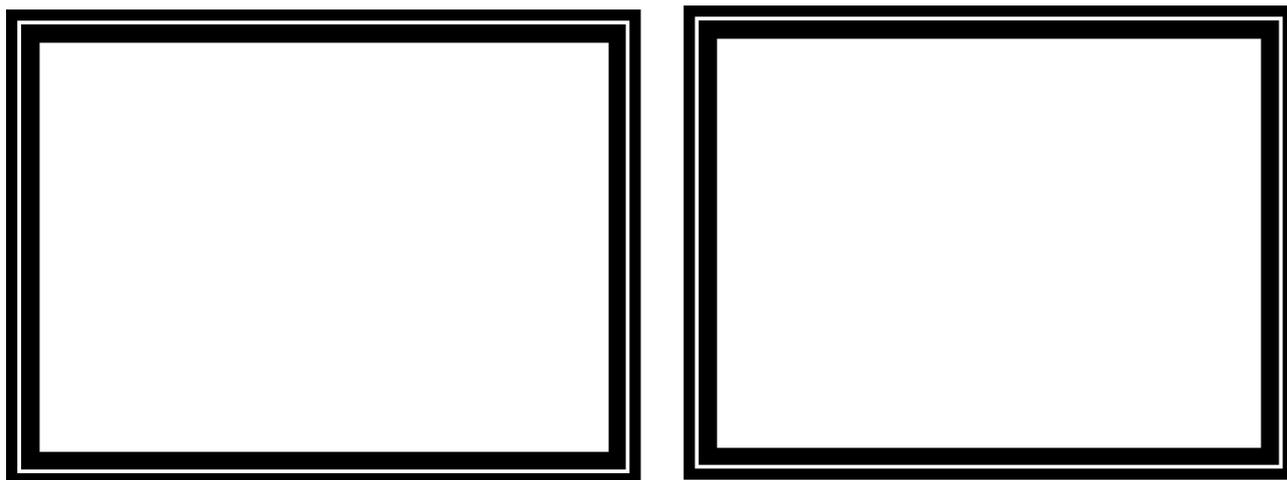
## I.4. Récolte:

### I.4.1. Période de récolte:

La récolte s'opère dès le printemps et ce jusqu'à l'automne. Cependant les apports en propolis sont plus importants en fin de miellée et à l'automne. La propolis est récoltée par une journée chaude ( $T^{\circ} > 20^{\circ}\text{C}$ ) et entre 10h00 et 16h00. Les raisons de cela se trouvent dans le fait que sa consistance est différente selon la température ambiante (voir plus loin). En période de sécheresse, la récolte de propolis serait un dérivatif à la récolte de nectar. Cependant une colonie peu récolter en moyenne jusqu'à 300 gramme par ans (**Ferhoum Fatiha., 2010**).

### I.4.2. Par les abeilles :

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie (la récolte du nectar par exemple) et cela même si la demande s'en fait sentir. Leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche. (**Ferhoum Fatiha., 2010**).

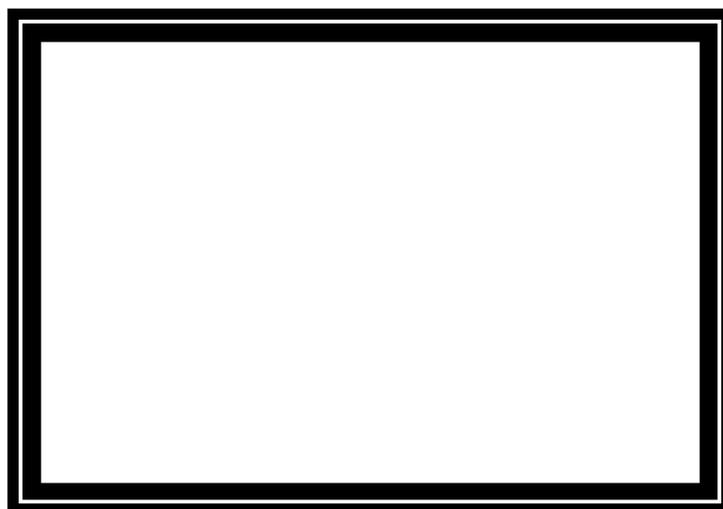


**Figure I.2.** La collecte de propolis par *Apis mellifera* partir de *Baccharisdracunculifolia* au Brésil, (a) *Apis mellifera* collecte des sommets des feuilles de *Baccharisdracunculifolia*, (b) le dépôt de fissures de propolis vert dans la ruche (**Viviane Cristina Toreti et al., 2013**).

### I.4.3. Récolte de la propolis par l'apiculteur:

La récolte de la propolis peut se faire par grattage des cadres, couvercles cadres et coins de la ruche lors des visites de celle-ci. Bien que ce n'est pas la meilleure méthode pour avoir de la propolis pure, elle reste néanmoins facile et permet aussi à l'apiculteur de conserver la ruche et les cadres propres et peu collants. Ce qui facilite son travail. Cette méthode permet une récolte de propolis qui contient beaucoup d'impuretés comme les morceaux de bois, les pattes ou ailes d'abeilles, de la cire etc (**Segueni Narimane., 2011**).

Il faudra alors la purifier avant toute utilisation. Une autre méthode qui permet de récolter de la propolis contenant moins d'impureté, consiste à utiliser une grille à propolis que nous plaçons en lieu et place du couvre cadre. Cette grille perforée en plastique souple va stimuler les abeilles à venir combler ces interstices par de la propolis. L'apiculteur n'aura alors plus qu'à retirer cette grille une fois remplie de propolis, la placer dans un endroit frais (frigo) de manière à rendre la propolis cassante. Ainsi par simple torsion de la grille au-dessus d'un récipient ou d'un linge propre, il pourra récupérer la propolis (**Segueni Narimane., 2011**).



**Figure I.3.** Détail de la récolte du cadre de propolis placé entre le couvercle et le corps de la ruche. La propolis est déposée dans l'espace de 2 cm entre les lattes de bois (**Daniel Nicodemo et al., 2013**).

## I.5. Composition de la propolis:

En général, la propolis est composée de 50% de résine (contenant flavonoïde et l'acide phénolique et de légumes baumier, 30 % de cire, 10 % d'huiles essentielles et aromatiques, 5 % de pollen et de 5% diverses autres substances. Cire et les débris organiques sont éliminés durant le traitement, habituellement par extraction éthanolique, et la teinture de propolis (sapin) ainsi obtenu, contient les constituants bioactifs essentiel de la propolis (**Nerida Coleetal., 2009; Vanna Francine de Castro Ishida et al., 2010; El Sayed El Ashry et al., 2012; Federica. Pellati et al., 2013**).

Plus de 300 composés, dont les poly phénols, les terpènes, les stéroïdes, les sucres et les acides aminés Les acides aliphatiques, les esters, les acides aromatiques, les acides gras, les hydrates de carbone, les aldéhydes, les acides aminés, les cétones, les chalcones, les dihydrochalcones, les vitamines telles que B1, B2, B6, C et E et les substances minérales tels que le Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn et Fe et Pb. En outre, il contient certaines enzymes comme déshydrogénase succinique, glucose- 6-phosphatase, l'adénosine tri phosphatase et de l'acide phosphatase. leur abondance est influencée par les facteurs botanique et géographique, ainsi que par la saison de collecte (**Katarína Hroboňová et al., 2008; Nick Kalogeropoulos et al., 2009; Mahmoud Lotfy., 2010; Reda ElMazoudy et al., 2011; Cristina Manuela Mihai et al., 2012; Dungporn Teerasripreecha et al., 2012; Ghada A Elbaz et al., 2012; Shangji Gong et al., 2012; Caroline Olivieri da Silva Frozza et al., 2013; João Carlos Silva et al., 2013; Fábio Henrique Fernandes et al., 2014**).

**Tableau I.1.** Quelques types de propolis les plus répandus avec leurs principales familles de composés poly phénoliques. (Cardinault *et al.*, 2012).

Type de propolis	Origine géographique	Origine botanique	Principaux constituants
Peuplier Ambrée à brune	Europe, Amérique du Nord, région non tropicales de l'Asie, Nouvelle Zélande.	<i>Populus spp.</i> Et principalement <i>P.nigra.L.</i>	Flavones, flavonones , acides phénols et ses esters et sesquiterpènes
Verte du Brésil	Zone tropicale du Brésil.	<i>Baccharis spp.</i> principalement <i>B. dracunculi folia</i> DC	rivés prénylés de l'acide coumarique Acides diterpéniquesLignanesDe
Bouleau	Nord de la Russie	<i>Betulaverrucosa</i>	Flavones, flavonols, flavonones et sesquiterpènes

## I.6. Caractères organoleptique :

Les différences d'origine végétale provoquent également les variations dans les propriétés de la propolis, telles que l'activité biologique, la texture, la saveur et la couleur. (Kohsuke Shimomura *et al.*, 2013).

### I.6.1. Couleur :

Selon les États-Unis de l'agriculture (USDA), La propolis est une gomme collante qui a été récolté par les abeilles de différentes plantes, dont la couleur varie de vert jaune au brun foncé en fonction de sa source et l'âge. Il peut être comparé à un composé aromatique collé (Burdock., 1998; Astrid Nathalie Karine Toullec., 2008; Jaroslav Pochop *et al.*, 2011; Thirugnanasampandan *et al.*, 2012; Maryam Zare Jahromi *et al.*, 2013; Sharafet *al.*, 2013).

### I.6.2. Consistance :

Les abeilles récoltent sur les bourgeons et l'écorce de nombreux arbres une substance résineuse qu'elles mélangent avec de la cire pour créer la propolis et qu'elles utilisent pour boucher, consolider, climatiser et aseptiser la ruche. La consistance de la propolis à des températures supérieures à 30°C, la propolis est molle et très collante, en dessous de 15° C par contre, elle est dure et friable (Stefan Bogdanov et *al.*, 2006).

**Tableau I.2.** Caractéristiques organoleptiques et physiques de la propolis recueillies

(Dora Valencia et *al.*, 2012).

Saison	Quantité de propolis récoltées (mg)	Aspect physique	Couleur	Consistance
Printemps	45	Terreux	Vert brun	Collante
Été	245	Flocon	Vert brun	Non collante
Automne	60	Terreux	Brun jaune	Collante
Hiver	8	éclat, comme l'apparence	Vert brun clair	Très collante

### I.6.3. Odeur :

Elle possède une odeur aromatique qui varie selon la provenance: en général, odeur de miel, de cire à laquelle s'ajoute selon l'origine celle des bourgeons visités. Généralement la propolis a une odeur marquée et agréable de résine (Stefan Bogdanov et *al.*, 2006).

### I.6.4. Saveur :

De saveur souvent âcre et parfois amère (Segueni Narimane., 2011).

### I.6.5. Densité :

Elle est de l'ordre de 1,2 moyen (Ferhoum Fatiha., 2010).

### **I.6.6. Solubilité :**

La propolis ne peut pas être utilisée directement en tant que matière première en raison de sa structure complexe. Les solvants les plus couramment utilisés dans l'extraction sont: l'eau, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther, et l'acétone. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (**Coneac et al., 2008; Segueni Narimane., 2010; Vijay Wagh et al., 2012; Supakit Khacha ananda et al., 2013**).

- Le pourcentage d'impureté est de 18 à 34 % (**Segueni Narimane., 2010**).
- Le pourcentage d'humidité est de 5,07 % (**Segueni Narimane., 2010**).

### **I.7. Activités biologiques de la propolis:**

La propolis possède un large spectre d'activité biologique (**Ferhoum Fatiha., 2010**):

#### **I.7.1. Activité antimicrobienne :**

Des nombreuses études ont démontrés que la propolis présente une activité antimicrobienne sur les souches à Gram positif, Gram négatif, les bactéries anaérobies et à la fois aérobie, cet effet dépend de la souche étudiée, de l'origine de la propolis et du solvant utilisé. De plus, la propolis possède des propriétés antifongiques, antiparasitaire et antiviral (**Nick Kalogeropoulos et al., 2009; Segueni Narimane., 2010; Dora Valencia et al., 2012**).

##### **I.7.1.1. Activité antibactérienne :**

L'activité antibactérienne de la propolis a été confirmée par de nombreuses études scientifiques. Bien que la composition de la propolis varie considérablement en fonction de son origine botanique tous les types examinés de propolis révèlent une forte activité antibactérienne due à la flavonoïde, l'acide phénolique (**Abhishek Parolia et al., 2010; Bodini et al., 2013; Emrah Torlak et al., 2013**).

### **I.7.1.2. Activité antifongique :**

La propolis de peuplier recueillies par *Apis mellifera caucasica* par la Turquie à une activité antifongique plus élevée que celle recueillies par *Apis mellifera* et *Apis mellifera anatolica carnica*. D'autre part, les propriétés antifongiques et antivirales de la propolis d'origine botanique et géographique différente était similaire (**Stefan Bogdanov., 2012; Bodini et al., 2013**).

### **I.7.1.3. Activité antiviral :**

Les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus: myxovirus, poliovirus, coronavirus, rota virus, adénovirus. Ainsi, la propolis et certains de ses constituants (apigénine, chrysin) possèdent un effet prophylactique contre le virus de la grippe, en atténuent les symptômes à travers une action anti-neuraminidase (**Cardinault et al., 2012; Stefan Bogdanov., 2012; Bodini et al., 2013**).

### **I.7.1.4. Activité anti parasitaire :**

Quelques études ont montré que la propolis était efficace contre les trichomonas, les trypanosomes (responsable de la maladie du sommeil), la leishmania ou *Giardia lamblia* (parasitose intestinale) qui sont pour la plupart des parasites très répandus dans les pays tropicaux et subtropicaux (**Cardinault et al., 2012**).

### **I.7.2. Activité anti tumorale:**

La teinture de propolis a un effet cytotoxique qui permet d'inhiber les cellules tumorales Héla avec une CI50 de 7,45 mg/ml. La propolis verte du Brésil fait l'objet de plusieurs recherches, au Japon entre autres, pour ses propriétés anticancéreuses (**Burdock., 1998; Ghedira et al., 2009; Nick Kalogeropoulos et al., 2009; Dora Valencia et al., 2012**).

### **I.7.3. Activité antioxydant:**

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants: vitamines E et C et des poly phénols. Les études ont montré que l'activité antioxydant de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en poly phénols (**Nick Kalogeropoulos et al., 2009; José Maurício Sforcin et al., 2011; Cardinault et al., 2012**).

### **I.7.4. Anti-inflammatoire:**

Les extraits de propolis inhibent significativement l'augmentation de l'interleukine-6 (IL-6), mais n'agissent pas sur les taux d'interleukine-2 (IL-2) et d'interféron gamma (IFN-gamma). Elle agit en inhibant l'activation et la différenciation des macrophages mononucléaires. La propolis, par ses flavonoïdes, retarde l'inflammation de la pulpe dentaire (pulpite) qu'elle protège en la chapotant et stimule la réparation de la dentine. Cet effet est utilisé dans l'inflammation de la gencive (**Burdock., 1998; Ghedira et al., 2009; Nick Kalogeropoulos et al., 2009; Simões-Ambrosio et al., 2010; Dora Valencia et al., 2012; José Maurício Sforcin et al., 2012; Lucas Gressler et al., 2012**).

### **I.8. Toxicité :**

La dermatite de contact est une réaction allergique bien documentés à la propolis, avec environ 200 cas signalés dans la littérature au cours des 70 dernières années, mais il a été démontré que la propolis n'est pas toxique pour les humains ou les mammifères sauf dans le cas de très grandes quantités administrés (**Mohammadzadeh Shiva et al., 2007**).

### **I.9. Conservation :**

La propolis est généralement conservée dans des récipients sombres, à l'abri de la lumière et de la chaleur. Elle peut être lyophilisée, processus qui en conserve les propriétés physiques et chimiques. En Europe de l'est, il est fréquent de dissoudre la propolis dans de l'alcool éthylique. Cet extrait est à son tour dissous dans une solution organique amine. La solution ainsi obtenue est ensuite filtrée et les résidus de cire sont éliminés. Elle est alors

soluble dans une solution aqueuse et peut être lyophilisée (**Blanc Mickaël., 2010; Nicola Bradbear., 2010**).



(a)



(b)

**Figure I.4. (a) propolis dans la ruche, (b) propolis après la récolte (Blanc Mickaël., 2010).**

## **Chapitre II : Activité antibactérienne**

## **II.1. Définition de l'activité antibactérienne :**

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un composé à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibiotique varie selon la nature de l'antibiotique. Face à un antibiotique donné. La sensibilité d'une bactérie peut être très différente selon la souche d'appartenance (Allane Tous., 2009).

## **II.2. Définition de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible comparativement au témoin, après un temps d'incubation à 37 °C. La CMI a été déterminée par dilution en milieu liquide, ce milieu étant représenté soit par du bouillon de Mueller-Hinton soit bouillon nutritif glycoluse selon les méthodes du Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) (Rula Darwish et al., 2010; Cheurfa et al., 2013).

## **II.3. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :**

L'activité antibactérienne est souvent testée comme il est courant dans les échantillons de propolis et de nombreuses méthodes ont été employées, avec divers degrés de succès. Le procédé de diffusion dans de la gélose est souvent utilisé pour le criblage des échantillons contre un réseau de micro-organismes et le paramètre de l'activité est le diamètre de la zone d'inhibition. Cela peut être trompeur (Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya<sup>1</sup>, 2011).

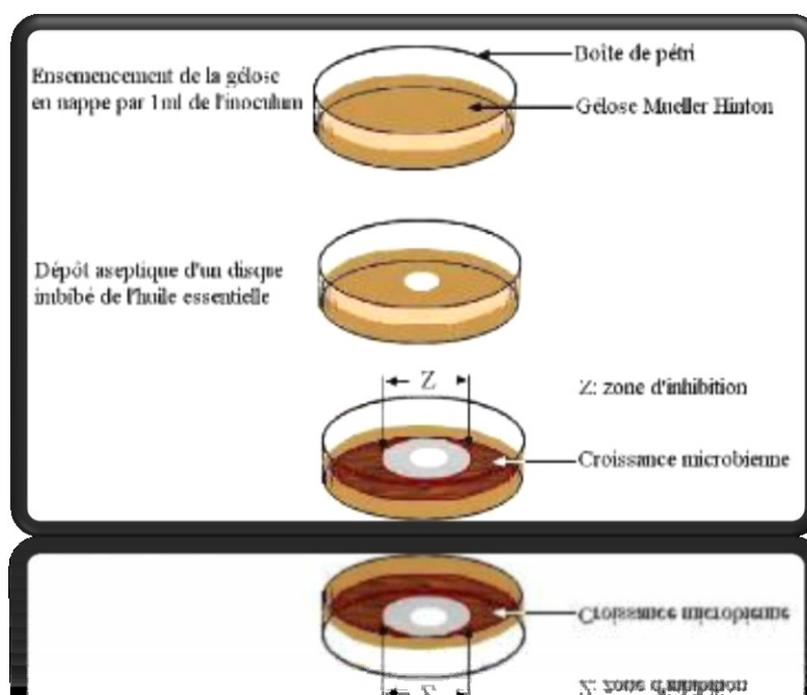
### **II.3.1. Aromatogramme :**

Aromatogramme d'un produit est testée pour son pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion des disques. Les boîtes de pétri contenant le milieu Mueller-Hinton agar sont inondées par 1 ml du pré-culture des bactéries pathogènes. Après un séchage de 30 minutes à 37 °C, des disques en papier buvard (6 mm de diamètre) imprégnés de 50 µl du produit à tester sont déposés à la surface de la gélose avec trois répétitions. Les boîtes de pétri

ainsi préparées sont pré incubées dans des conditions réfrigérées pendant deux à quatre heures à +4 °C afin de permettre la diffusion de l'agent inhibiteur qui sera suivie par l'incubation pendant 24 heures à 37 °C. L'absence de croissance microbienne autour des disques se traduit par un halo translucide; le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre (mm) Les zones doivent être uniformément circulaires (Qaralleh et al., 2010; Hellel zohra., 2011; Aouni et al. , 2013; Cheurfa et al., 2013; Frouhat Zoulikha et al., 2013; Chiki Ilyas., 2014).

Selon Barros et Coll. (2007), l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (-),
- Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+),
- Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (++) ,
- Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+++) ,
- Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (++++)



**Figure II.1.** Illustration de la méthode d'aromatogramme (FrouhatZoulikha et al., 2013).

### II.3.2. Microatmosphères:

Dérivé de la méthode précédente; le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. (Maria-CécilePibiri., 2006; Attou Amina., 2011).

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de produit à tester au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'huile essentielle entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée et placée couvercle en bas à l'étuve à 37°C (Bactéries) (Khadija Rhaour., 2002).

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées, l'essence n'agit qu'à l'état des vapeurs qu'elle développe à 37°C. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum. Chaque essai est répété en double. Après l'incubation, la croissance est comparée à celle du témoin. La quantité minimale inhibitrice est définie comme la plus petite quantité pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit. Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne des produits, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à température d'incubation (Benabdallah Fatima Zohra., 2012; Chikhi Ilyas., 2014).

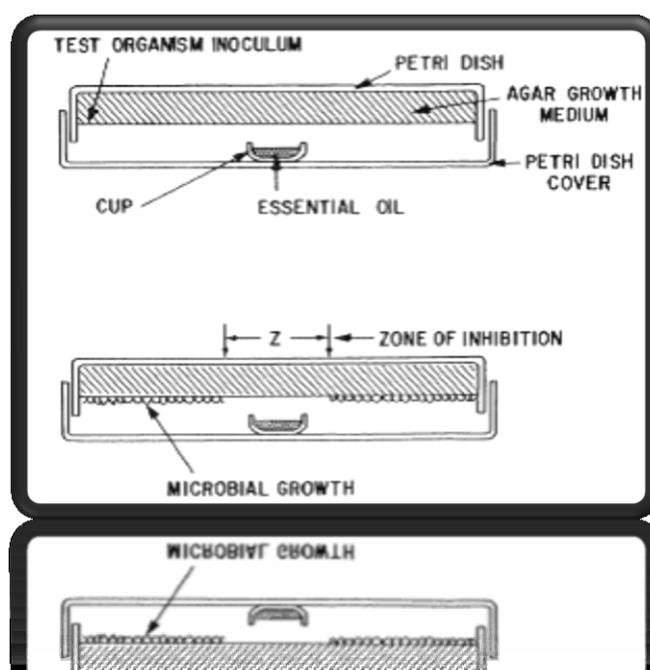


Figure II.2. Illustration de la méthode des microatmosphères (Maria-CécilePibiri., 2006).

### II.3.3. Méthode de dilution :

Grâce aux méthodes de dilution, on peut déterminer les valeurs de la CMI et de la CML (CMB). Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose et en bouillon. La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Elle est confirmée par la recherche de la CMB. La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibiotique qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale.

La sensibilité d'une bactérie est mesurée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique considéré. C'est la méthode de référence préconisée par l'organisation mondiale de la santé (OMS). La CMI d'un germe donné peut être mesurée par différents procédés (**Chikhi Ilyas., 2014**).

#### ✓ La dilution en bouillon :

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution).

L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses. Elle est utilisée aussi pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (**Kechkar Madina., 2008; Chaker El Kalamouni., 2010; Qarallehet *al.*, 2010**).

#### ✓ La dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de

l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte (**Chaker El Kalamouni., 2010**).

✓ **La lecture :**

Après incubation durant 18 heures, les valeurs des CMI sont mesurées. Cette CMI est la plus petite quantité d'antibiotique (ATB) capable d'inhiber une croissance visible à l'œil nu. On détermine la CMB en transférant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance dans un milieu frais dépourvu d'antibiotique. La concentration d'antibiotique la plus faible à laquelle les micro-organismes ne se développent pas dans ce nouveau milieu est la CMB (**Harley et al., 2010**).

# **Partie expérimentale**

## **Matériels et méthodes**

### III.1. Matériels et réactifs utilisés:

#### III.1.1. Matériels utilisés

- Balance de précision : KERN ABT. 220-5 DM.
- Etuve microbiologique
- Papier chromatographie standard.
- Rotavapeur : 591-11200-2 Nr. Heidolph

#### III.1.2. Réactifs utilisés

- Gélose nutritif
- Milieu de Chapman
- Milieu d'Hektoën
- Milieu de Mueller Hinton : M173-500G.

### III.2. Présentation de la matière première:

L'échantillon de propolis récolté au 13 novembre 2013 à été fourni par l'apiculteur de la région Héla Khenchla. Cette région est caractérisé par un tapis végétal varies entre *Genévrier*, *Pinus sylvestris*, *Rosmarinus officinalis* et *Olea europeae*. Le poids est égal à 30g, la conservation de l'échantillon a été faite à froid. La récolte a été effectuée par recalage des cadres.

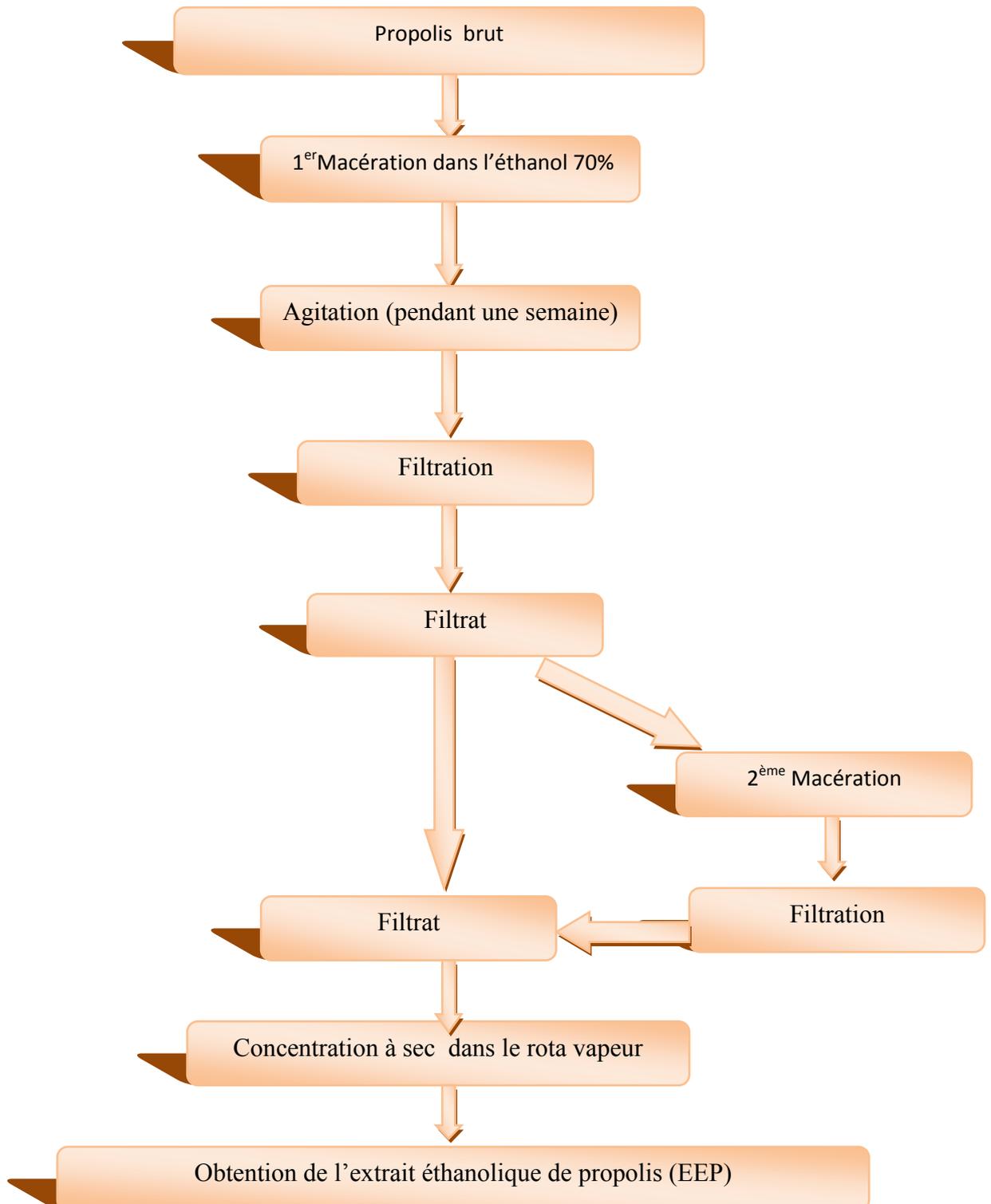
### III.3. Extraction :

Tous les échantillons de propolis ont été conservés au congélateur (- 20° C) pendant 48 h avant d'être utilisés. L'extraction des substances bioactives de la propolis est réalisée par macération dans l'éthanol 70% (V/V), celui-ci possède l'avantage d'être plus facilement éliminé sous vide, il donne en plus un meilleur rendement d'extraction (7 fois plus que celui d'eau la propolis est additionnée de dix volumes de solvant de son poids (pour 30 g de propolis, nous ajoutons 300 ml de solvant). Le mélange est laissé pour macération pendant une semaine avec agitation de temps en temps à l'abri de la lumière.

Les suspensions ont été maintenues pendant une semaine, ils ont été filtrés sur papier filtre (Papier filtre quantitatif, Roth) et la procédure a été répétée deux fois, la solution a été concentrée au rotavapeur à 110°C, L'extrait obtenu est appelé Extrait Ethanolique de Propolis (EEP). L'EEP est conservé au réfrigérateur à -4°C à l'abri de la lumière.



**Photo III.1.** Propolis brut (Héla khanchela).



**Photo III.2.** Protocole d'extraction.

### III.4. Tests d'activité antibactérienne :

#### III.4.1. Souches microbiennes testées :

Les germes testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'EEP sont présentés dans le tableau ci-dessous:

**Tableau III.1.** Souches bactériennes testées.

Souche bactérienne	Gram	Famille	Source
<i>Enterococcus faecalis</i> « pus » <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	Positive	<i>Enterococcaceae</i> <i>Staphylococcaceae</i>	Laboratoire central d'hôpital Dr Saâdan
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Négative	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i>	

#### III.4.2. Conservation des souches :

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

### III.4.3. Milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- Milieu de Chapman pour l'isolement de *Staphylococcus aureus*.
- Milieu de Hecktoen pour l'isolement d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Milieu de Mueller Hinton pour l'isolement d'*Enterococcus faecalis*, pour l'étude de la sensibilité des bactéries.

### III.4.4. Repiquage :

Le repiquage consiste à prendre une colonie à partir d'une culture bactérienne conservée (congelée) et la mettre dans 2 à 3 ml d'eau physiologique puis on laisse 20 minutes.

A l'aide d'une pipette pasteur on prend une goutte de cette suspension et on l'ensemence sur le milieu de culture qui est coulé préalablement dans une boîte de pétri. En fin on incube à 37°C.

### III.4.5. Préparation de l'inoculum:

On prélève 3 à 5 colonies à l'aide d'une pipette pasteur stérile à partir d'une pré-culture (culture pure de 18 à 20 heures), on l'introduit dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile. Les souches bactériennes ont été utilisées pour l'étude in vitro de l'activité antibactérienne. Toutes ces étapes ont été réalisées dans des conditions stériles.

### III.4.6. Préparation des McFarland standard No. 0.5 :

Le standard McFarland 0.5 correspond approximativement à une suspension homogène d'*Escherichia coli* de  $1.5 \times 10^8$  cellules par ml.

**Tableau III.2** : Les valeurs de McF pour chaque souche étudiées

L'espèce	Standard McFarland 0.5
	Etallement par inondation
<i>Escherichia coli</i>	Inoculum est équivalent au standard de <b>McF 0.5</b> ( $\sim 10^8$ UFC/cm <sup>3</sup> ).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inoculum est équivalent au $10^6$ UFC/cm <sup>3</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	

**III.4.7. Antibiotiques :**

Les antibiotiques utilisés dans ce test comme témoin positif sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III.3.** Les antibiotiques utilisés comme témoin positif contre les souches étudiés.

Antibiotique	La dose (mg/disc)	Germe sensible	Gram
Tétracycline «TE»	30	<i>Staphylococcus aureus</i>	positif
Tétracycline «TE»	30	<i>Enterococcus faecalis</i>	positif
Ticarcilline «TCC»	30	<i>Escherichia coli</i>	négatif
Ticarcilline «TCC»	75/10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif

### III.5. Calcul de rendement :

Il s'agit d'une macération de la propolis dans l'éthanol (70%) puis détermination du rendement.

#### Expression des résultats

$$TE (\%) : (M_i - M_f) / M_i \times 100$$

- **M<sub>i</sub>** : masse initiale
- **M<sub>f</sub>** : masse finale.

### III.6. Activité antibactérienne:

Nous avons utilisé la technique NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standars).

#### III.6.1. Aromatogramme :

##### 1. Préparation des disques :

Les antibiotiques habituellement testés existent sous forme de disques de 6 mm de diamètre. Pour reproduire les mêmes conditions, nous avons utilisés le papier de chromatographie standard coupé en disques (6 mm). Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois découpés, seront stérilisés.

##### 2. Réalisation de l'antibiogramme :

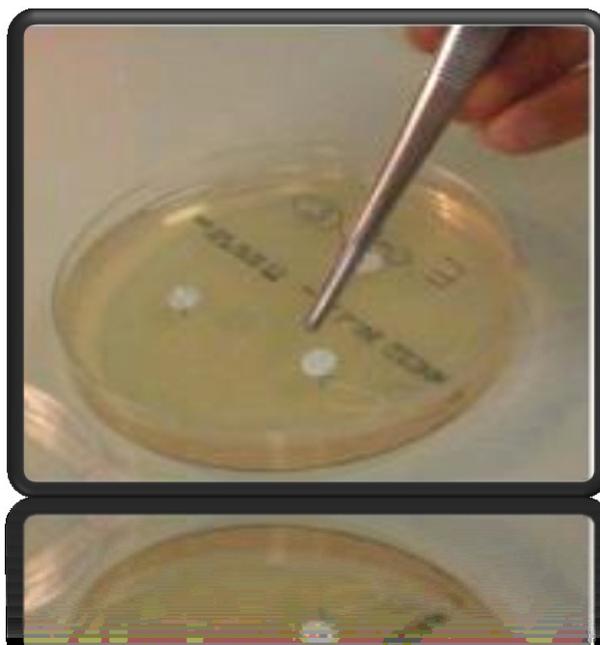
Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non. Pour les bactéries non exigeantes, la gélose Mueller-Hinton est coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont ensuite pré-séchées. L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 18 heures sur milieu d'isolement comme suit: de deux à cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide de l'anse de platine puis déchargées dans 10 ml

d'eau physiologique stérile à 0,9%. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum par inondation. Inonder la boîte entière avec 2 à 4 ml de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette pasteur, puis aspirer le surplus de la suspension aussi par pipette pasteur, finalement laisser sécher les boîtes 15 minutes à température ambiante à proximité de la flamme.

### 3. Application des disques :

Pour chaque boîte de pétri, des disques de papier chromatographie standard de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de Mueller Hinton (MH) après avoir été chargés de 10  $\mu$ l de dilution de l'EEP dans diméthylsulfoxyde (DMSO), d'autres disques chargés de 10  $\mu$ l d'eau sont utilisés comme témoins négatifs. L'antibiotique sera utilisé comme témoin positif, un antibiogramme est effectué en parallèle avec les chromatogrammes, le test est répété trois fois. Après 24h d'incubation à 37 °C, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré.



**Photo III.3.** Application des disques.

### **III.6.2. Méthode de dilution en milieu liquide :**

La méthode de dilution en bouillon, a pour but de déterminer la CMI pour *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* et *E. feacalis*, c'est-à-dire la plus petite concentration de l'EEP qui peut inhiber totalement la multiplication bactérienne après 8 à 24 h d'incubation.

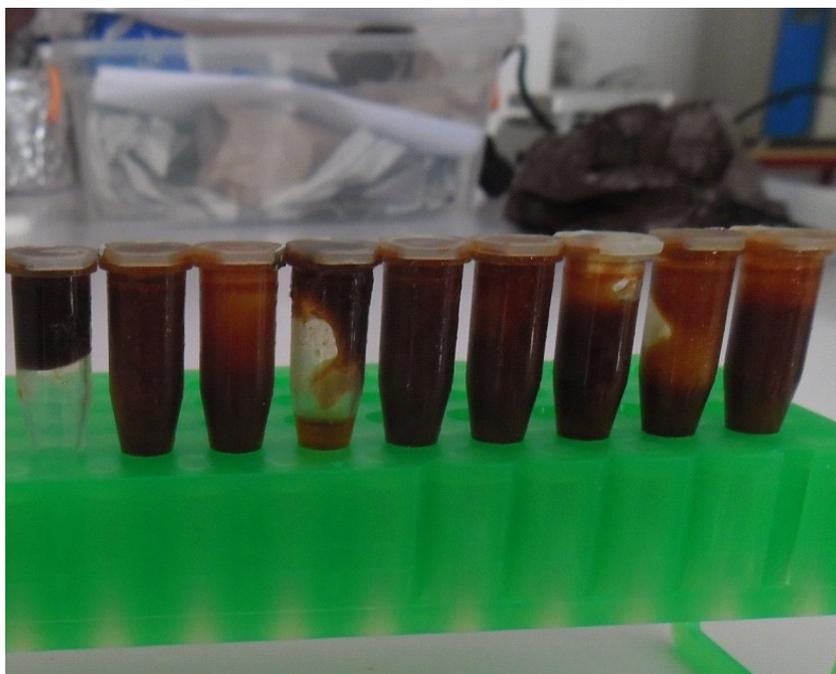
Le principe consiste à réaliser des dilutions croissantes d'une solution mère d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide que l'on ensemence avec un inoculum calibre de la souche à étudier. Après 24 h à 37° C, la plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la culture microbienne est qualifiée de CMI.

## **Résultats et discussion**

### VI.1. Extraction :

La propolis a un aspect hétérogène. Elle est d'une consistance rigide et d'une odeur agréable. De couleur noir-brun. Après extraction; la propolis est molle et malléable. Notre résultats a en accord avec (Azza et al., 2009).

Selon Pietta(2002), la propolis ne peut pas être utilisée comme matière première, elle doit être purifiée par extraction. L'extrait de propolis peut représenter une nouvelle option, car cette substance est facile à obtenir et peu coûteuse, en plus peut montrer des effets bénéfiques (GhadaElabaz et al., 2012).



**Photo VI.1 :** Extrait éthanolique de propolis EEP.

### VI.2.Calcul du rendement :

L'extrait récupéré par le solvant a été pesé pour déterminer le poids sec après évaporation à sec. Le rendement a été déterminé par rapport à 30 g de propolis brut, rendue en petit morceaux subissant une extraction à température ambiante pendant une semaine.

Notre rendement est égal à 36.66%, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Ferhoum Fatiha. (2010)** qui a obtenu des taux de rendement variant de 26.6 % à 75,8 % pour l'éthanol 70 %.

En effet, le solvant le plus souvent utilisé est l'éthanol contenant différents pourcentages d'eau. L'éthanol 70% permet d'extraire les principaux composants actifs de propolis mais pas les cires. Comme la propolis peut contenir jusqu'à 20-30% de cire, ce solvant a été appliqué dans de nombreuses études.

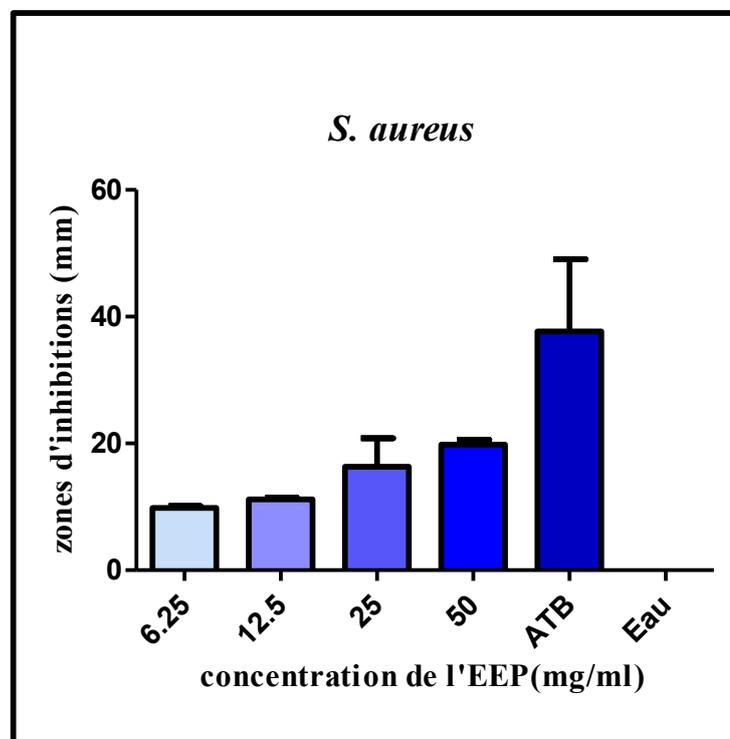
### **VI.3. Activité antibactérienne:**

#### **VI.3.1. Aromatogramme :**

Les disques imprégnés de 10µl d'extrait éthanolique de propolis sont testés par la méthode NCCLS contre les souches de référence (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 et *P. aeruginosa* ATCC 27853) ainsi que la souche pathogène (*E. faecalis*).

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches bactériennes ont une sensibilité vis-à-vis de la propolis mais avec un degré de sensibilité différent.

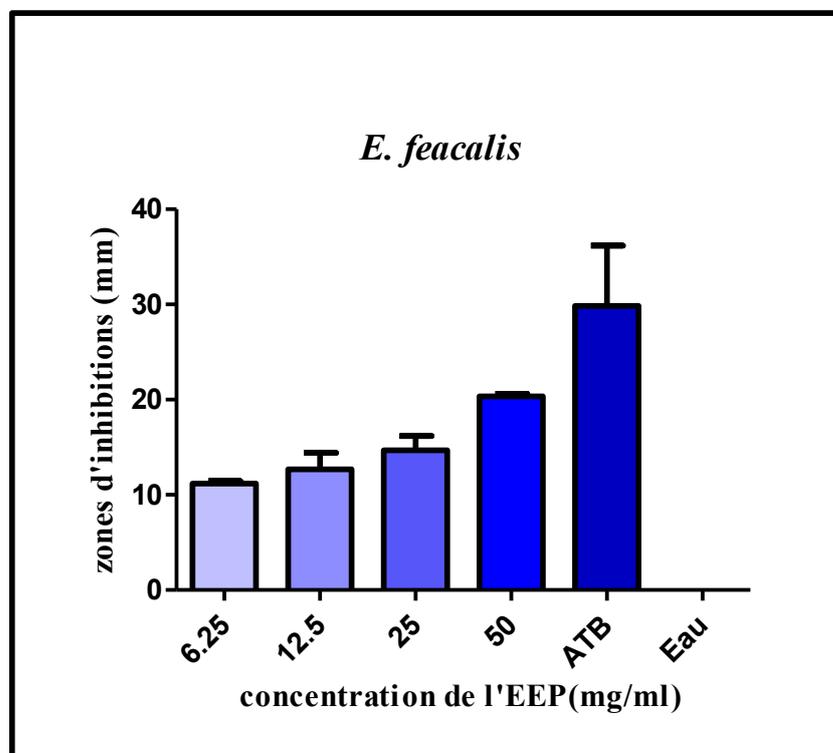
✓ *S.aureus* :



**Photo VI.2.**Résultats de l'aromatogramme pour *S. aureus*. (Mesure par SD)

On note que les zones d'inhibition les plus large ont été observés pour *S. aureus* (10-20.5 mm), nos résultats sont similaires aux zones d'inhibition obtenus pour la propolis de l'Argentine ( $\geq 10$  mm) et de Bulgarie (20 mm), de Serbie ( $\geq 15$  mm), de Mongolie (24mm), d'Egypte (24.3mm), d'Albanie (21.8mm) et de Brésil (21.8mm)(Nieva Moreno et al.,(1999);Prytyk et al.,(2003); Boyanova et al., (2012); Kujumgiev et al.,(1999).

✓*E. feacalis* :

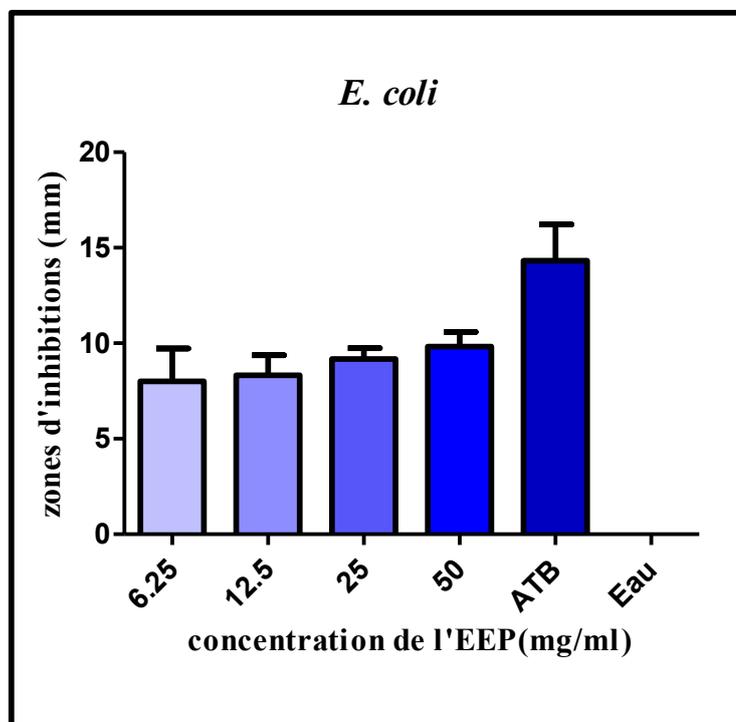


**Photo VI.3.** Résultats de l'aromatogramme pour *E. feacalis*. (mesure SD)

*E. feacalis* présente une zone d'inhibition varie de 10-21.5 mm. En effet, selon **Maryam Ehsani et al. (2013)** l'*E. feacalis* présente une zone d'inhibition égale à 17.5 mm, le même résultat a été observé par **Anurak Phankhongsap et al.(2012)** avec une zone d'inhibition de 10 mm.

Tandis que, **Srdjan Stepanović et al.(2003)** ont montré que la zone d'inhibition obtenue pour la propolis de Serbie est de 6-7 mm.

✓*E. coli* :

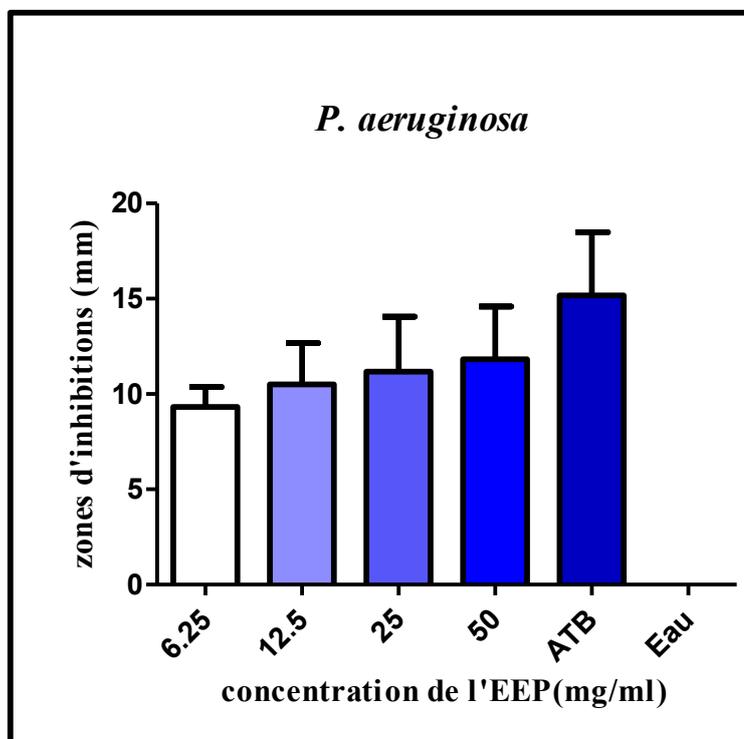


**Photo VI.4.**Résultats de l'aromatogramme pour *E. coli*.(mesure par SD)

On note que la zone d'inhibition est de 7-10 mm, les mêmes résultats ont été obtenus par **Motior Rahman M et al.(2010)** (10 mm);**Jiri Trousil et al. (2013)** (9mm).

Tandis que les résultats obtenus par **Wei-Cai Zeng et al.(2012)**qui ont montré que la zone d'inhibition varie de 16.5-26.5 mm.

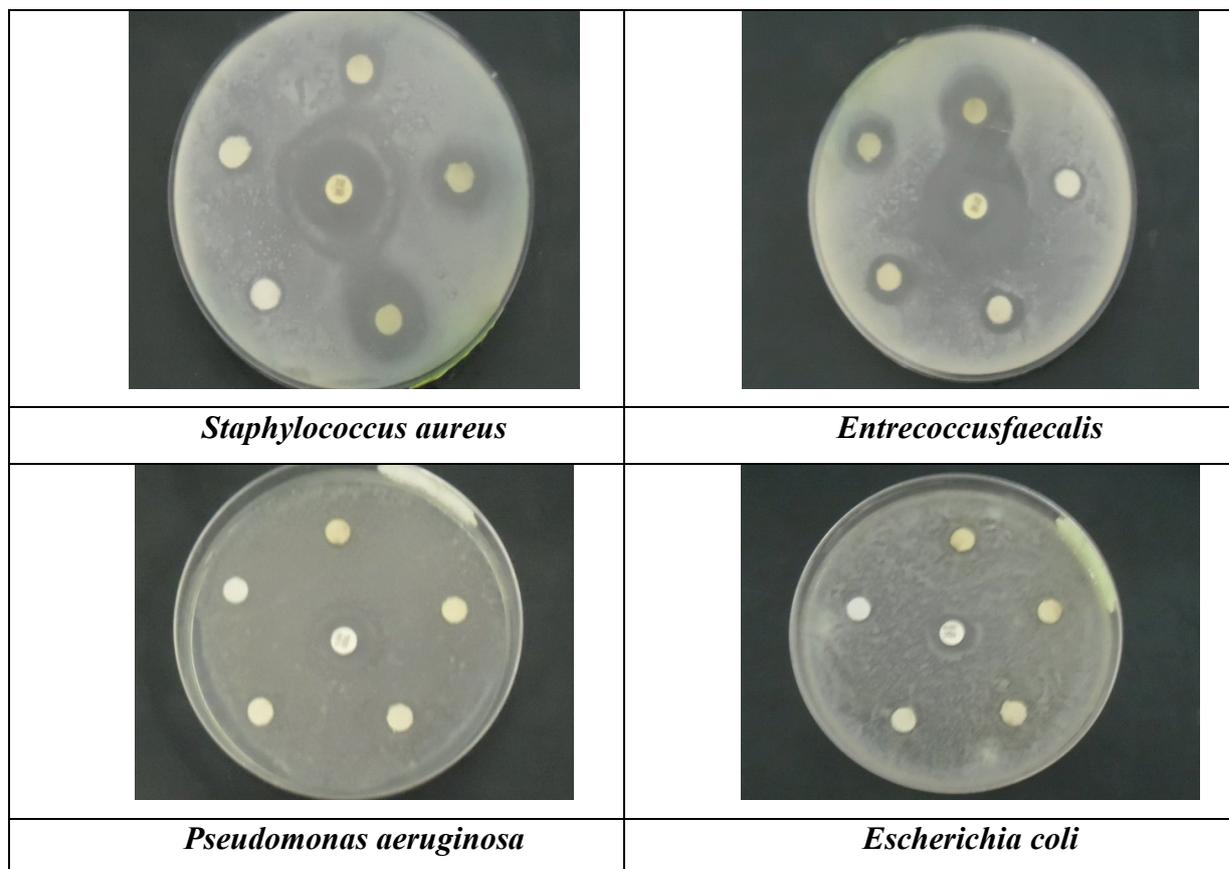
✓*P. aeruginosa* :



**Photo VI.5.** Résultats de l'aromatogramme pour *P. aeruginosa*. (mesure par SD)

On note que la zone d'inhibition varie de 10 -14.5 mm, nos résultats sont en accord avec celle trouvés par **Segueninariman.(2011)** qui a trouvé une zone de (10-16 mm).

Tandis que **Drago et al.(2000); Keskin et al.(2001); Koo et al.(2000)** n'ont signalés aucune action de la propolis sur cegerme.



**Photo VI.6.**Résultats de l'aromatogramme.

La propolis désorganise le cytoplasme, la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire, provoque une partielle bactériolyse et inhibe la synthèse des protéines. Il a été mis en évidence que le mécanisme d'action de la propolis est complexe, une simple analogie ne peut pas être fait sur le mode d'action de tous les antibiotiques classiques (**Shigenori Kumazawa et al., 2008**).

### VI.3.2. Méthode de dilution:

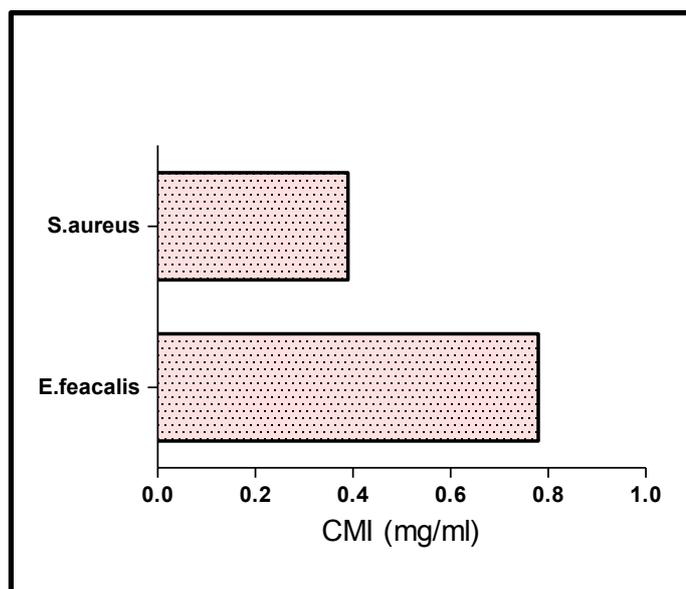
#### 1. Détermination de concentration minimale inhibitrice :

Cette étude est basé sur la présence ou l'absence de turbidité dans des tubes à vis contenant le bouillon nutritif, l'EEP à différentes concentrations et la suspension bactérienne.

Les résultats de la CMI sont présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau VI.** Résultats de la CMI pour *S. aureus* et *E. feacalis*

Dilution	Concentration de propolis (mg/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>E. feacalis</i>
		CMI	
1/2	50	-	-
1/4	25	-	-
1/8	12.5	-	-
1/16	6.25	-	-
1/32	3.12	-	-
1/64	1.56	-	-
1/128	0.78	-	-
1/256	0.39	-	+
1/512	0.195	+	+



**Photo VI.7.** Résultats de la CMI pour *S. aureus* et *E. feacalis*.

#### ✓ *S. aureus*

La CMI pour *S. aureus* a été noté à la concentration de 0.39 mg/ml, ces résultats sont similaire avec celle obtenus par **Robert Wojtyczka et al. (2013)** (0.39 mg/ml), **Gülhnan Vardar et al. (2008)** (0.25-0.50 mg/ml) et **Silva et al. (2012)** (0.3-1.72mg/ml).

Tandis que **Motieret al. (2010)**; **Bonvehiet et al. (1994)**; **Campos et al. (2014)**; **Farzaneh Zeighampour et al. (2013)** ont trouvés que la CMI obtenue pour *S. aureus* est de (2.74 mg/ml), (0.080-0.1 mg/ml), (3.1 mg/ml), (11.7 mg/ml) respectivement.

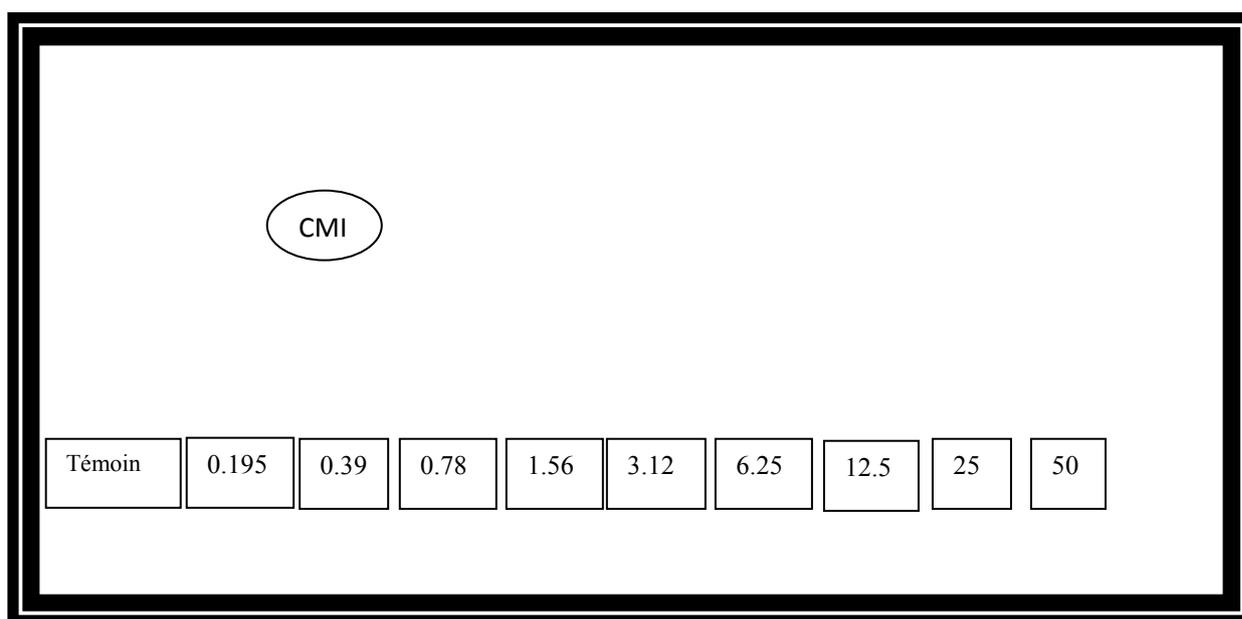


Photo VI.8. Résultats de la CMI pour *S. aureus*.

✓*E. feacalis* :

On note que la CMI est de 0.78 mg/ml, nos résultats sont en accord avec celui obtenu par **Gülhnan Vardar et al. (2008)**(0.50-2 mg/ml).

Tandis que **Maryam Ehsani et al.(2013)**; **Bernard J. Monclaa et al. (2012)**; **Jaysheree et al. (2011)**, ont trouvés une CMI pour *E.feacalis* de (2.25 mg/ml) ou égale à (1.6 mg/ml), (0.24 mg/ml) respectivement, ce dernier est comparativement différent à nos résultats **Kristina Ramanauskien et al.(2009)** qui ont obtenus une valeur de 0.034 mg/ml comme CMI de l'*E.feacalis*.

Selon **Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira. (2007)** La CMI pour *E.feacalis* est de 6.42 mg/ml.

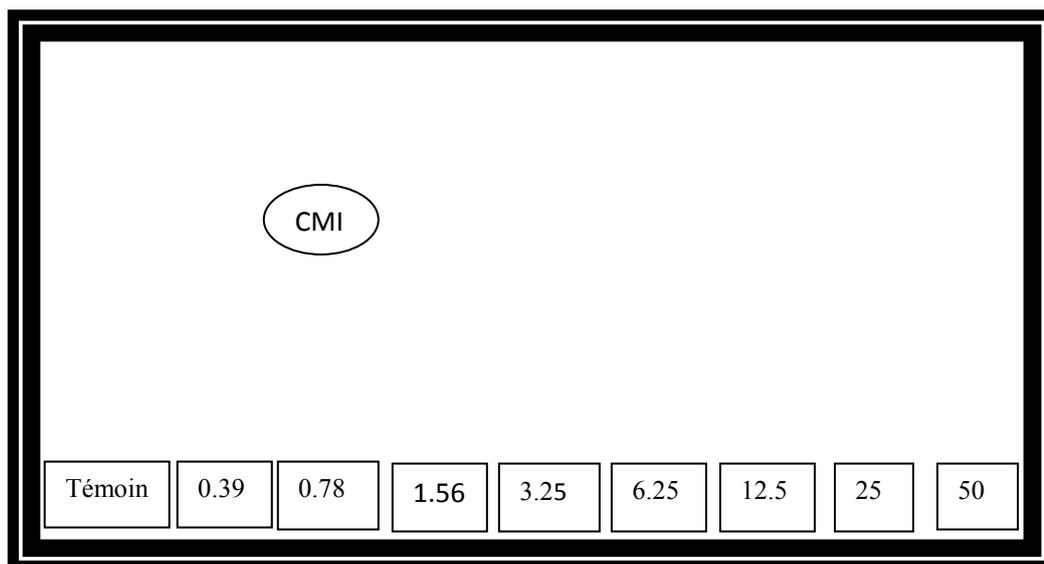


Photo VI.9. Résultats de CMI pour *E. feacalis*.

Tableau VI. Les valeurs de CMI pour *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Dilution	Concentration de propolis (mg/ml)	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
		CMI	
1/2	50	-	-
1/4	25	-	-
1/8	12.5	-	-
1/16	6.25	-	-
1/32	3.12	+	+
1/64	1.56	+	+
1/128	0.78	+	+
1/256	0.39	+	+
1/512	0.195	+	+

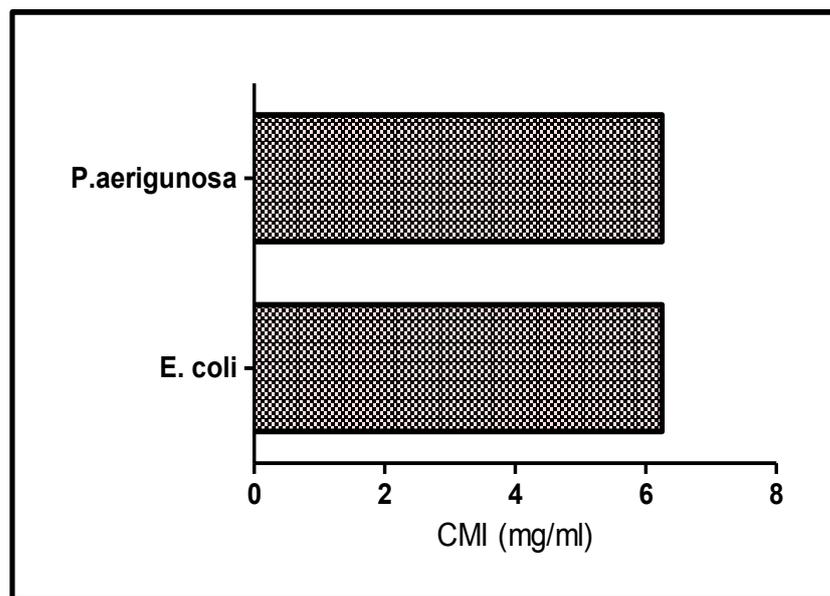


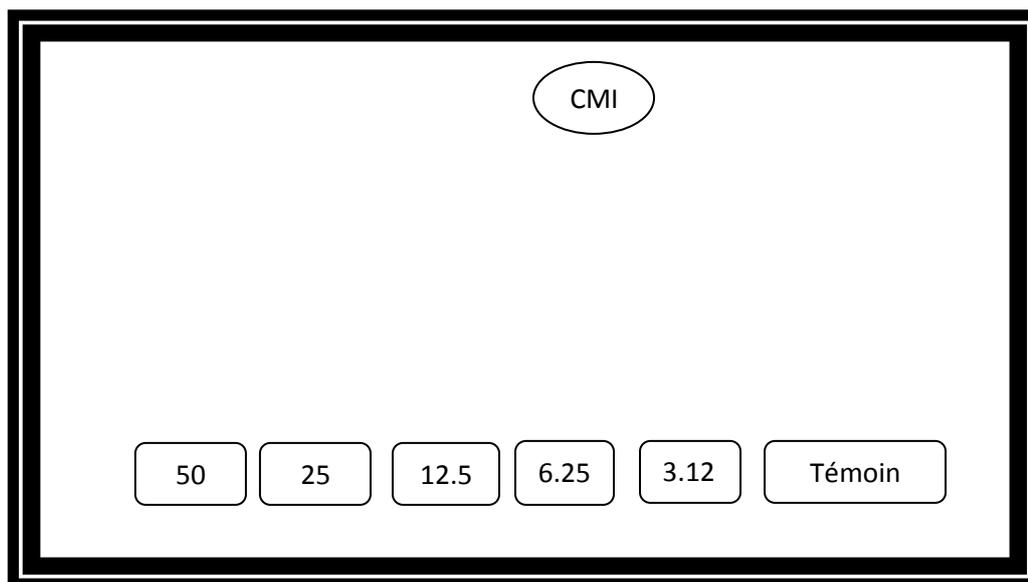
Photo VI.10. CMI pour *E. coli* et *P.aeruginosa*.

✓*E. coli* :

La CMI pour *E. coli* est notée à 6.25 mg/ml, ce résultat est similaire aux résultats de certains auteurs comme **Gülhnan Vardar et al. (2008)** qui ont trouvés une CMI  $\geq 4$  mg/ml.

Tandis que **Zeng et al. (2012)** ont obtenu une CMI variante de 0.9-12.5 mg/ml alors que **Hegazy. (2002)** ont noté une valeur de 1,6 mg/ml, **Milind et al. (2012)** (0.0097 mg/ml).

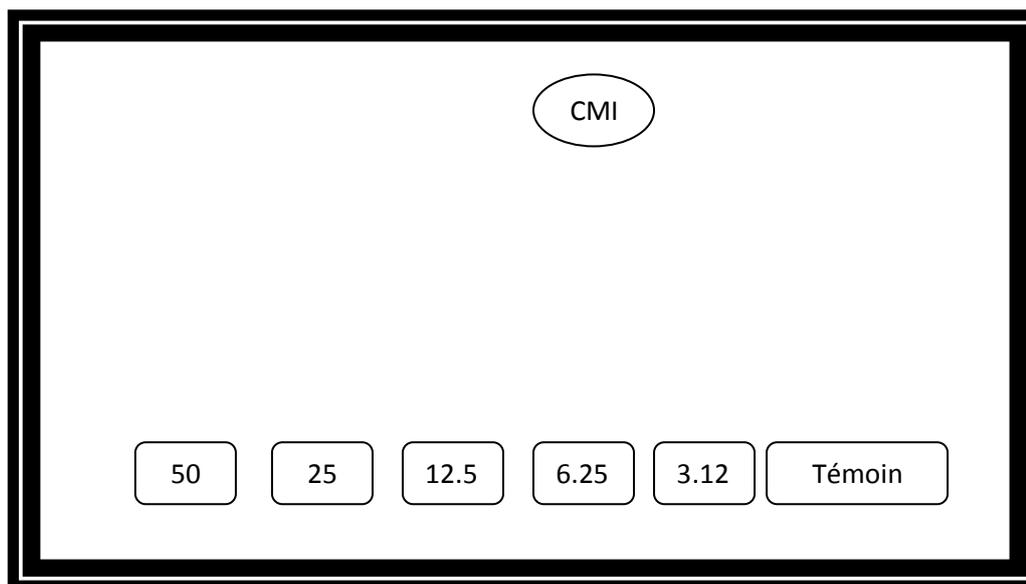
D'autres auteurs comme **Josep Serra Bonvehí et al. (2012)** ont trouvé que la propolis n'a aucun effet inhibiteur contre la même bactérie.



**Photo VI.11.** Résultats de la CMI pour *E. coli*.

***✓P. aeruginosa :***

La CMI pour *P.aeruginosa* est noté à 6.25 mg/ml, nos résultats sont en accord avec celle obtenus par **Gülhan Vardar-Ünlü et al.(2008)** qui ont montré une CMI  $\geq 4$  mg/ml tandis que **Andresa Piacezzi Nascimento et al. (2013)** et **Farzaneh Zeighampour et al. (2013)** ont trouvé une valeur de (1.37mg/ml) et (750 mg/ml) respectivement.



**Photo VI.12.** Résultats de CMI pour *P.aeruginosa*.

On remarque qu'il existe une relation entre les valeurs des CMI de la propolis et le niveau de résistance aux antibiotiques des germes testés. Une souche sensible aux antibiotiques l'est aussi pour la propolis. Une souche résistante pour les antibiotiques l'est aussi pour la propolis.

De nombreux chercheurs ont étudié l'activité antibactérienne de la propolis contre des souches Gram positif et Gram négatif, ils ont constaté que la propolis a une activité antibactérienne contre une large gamme de bactéries Gram positif, mais ont une activité limitée contre les bacilles à Gram négatif (**Mohamde Ioffy., 2010; Ghada A. Elabaz et al., 2012**).

## 2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificités d'action, cette dernière peut globalement être répartie en deux type: action bactéricide (ou germicide) pour une action létale sur les bactéries, action bactériostatique pour les agents qui inhibent les bactéries sans les tuer (Kechar., 2008).

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau VI.**:

**Tableau VI.** Les valeurs de la CMB pour *S. aureus* et *E. feacalis*

Dilution	Concentration de propolis (mg/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>E. feacalis</i>
		CMB	
1/2	50	-	-
1/4	25	-	-
1/8	12.5	-	-
1/16	6.25	-	-
1/32	3.12	-	-
1/64	1.56	-	-
1/128	0.78	-	-
1/256	0.39	-	+
1/512	0.195	+	+

+ : présence de turbidité (il n'ya pas d'inhibition).

- : absence de turbidité (il y'a une inhibition).

✓*S. aureus* :

La CMB pour *S. aureus* est exactement similaire par rapport à la valeur de CMI, tandis que Farzaneh Zeighampour et al. (2014 ; 2013) a montré une CMB égale à (0.0286 mg/ml), (23.4 mg/ml) respectivement, alors Gülhan Vardar-Ünlü et al. (2008) indique des valeurs similaire et supérieur à 4 mg/ml.

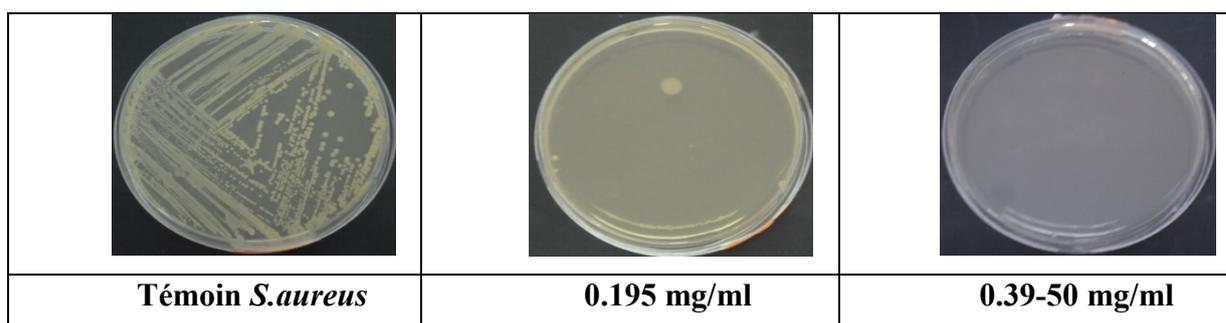


Photo VI.13.Résultats deCMB pour *S. aureus*.

✓*E. feacalis*:

La CMB pour *E. feacalis* est observée à la concentration de (0.78 mg/ml), alors que Gülhan Vardar-Ünlü et al. (2008) ont montré une CMB variante de (2-4 mg/ml), FlavianaBombarda de Andrade Ferreira.(2007) à montré une CMB égale à(7.64 mg/ml).

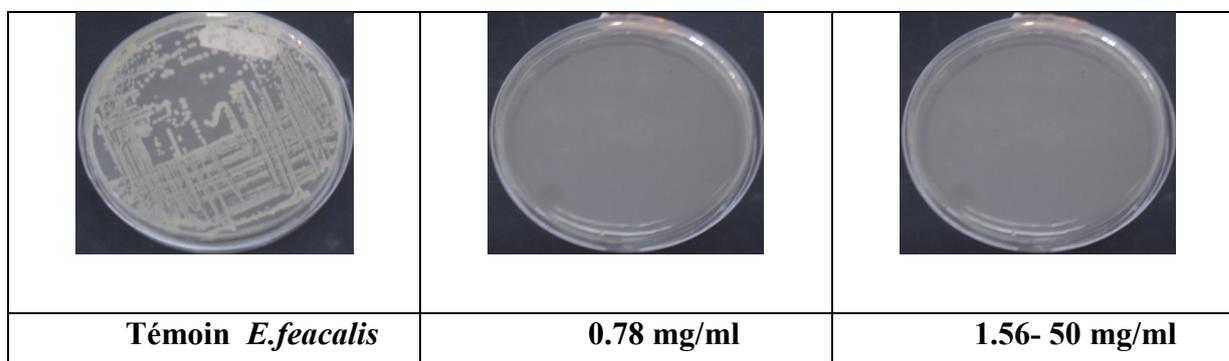


Photo VI.14.Résultats de CMB pour *E. feacalis*.

Tableau VI.3 : les valeurs de CMI, CMB pour *E. coli*, *P. aeriginosa*.

Dilution	Concentration de propolis (mg/ml)	<i>E coli</i>	<i>P aeriginosa</i>
		CMB	
1/2	50	-	-
1/4	25	-	-
1/8	12.5	-	-
1/16	6.25	-	-
1/32	3.12	+	+
1/64	1.56	+	+
1/128	0.78	+	+
1/256	0.39	+	+
1/512	0.195	+	+

+ : présence de turbidité (il ne y'a pas d'inhibition).

- : absence de turbidité (il y'a une inhibition)

### ✓*E. coli* :

On note que la CMB est obtenu à une concentration de 6.25 mg/ml, nos résultats sont similaire a celle trouve par **Gülhan Vardar-Ünlü et al. (2008)** qui ont montré une CMB (>4 mg/ml).

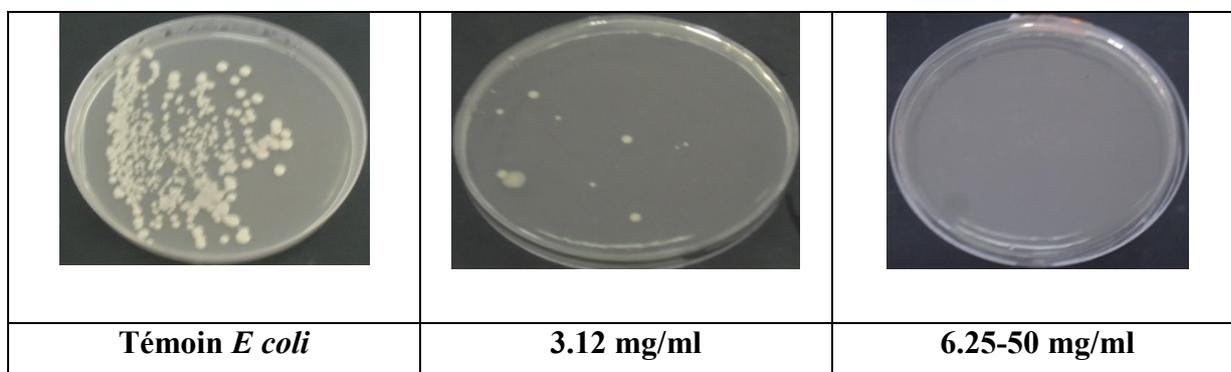
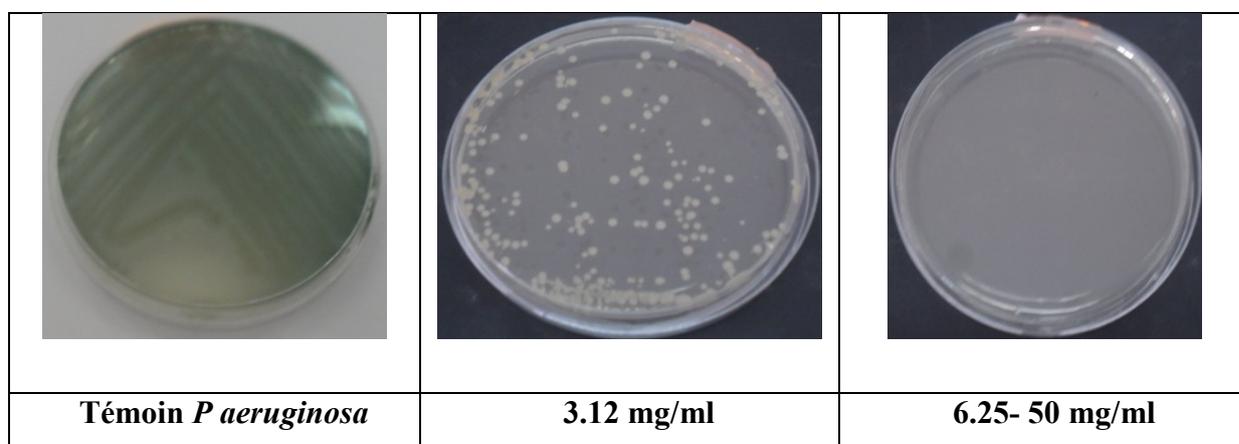


Photo VI.15. Résultats de CMB pour *E. coli*.

**✓*P.aeruginosa* :**

On note que la CMB est obtenue à la concentration de 6.25 mg/ml, nos résultats sont similaire à celles obtenus par **Gülhan Vardar-Ünlü et al.(2008)** et celles obtenus par **Motior Rahman et al. (2010)** qui ont montré des résultats identiques entre la CMI et la CMB.

Tandis que **Farzaneh Zeighampour et al. (2014 ; 2013)** ont montrée une CMB à (1.5 mg/ml), (1500 mg/ml).



**Photo VI.16.**Résultats de CMB pour *P.aeruginosa*.

Après la projection, les meilleurs échantillons peuvent être évalués par la méthode de macro dilution en bouillon pour déterminer la CMB, les validations ont montré que la méthode de diffusion sur disque et méthode de macro dilution de bouillon sont appropriés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de propolis. Les méthodologies validées dans cette étude peuvent être des outils utiles dans la recherche de la propolis. (**Andresa Piacezzi Nascimento., 2013**).

# **Conclusion**

### Conclusion

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir de différentes plantes. Ce produit a été longtemps utilisé comme remède naturel. De nombreux travaux ont mis en évidence plusieurs activités biologiques de cette substance. A cet intéressant, nous avons extraire la propolis en utilisant l'éthanol 70%, l'extrait éthanolique de propolis (EEP) est testé vis-à-vis de nombreux souches bactériennes soit à partir dans un prélèvement humain, soit par l'usage des souches référenciés. Une étude préliminaire est réalisée par l'application de l'aromatogramme sur l'activité antibactérienne. Ensuite une étude approfondie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), ce dernier est déterminé par macrodilution de l'EEP en DMSO.

Après une incubation de 18-24h des tubes contentant différente concentration de L'EEP avec un inoculum déjà calibre au standard de McFarland. La CMI est défini comme la plus faible concentration qui peut inhiber la croissance bactérienne visible par port au tube du témoin, les tubes clair sont ensuite ensemencé sur des boites de pétri prealablement coulé par Mueller Hinton, la CMB est reconnaitrai comme la concentration qui inhibe 99.99% des colonies.

Finalemnt on obtenu une CMI et CMB similaire pour chaque souche étudiées, *S. aureus*(0.39 mg/ml) et *E. feacalis*(0.78 mg/ml). Tandis que *E. coli*(6.25 mg/ml) et *P. aeruginosa*(6.25 mg/ml), donc on conclu que la propolis est plus active contre cocci Gram positif. Par contre, elle est peu active contre les bacilles Gram négatif.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporte notre modeste, contribution a la valorisation d'un sous produits a mettre à la disposition de la population un produit naturel, efficace et accessible. Au vu des résultats obtenu est tant compte de la problématique du sujet, il nous semble judicieux d'approfondir le présent travail :

- Elargissement du nombre de l'échantillon pour toucher toutes les wilayas de pays.
- Identifier différent plantes productrices de propolis.
- Enfin, l'idéal serait de poursuivre l'investigation sur la propolis algérienne. À savoir du fractionnement de l'extrait voir même d'isolement des molécules pour l'attribution à l'un ou l'autre des constituants des effets thérapeutique observe.

## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

- **Abd El Hady., F. K., Hegazi., A. G.,** 2002:« Egyptian propolis 2. Chemical composition, Antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis». *Z Naturforsch.*, vol 57, pp: 386-394.
- **Abhishek Parolia., Manuel S. Thomas., M. Kundabala., Mandakini Mohan.,** 2010:« Propolis and its potential uses in oral health». *International Journal of Medicine and Medical Sciences*.vol. 2(7), p: 210-215.
- **Adriana Andrade Carvalho., Daiane Finger., Christiane Schinieder Machado., Eduardo Morgado Schmidt., Patrícia Marçal da Costa., Ana Paula Negreiros Nunes Alves., Thamires Maria Fontenele Morais., Maria Goretti Rodrigues de Queiroz., Sueli Pércio Quináia., Marcos Roberto da Rosa., Julio Murilo Trevas dos Santos., Cláudia Pessoa., Manoel Odorico de Moraes., Letícia Veras Costa-Lotuf., Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya., Marcos Nogueira Eberlin., Yohandra Reyes Torres.,** 2011:« In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis». *Food Chemistry.*, vol 126, pp: 1239–1245.
- **Akio Iio., Kenji Ohguchi., Hiroe Maruyama., Shigemi Tazawa., Yoko Araki., Kenji Ichihara., Yoshinori Nozawa., Masafumi Ito.,** 2012:« Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages». *Phytomedicine.*, vol 19, pp: 383– 388.
- **Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya., Ildenize Barbosa da Silva Cunha., Maria Cristina Marcucci.,** 2011:« Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis». *Chemistry Central Journal.*, vol 5, pp: 27-37.
- **Allane Tous.,** 2009:« Etude des pouvoirs antioxydant et antibactérien de quelques espèces végétales locales alimentaire et non alimentaire». Thèse de magister. Université de M'hamed Bougara Boumerdes. 27p.
- **Andresa Piacezzi Nascimento., Nathália Ursoli Ferreira., Edna Aparecida Barizon., Bruno Alves Rocha., Mirela Mara de Oliveira Lima Leite Vaz., Andresa Aparecida Berretta.,** 2013:«Methodologies for the evaluation of the antibacterial activity of propolis». *Academic journal.*, vol 7(20), pp: 2344-2350.
- **Angélica J.Silva., JosmaryR.Silva., NaraC.deSouza., PaulaC.S.Souto.,** 2014:« Membranes from latex with propolis for biomedical applications». *Materials Letters.*, vol 116, pp: 235–238.

- **Aouni M., F. Pelen., R. Soulimani.**, 2013:« Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application». *Phytothérapie.*, vol 11, pp: 225-236.
- **Arun J., Colin C. Duke., Vivienne E. Reeve.**, 2009:« Topical 'Sydney' Propolis Protects against UV-Radiation-Induced Inflammation, Lipid Peroxidation and Immune Suppression in Mouse Skin». *Allergy and immunology.*, vol 152, pp: 87-97.
- **Astrid Nathalie Karine Toullec.**, 2008:« Abeille noire, *Apis mellifera mellifera*, Historique et sauvegarde». Thèse de doctorat. Université de Lyon. 60p.
- **Attou amina.**, 2011:« Contribution à l'étude photochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent». Thèse de magister. Université de Abou Baker Belkaid Tlemcen .27 p
- **Azza M.M., Abd-El-Rhman.**, 2009:«Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*». *Fish and Shellfish Immunology.*, vol 27, pp: 454–459.
- **Azzolini., J.K. Bastos., Y.M. Lucisano-Valim.**, 2010:« The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils». *Fitoterapia.*, vol 81, pp: 1102–1108.
- **Barros L., Calhelha R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Estevinho L.M.**, 2007:« Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild *edible mushrooms* methanolic extracts». *European Food Research and Technology*, vol 225(2), pp: 151–156.
- **Begoña Giménez-Cassina López., Eduardo Morgado Schmidt., Marcos N. Eberlin., Alexandra C.H.F. Sawaya.**, 2014:« Phytochemical markers of different types of red propolis». *Food Chemistry.*, vol 146, pp: 174–180.
- **Blanc Mickaël.**, 2010:« Propriétés et usage médical des produits de la ruche », Thèse de docteur en pharmacie, Université de Lumoges, 16 p.
- **Boas.**, 2013:« Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis». *Industrial Crops and Products.*, vol 49, pp: 805– 812.
- **Bodini R.B., P.J.A. Sobral., C.S. Favaro-Trindade., R.A. Carvalho.**, 2013:« Properties of gelatin-based films with added ethanolepropolis extract». *LWT - Food Science and Technology.*, vol 51, pp: 104-110.
- **Bonvehi, J. S., Ventura F., Escala Jorda R.**, 1994:« The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietics». *JOACS.*, vol 71 (5), pp:529-532.

- **Boryana Trushevaa., Milena Popovaa., Eko Budi Koendhorib., Iva Tsvetkovac., Christo Naydenskic., Vassya Bankova.,** 2011:« Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin». *Natural Product Research.*, vol 25(6), pp: 606–613.
- **Burdick G.A.,** 1998:« Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis)». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 36, pp: 347-363.
- **Cardinaul N., M.-O. Cayeux., P. Percie du Sert.,** 2010:« La propolis : origine, composition et propriétés». *Phytothérapie.*, vol 10, pp: 298–304.
- **Caroline Olivieri da Silva Frozza., Charlene Silvestrin Celi Garcia., Gabriela Gambato., Marcia Denize Oliveira de Souza., Mirian Salvador., Sidnei Moura., Francine Ferreira Padilha., Fabiana Kömmling Seixas., Tiago Collares., Sibele Borsuk., Odir Antonio Dellagostin., João Antonio Pêgas Henriques., Mariana Roesch-Ely.,** 2013 :« Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 52, pp: 137–142.
- **Chaker El Kalmouni.,** 2010:« Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées ». Thèse de doctorat, Université de Toulouse. 70-71 p.
- **Cheng H.,Z.H. Qin., X.F. Guo., X.S. Hu., J.H. Wu.,** 2013:« Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis». *Food Research International.*, vol 51, pp: 813–822.
- **Cheurfa M., R. Allem., M. Sebahia., S. Belhireche.,** 2013:« Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites». *Phytothérapie.*, vol 11, pp: 154-160.
- **Chikhi Ilyas.,** 2014:« composition chimique et activités biologique des extrait de cinq plantes aromatique et médicinales de l'ouest d'Algérie», Thèse de doctorats, Université de Abou Beker Belkaid – Telmcen. 44-45p.
- **Coneac G., E. Gafițanu., D.I. Hădărugă., N.G. Hădărugă., I.A. Pînzaru., G. Bandur, L. Ursica, V. Păunescu., A. Gruia.,** 2008:« Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity». *Chem Bull "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara).*, vol 53(67), pp: 56-61.
- **Costel Sârbu., Augustin Cătălin Mot.,** 2012:« Ecosystem discrimination and fingerprinting of Romanian propolis by hierarchical fuzzy clustering and image analysis of TLC patterns ». *Talanta.*, vol 85, pp: 1112– 1117.
- **Cristina Manuela Mihai., Liviu Al. Mașghitas., Daniel S. Dezmirean., Flore Chirila., Robin F.A. Moritz., Helge Schlüns.,** 2010:« Interactions among flavonoids of

propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*». *Journal of Invertebrate Pathology.*, vol 110, pp: 68–72.

➤ **Cui-Ping Zhang., Gang Liu., Fu-Liang Hu.,** 2010:« Hydrolysis of flavonoid glycosides by propolis b-glycosidase». *Natural Product Research.*, vol 26(3), pp: 270–273.

➤ **Daniel Nicodemo., Euclides Braga Malheiros., David De Jong., Regina Helena Nogueira Couto.,** 2013:« Increased brood viability and longer lifespan of honeybees selected for propolis production». *Apidologie*, pp: 1-7.

➤ **Dora Valencia., Efrain Alday., Ramon Robles-Zepeda., Adriana Garibay-Escobar., Juan C. Galvez-Ruiz., Magali Salas-Reyes., Manuel Jiménez-Estrada., Enrique Velazquez-Contreras., Javier Hernandez .,Carlos Velazquez.,** 2012:« Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis». *Food Chemistry.*, vol 131, pp: 645-651.

➤ **Dorneles.,Letícia T. Gressler., Mauricio S. Oliveira., Régis A. Zanette., Agueda C.P. de Vargas., Silvia G. Monteiro.,** 2012:« Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats». *Research in Veterinary Science.*, vol 93, pp: 1314–1317.

➤ **Dungporn Teerasripreecha<sup>1</sup>., Preecha Phuwapraisirisan., Songchan Puthong., Kiyoshi Kimura., Masayuki Okuyama., Haruhide Mori., Atsuo Kimura and Chanpen Chanchao.,** 2012:« In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis ». *Complementary and Alternative Medicine*, pp: 1-17.

➤ **Dutaua G., F. Rancéb.,** 2009:« Allergies au miel et aux produits de la ruche». *Revue française d'allergologie.*, vol 49, pp: S16–S22.

➤ **Edison Antonio de Souza<sup>1</sup>., Hemily Tiemi Inoue<sup>1</sup>., Ary Fernandes Júnior., Nabor Veiga<sup>1</sup>., Ricardo de Oliveira Orsi<sup>1</sup>.,** 2014:«Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis». *Maringá.*, vol 36(1), pp: 49-53.

➤ **El Sayed H. El Ashrya., Tarek A. Ahmadb.,** 2012:« The use of propolis as vaccine's adjuvant». *Vaccine.*, vol 31, pp: 31– 39.

➤ **Emrah Torlak., Durmus, Sert.,** 2013:« Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens». *International Journal of Biological Macromolecules.*, vol 60, pp: 52– 55.

➤ **Esin Basim., Hüseyin Basim., Musa Özcan.,** 2006:« Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens». *Journal of Food Engineering.*, vol 77, pp: 992–996.

- **Fábio Henrique Fernandes., Zaira da Rosa Guterres., Walmir Silva Garcez., Sávio Mestre Lopes., Joaquim Corsino.,** 2014:« Fernanda Rodrigues Garcez Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model». *Food Research International.*, vol 62, pp: 20–26.
- **Fearnley., Ru Angelie Edrada-Ebel., David Watson.,** 2014:« Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis». *Talanta.*, vol 120, pp: 181–190.
- **Federica Pellati., Francesco Pio Prencipe., Davide Bertelli., Stefania Benvenuti.,** 2013:« An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp: 81– 82.
- **Ferhoum Fatiha;** 2010:« analyse physico- chimique de la propolis local selon les étages bioclimatique et les deux races d'abeilles local (*Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis* )» , Thèse de magistère, Université M'Hamed Bougara Boumerdès, 20 p.
- **Frouhat Zoulikha., Lahcini Basma.,** 2013:« lutte biologique par l'huile essentiel de *Rosmarinus officinalis*». Thèse de master. Université de Kasdi Merbah-Ouargla. 21-22 p.
- **Galvo J., J.A. Abreu., T. Cruz., G. S. A. Machado., P. Niraldo., A. Dausch., C.S. Moraes., P. Fort., Y.K .Park,** 2007:« Biological therapy using propolis as nutritional supplement in cancer treatment ». *International journal of cancer research.*, vol 3(1), pp: 43-53.
- **Ghada A Elabaz., Iman I Elsayad.,** 2012:« Comparaison of the antimicrobial effect of Egyptian propolis vs New Zealand propolis on *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in Saliva». *Oral Health Prev Dent.*, vol 10, pp: 155-160.
- **Ghedira K., P. Goetz., R. Le Jeune.,** 2009:« Propolis ». *Phytotherapie.*, vol 7, pp: 100-105.
- **Giovanni Gontijo de Souza., Ludwig Heinrich Pfenning., Fabiana de Mouraa., Mirian Salgado Jacqueline Aparecida Takahashia.,** 2013:« Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi». *Natural Product Research.*, vol. 27(18), pp: 1705–1707.
- **Gülhan Vardar-Ünlü., Sibel Silici., Mehmet Ünlü.,** 2008 :« Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis». *World J Microbiol Biotechnol* vol 24, pp: 1011–1017.

- **Jaqueline Ferreira Campos., Uilson Pereira dos Santos., Luis Fernando Benitez Macorini., Adriana Mary Mestriner Felipe de Melo ., José Benedito Perrella Balestieri., Edgar Julian Paredes-Gamero., Claudia Andrea Lima Cardoso., Kely de Picoli Souza., Edson Lucas dos Santos.,** 2014:« Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae)». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 65, pp: 374–380.
- **Jaroslav Pochop., Miroslava Kačániová, Lukáš Hleba.,** 2011:« Effects of propolis extracts in chicken's diet against *Salmonella Typhimurium* detected by real –time PCR ». *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences.*, vol 2,pp: 113-125.
- **Jin-Chul Ahn., Raktim Biswas., Phil-Sang Chung MD., PhD.,** 2013:« Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, vol 10, pp: 236—243.
- **Jin-Chul Ahn,a,b, Raktim Biswasa, Phil-Sang Chung MD, PhD.,** 2013:« Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway Jin». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, vol 10, pp: 236-243.
- **Jiri Trousil., Jiri Panek., Martin Hruby., Jana Mateřjkova., Jan Kucka., Petr Stepanek.,** 2013:« Self-association of bee propolis: effects on pharmaceutical applications». *Journal of Pharmaceutical Investigation*, pp: 1-8.
- **João Carlos Silva., Sandra Rodrigues., Xesús Feás., Leticia M. Estevinho.,** 2013:« Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 50, pp: 1790–1795.
- **José Maurício Sforcin., Vassya Bankova.,** 2011:« Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?». *Journal of Ethnopharmacology.*, vol 133, pp: 253–260.
- **Josep Serra Bonvehí., Arrate Lacalle Gutierrez.,** 2012:« The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain)». *World J Microbiol Biotechnol.*, vol 28, pp: 1351–1358.
- **Kartal., Sulhiye Yıldız., Serdar Kaya., Semra Kurucu., Gülaçtı Topçu .,** 2003:« Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia». *Journal of Ethnopharmacology.*, vol 86, pp: 69-73.
- **Katarína Hroboňová., Jozef Lehotay., Jozef Čižmárik.,** 2008:« Determination of Some Phenolic Acids in Propolis by an HPLC Method». *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.*, vol 31, pp: 1213–1226.

- **Katarína Hroboňová., Jozef Lehotay., Jozef Čižmárik., Jana Sádecká.,** 2013:« Comparaison HPLC fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis». *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.*, vol (36), pp: 486–503.
- **Kechkar Madina.,** 2008:« Extraction de silymarine et étude de son activité antimicrobienne». Thèse de magister. Université de Mentouri Constantine. 39-40 p.
- **Keskin, N., Selc U. K. Hazin., Husnucan Baser K., Mine Kurkc Uoglu.,** 2001:« Antibacterial and chemical composition of Turkish propolis». *Z Naturforsch.*, vol 56, pp: 1112-1115.
- **Khaled M. Attalla1., Ayman A. Owayss., Karem M. Mohanny.,** 2007:«Antibacterial activities of bee venom, propolis, and royal jelly produced by three honey bee, *Apis mellifera* L., hybrids reared in the same environmental conditions». *Annals of Agric Sci., Moshtohor*, vol 45(2), pp: 895-902.
- **Kohsuke Shimomura., Yasumasa Sugiyama., Jun Nakamura., Mok-Ryeon Ahn., Shigenori Kumazawa.,** 2013:« Component analysis of propolis collected on Jeju Island, Korea». *Phytochemistry.*, vol 93, pp: 222–229.
- **Koo H., Gomes BP., Rosalen PL., Ambrosano GM., Park YK., Cury JA.,** 2000:« In vitro antimicrobiol activity on propolis and *Arnica-montana* against oral pathogens». *Arsh Oral Biol.*, vol 45 (2), pp:141-148.
- **Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S.,** 1999:« Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin». *J Ethnopharmacol.*, vol 64, pp: 235-240.
- **L.M.C. Simões-Ambrosio., L.E. Gregório., J.P.B. Sousa., A.S.G. Figueiredo-Rinhel., A.E.C.S.**
- **Lagouri M, D. Prasianaki., F. Krysta.,** 2014:« Antioxidant properties and phenolic composition of greek propolis extracts». *International Journal of Food Properties.*, vol 17, pp: 511–522.
- **Lu Xu., Si-Min Yan., Chen-Bo Cai., Xiao-Ping Yu.,** 2013:« Untargeted detection and quantitative analysis of poplar balata (PB) in Chinese propolis by FT-NIR spectroscopy and chemometrics». *Food Chemistry.*, vol 141, pp: 4132–4137.
- **Lucas T. Gressler., Aleksandro S. Da Silva., Gustavo Machado., Luciana Dalla Rosa., Felliipe Dorneles., Letícia T. Gressler., Mauricio S. Oliveira., Régis A. Zanette., Agueda C.P. de Vargas., Silvia G. Monteiro.,** 2012:« Susceptibility of *Trypanosoma evansi*

to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats». *Research in Veterinary Science.*, vol 93, pp: 1314–1317.

➤ **Lucas T. Gressler., Aleksandro S. Da Silva., Gustavo Machado., Luciana Dalla Rosa., Fellipe**

➤ **Luís G. Dias., Ana Paula Pereira., Leticia M. Estevinho.,** 2012:« Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 50, pp: 4246–4253.

➤ **Mahmoud Ioutfy.,** 2006:«Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, vol 7, pp: 22-33.

➤ **Maria G. Miguela., Susana Nunesb., Cláudia Cruzb., João Duarteb., Maria D. Antunesb., Ana M. Cavacoc., Marta D. Mendesd., A. Sofia Limad., Luis G. Pedrod., José G. Barrosod., A. Cristina Figueiredo.,** 2013:« Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and –untreated beehives maintained at Algarve (Portugal)». *Natural Product Research.*, vol 27(8), pp: 743–749.

➤ **Maria J. Valente., Ana F. Baltazar., Rui Henrique., Leticia Estevinho., Márcia Carvalho.,** 2010 :« Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 49, pp: 86–92.

➤ **Maria-Cécile Pibiri.,** 2006:« Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile S essentielles».Thèse de doctorat. Université de Lausanne. 41-42 p.

➤ **Maryam Zare Jahromi1., Arezoo Tahmourespour., Samane Ziaei.,** 2013:« The effect of propolis on bacterial population isolated from necrotizing single canal tooth with chronic apical periodontitis versus chlorhexidine gluconate». *Journal of Medicinal Plants Research.*, vol 7(38), pp: 2873-2878.

➤ **Mehmet Tanyuksela., Bekir Salih,** 2007:« In vitro antimicrobial activity of propolis samples from differentgeographical origins against certain oral pathogens». *Anaerobe.*, vol 13, pp: 140–145.

➤ **Michelle CristianeBúfalo., IsabelFerreira., GustavoCosta ., VeraFrancisco., Joana Liberal., MariaTeresaCruz., MariaCelesteLopes., MariaTeresaBatista., José MaurícioSforcin.,** 2013:« Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-κB and MAPK activation inmacrophages». *Journal ofEthnopharmacology.*, vol 149, pp: 84–92.

- **Milind K. Choudharia., Sachin A. Puneकरa., Ramchandra V. Ranadeb., Kishore M. Paknikar.,** 2012:« Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India». *Journal of Ethnopharmacology.*,vol 141, pp: 363– 367.
- **Motior RahmanM. ,Allan Richardson., M. Sofian-Azirun.,** 2010:« Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*». *African Journal of Microbiology Research.*, vol 4(16), pp : 1872-1878.
- **Nada K.K. Hendi., Habeeb S. Naher., Alaa H., Al-Charrakh.,** 2011:« *In vitro* antibacterial and antifungi activity of Iraqi propolis». *Journal of Medicinal Plants Research*, pp: 1-15.
- **Nada Ořsolíc., Damir Sirovina., Goran Gajski., Vera Garaj-Vrhovac., Maja Jazviňšcak Jembrek., Ivan Kosalec.,** 2013:« Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice:Effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG)». *Mutation Research.* vol 757, pp: 36– 44.
- **Nadjet Debbache., Dina Atmani., Djebbar Atmani.,** 2014:« Chemical analysis and biological activities of *Populus nigra*,flower buds extracts as source of propolis in Algeria». *Industrial Crops and Products.*, vol 53, pp: 85– 92.
- **Nebojša I. Potkonjak., Dragan S. Veselinovic., Miroslav M. Novakovic´., Stanislava Z´. Gorjanovic´., Lato L. Pezo., Desanka Z´. Suz´njevic´.,** 2012:« Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 50, pp: 3614–3618.
- **Nick Kalogeropoulos., Spyros J. Konteles., Elena Troullidou., Ioannis Mourtzinis., Vaios T. Karathanos .** 2009:« Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus». *Food Chemistry.*, vol 116, pp: 452–461.
- **Nicola Bradbear.,** *Le rôle des abeilles dans le développement rural, Manuel sur la récolte, la transformation et la commercialisation des produits et services dérivés des abeilles,* 19<sup>ème</sup> Edition.2010., 143 p.
- **Ortrud Monika Barrth., Alexda Silva De Freitas., Adriana Hitomi., Matsuda Ligia Bicudo De Almeeida-Muradian.,** 2013 :« **Botanical** origin and Artepillin-C content of Brazilian propolis samples». *Grana.*, vol 52(2), pp: 129–135.
- **Ozgun Korua., Fulya Toksoyb., Cengiz Han Acikelc., Yasar Meric Tuncab., Mehmet Baysallara., Aylin Uskudar Guclua., Eralp Akcab., Asli Ozkok Tuylud., Kadriye Sorkund., -Paulo J.S. Barbeira., Rosilene S.N. Paganotti., Ariane A. Ássimos.,**

2013:« Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV–Vis spectroscopy». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, vol 114, pp: 441–448.

➤ **Pietta P.G., C. Gardana., A.M. Pietta.**, 2002:« Analytical methods for quality control of propolis». *Fitoterapia.*, vol 73(1), pp: S7–S20.

➤ **Prytyk E., Dantas AP., Salomao K., Pereira AS., Bankova VS., De Castro SL., Neto FRA.**, 2003:« Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis». *J. Ethnopharmacol.*, vol 88, pp: 189-193.

➤ **Qaralleh H., S. Idid, S. Saad., D. Susanti., M. Taher., K. Khleifat .**, 2010:« Antifungal and Antibacterial Activities of Four Malaysian Sponge Species (Petrosiidae)». *Journal de Mycologie Médicale.*, vol 20, pp: 315—320.

➤ **Reda H. ElMazoudy., Azza A. Attia., Nahla S. El-Shenawy.**, 2011:« Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats». *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, vol 101, pp: 175–181.

➤ **Rezzan Aliyazıcioglu., Huseyin Sahin., Omer Erturk., Esra Ulusoy., and Sevgi Kolayli.**, 2013:«Properties of phenolic composition and biological activity of from Turkey». *International Journal of Food Properties.*, vol 16, pp: 277–287.

➤ **Rika Nakamura., Ryosuke Nakamura., Kayoko Watanabe., Kazuo Oka., Shozo Ohta., Satoshi Mishima., Reiko Teshima.**, 2010:« Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis». *International Immunopharmacology.*, vol 10, pp: 1107–1112.

➤ **Robert D. Wojtyczka., Arkadiusz Dziedzic., Danuta Idzik., Małgorzata Kępa., Robert Kubina., Agata Kabala-Dzik., Joanna Smoleń-Dzirba., Jerzy Stojko., Mieczysław Sajewicz., Tomasz J. Wąsik.**, 2013:« Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs ». *Molecule.*, vol 18, pp: 9623-9640.

➤ **Rui Cai., Shisheng Wang., Yu Meng., Qinggang Mengb., Weijie Zhao.**, 2012:« Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy». *Analytical Methods.*, vol 4, pp: 2388–2395.

➤ **Rula M. Darwish., Ra'ed J. Abu Fares., Musa H. Abu Zarga., Ibrahim K. Nazer.**, 2010 :«Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria». *African Journal of Biotechnology.*, vol 9(36). p-p: 5966-5974.

- **Safa A. Shaheena., Musa H. Abu Zargaa., Ibrahim K. Nazerb., Rula M. Darwishc., Hala I. Al-Jaber.,** 2011:« Chemical constituents of Jordanian propolis». *Natural Product Research.*,vol 25(14), pp: 1312–1318.
- **Santos F.A., E.M.A. Bastos., M. Uzeda., M.A.R. Carvalho., L.M. Farias., E.S.A. Moreira., F.C. Braga.,** 2002:« Review Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria». *Journal of Ethnopharmacology.*, vol 80, pp: 1- 7
- **Scazzocchio F., F.D. D’Auria., D. Alessandrinia., F. Pantanella.,** 2006:« Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis». *Microbiological Research.*, vol 161, pp: 327—333.
- **Segueni Narimane., Fatiha Khadraoui., Faïrouz Moussaoui., Amar Zellagui., Noureddine Gherraf., Mesbah Lahouele and Salah Rhouati.,** 2010:« Volatil constituents of *Algerian propolis*». *Annals of Biological Research.*, vol 1 (2), pp: 103-107.
- **Segueni Narimane,** 2011:« Contribution à l’étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis », Thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine, 14 p.
- **Shahin Gavanji1., Behrouz Larki., Alireza jalali Zand., Elmira Mohammadi., Mohammad Mehrasa., Amir Hosein Taraghian.,** 2013:«Comparative effects of propolis of honey bee on pathogenic bacteria». *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, vol 6(32),pp: 2408-2412.
- **Shangji Gong., Liping Luo., Wei Gong., Yinyu Gao., Mingyong Xie.,** 2012:« Multivariate analyses of element concentrations revealed the groupings of propolis from different regions in China». *Food Chemistry.*, vol 134, pp: 583–588.
- **Sharaf S., A. Higazy., A. Hebeish.,** 2013:« Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textile ». *International Journal of Biological Macromolecules.*, vol 59, pp: 408– 416.
- **Sherine M. Rizk., Hala F. Zaki., Mary A.M. Mina.,** 2014:« Propolis Attenuates Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats». *Food and Chemical Toxicology.*, vol 67, pp: 176–186.
- **Shigenori Kumazaw., Jun Nakamura., Masayo Murase., Mariko Miyagawa., Mok-Ryeon Ahn., Shuichi Fukumoto.,** 2008:« Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis». *Naturwissenschaften.*, vol 95, pp: 781–786.
- **Shiva Mohammadzadeh., Mohammad Shariatpanahi., Manoochehr Hamedi., Reza Ahmadkhaniha., Nasrin Samadi., Seyed Nasser Ostad.,** 2007:« Chemical

composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis» *Food Chemistry.*, vol 103, pp: 1097–1103.

➤ **Silvana A. Libério., Antônio Luís A. Pereira., Maria José A.M. Araújo., Richard P. Dutra., Flávia R.F. Nascimento., Valério Monteiro-Neto., Maria Nilce S. Ribeiro., Azizedite G. Gonçalves., Rosane N.M. Guerra.,** 2009:«The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci». *Journal of Ethnopharmacology.*, vol 125(1), pp: 1-9.

➤ **Sirivan Athikomkulchai., Suresh Awale., Nijisiri Ruangrungsi., Somsak Ruchirawat., Shigetoshi Kadota,** 2013:« Chemical constituents of Thai propolis ». *Fitoterapia.*, vol 88, pp: 96-100.

➤ **Srdjan Stepanović., Nataša Antić., Ivana Dakić., Milena Švabić-Vlahović.,** 2003:« In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs». *Microbiol Resreach.*, vol 158,pp:353–357.

➤ **Stefan Bogdanov.,** 2010:«Propolis, Composition, Health, Medicine: Review». *Bee products science.* pp., 1-19.

➤ **Supakit Khacha-ananda<sup>1</sup>., Khajornsak Tragoolpua., Panuwan Chantawannakul., Yingmanee Tragoolpua.,** 2013:« Antioxidant and Anti-cancer Cell Proliferation Activity of Propolis Extracts from Two Extraction Methods». *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, vol 14, pp: 6991-6995.

➤ **Thirugnanasampandan R., Sayana Beena Raveendran., R Jayakumar.,** 2012:« Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis». *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* pp: 651-654.

➤ **Tong Zhang., Ruwida Omar., Weam Siheri., Sultan AlMutairi., Carol Clements., James Fearnley., RuAngelieEdrada-Ebel., DavidWatson.,** 2014:« Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis». *Talanta.*, vol 120, pp:181–190.

➤ **Valdemaras Brusokas.,** 2009:« Analysis of the antibacterial activity of propolis and lysozyme in semisolid emulsion systems». *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research,* vol 66 (6), pp: 681-688.

➤ **Van H. Tran., Rujee K. Duke., Abdallah Abu-Mellal., Colin C. Duke.,** 2012:« Propolis with high flavonoid content collected by honey bees from *Acacia paradoxa* ». *Journal Phytochemistry.*, vol 81, pp: 126–132.

➤ **Vanna Francine de Castro Ishida., Giuseppina Negri., Antonio Salatino., Maria Fulgência C.L. Bandeira.,** 2011:« A new type of Brazilian propolis: Prenylated

benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria». *Food Chemistry.*, vol 125, pp: 966–972.

➤ **Vijay D Wagh., Rameshwar D Borkar.,** 2012:« Indian propolis: A potential natural antimicrobial and antifungal agent». *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*, vol 4(4), pp: 14-17.

➤ **Viuda-Martos M., Y. Ruiz-Navajas., J. Fernandez -Lopez. J.A. Perez Alvarez.** 2008:« Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly». *Journal of food science.*, vol 73(9), pp: 117-126.

➤ **Viviane Cristina Toreti., Helia Harumi Sato., Glaucia Maria Pastore., Yong Kun Park.,** 2013:« Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp: 1-13.

➤ **Wael M. Semida. , Mostafa M. Rady.,** 2014:« Presoaking application of propolis and maize grain extracts alleviates salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ». *Scientia Horticulturae.*, vol 168, pp: 210–217.

➤ **Wei-Cai Zeng., Qiang He., Qun Sun., Kai Zhong. Hong Gao.,** 2010:« Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*». *International Journal of Food Microbiology.*, vol 153, pp: 78–84.

➤ **Yoshihiro Okamoto., Takazumi Hara., Tatsuya Ebato., Takashi Fukui., Toshiyuki Masuzawa.,** 2013:« Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation ». *International Immunopharmacology.*, vol 16, pp: 178–183.

# Annexes

## Annexe

### Milieu de Mueller Hinton :

- Eau distille..... 1000ml
- Infusion de viande de bœuf .....300,0 ml
- Peptone de caséine .....17,5 g
- Amidon de maïs .....1,5 g
- Agar .....30g
- pH = 7,4

### Standard de McFarland:

- Formule approximative par 100 ml d'eau purifiée.
- Acide sulfurique, 0.18 M.....99.5 ml
- Chlorure de baryum, 0.048 M.....0.5 ml

### Résume :

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir de différentes plantes, ce produit a été long temps utilise comme un remède naturel.

L'étude de l'activité antibactérienne est tester contre différentes souches par deux méthodes, l'un est l'aromatogramme, l'autre est la méthode de dilution en milieu liquide, la 1<sup>er</sup> méthode est pour une étude approximative, la 2<sup>ème</sup> méthode est pour étude plus approfondie.

On obtenu une CMB similaire à la CMI, pour *S. aureus* (0.39 mg/ml), *E. feacalis* (0.78 mg/ml), tandis que *P. aeruginosa* et *E. coli* (6.25 mg/ml).tract

**Mots clé :** propolis, EEP, activité antibactérienne, *S. aureus*, *E. feacalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

### ملخص

العكبر هي مادة صمغية يجمعها النحل من مختلف النباتات هذه المادة استعملت كثيرا كدواء طبيعي. العديد من الأبحاث قد أثبتت الفعالية البيولوجية لهذه المادة.

تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا ضد مختلف السلالات بواسطة طريقتين . واحدة هي aromatogramme . أما الثانية فهي التخفيف في وسط سائل. الأسلوب الأول هو عبارة عن دراسة تقريبية. الأسلوب الثاني فهي دراسة أكثر تعمقا.

وتم الحصول على نتائج متماثلة فيما يخص CMB و CMI لكل من *S. aureus* (0.39 مغ/مل). *E. feacalis* (0.78 مغ/مل) بالمقابل *E.coli* و *P.aeruginosa* (6.25 مغ/مل)

الكلمات الدالة : العكبر، EEP ، النشاط المضاد للبكتيريا، *S. aureus*, *E. feacalis*, *E. coli*, *P.aeruginosa* .

### Summary :

Propolis is naturel resinous hive products collected by bees from buds of diffirent trees, It has long been used by humans as a naturel remedy, and interest for this product has increased recently.

The study of the antibacterial activity against various stains was tested by two methods, one is aromatogramme, the other is the method od dilution in liquid meduim. The first method is an approximate study, the 2<sup>nd</sup> method is more depth study.

We obtained a similar CMB to the CMI. For *S. aureus* (0.39mg/ml), *E. feacalis* (0.78 mg/ml). While *E. coli* and *P. aeruginosa* have a value of (6.25mg/ml).

**Keywords :** propolis, EEP, antibacterial activity, *S. aureus*, *E. feacalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.