REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire
Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En science de la nature et de la vie

Spécialité : Biologie et pathologie cellulaire

Par :

YAGOUB ASMAA

Thème :

Evaluation de l'effet microbiologique à potentiel thérapeutique de la propolis

Soutenue publiquement le : 24 / 09 /2020. Devant le jury composé de :

Membre de jury	Grade :	Etablissement	
Dr BENHAFRI. N	MAA	Université Yahia Fares	Président
Dr KHAMES .M	MCB	Université Yahia Fares	Examinateur
Dr BERBER. A	MAHU	Université Djilali Liabes	Encadreur

REMERCIEMENTS

Je remercie le bon DIEU tout puissant, maître de tous les cieux et de la terre qui m'a permis de mener à bien ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à mon Directeur de mémoire Dr Berber Abdellah pour son encadrement. Grâce à lui que j'ai progressé et acquis la rigueur nécessaire pour appréhender ce projet,tout en étant toujours présent et disponible.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail Dr Khames Maemer ainsi que Dr Benafri Nadir d'avoir bien voulu examiner notre travail.

Enfin, nous adressons nos remerciements à notre promotion, à tous mes proches et amies qui nous ont toujours soutenues et encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.



Je dédie ce travail :

A mon père Mr YAGOUB Boumedienne et ma mère BENAMMAR Fatma pour leur amourinestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

A mes frères Youcef et Mohamed, à ma sœur Khaoula,qui m'ont soutenue tout au long de ce travail par leurs précieux encouragements.

A Imen, Marwa et Aleya qui sont pour moi des vraies sœurs pour leurs encouragements,aussi a Slimen et Mustapha.

A Linda , hakima pour leurs encouragement et leur leur conseils.

A toute ma famille, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à finaliser ce travail. Je vous dis merci.



Résumé

La propolis est l'un des produits de la ruche réputé et de vertuestherapeutiquescontenant plusieurs substances antibiotiques naturelles.
Le travail présent est une contribution à l'évaluation de l'effet antibactérien des extraits ethaloniques de la propolis algérienne récoltées de 4 zones geographiquesdifférentes.

La méthode utilisée consiste à réaliser des antibiogramme des extraits ethanoliques contre 3 souches bacteriennes(*Escherichiacoli, Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa*) pour detecter et puis quantifier cette activité par la CMI (concentration minmale inhibitrice).

Dans les résultats, les echantillons de la propolis ont montrés une activité antibacterienne avec des CMI differentes CMI *staphylococcus aureus* EEP Biskra 2.95 mg/l , EEP El-bayed 1.17 mg/l , EEP Bejaia 2.62 mg/l , EEP Ain safra 2.37 mg/l.CMI Escherichia coli EEP Biskra 11.05 mg/l , EEP El-bayed 6.37 mg/l , EEP Bejaia 15.25 mg/l , EEP Ain safra 9.29 mg/l. CMI *Pseudomonas aureginosa* EEP Biskra 11.41 mg/l , EEP El-bayed 7.32 mg/l , EEP Bejaia 15.25 mg/l , AIN safra 8.44 mg/l . Cette activitéest plus elevé contre *Staphylococcus aureus*, tandis qu'elle était moyenne contre l'*Escherichia coli* et *le Pseudomonas aureginosa*. La CMI la plus faible est de 1.17 mg/l et elle était trouvé dans l'extrait de EL-bayed contre le S. aureus tandis que la plus grande était 15.25 mg/l contre l'E.coli et pseudomonas avec l'extrait de Bejaia.

Les résultats obtenue suggérent une variabilité de l'activité des extraits en fonction de l'origine géographique.

Mots clé : propolis, antibiogramme, Concentration minimale inhibitrice, Staphylococcus aureus

Abstract

Propolis is one of the renowned bee products with therapeutic virtues and containing several natural antibiotic substances.

The present work is a contribution to the evaluation of the antibacterial effect of ethalonic extracts of Algerian propolis collected from 4 different geographic areas.

The method used consists in carrying out antibiograms of the ethanolic extracts against 3 bacterial strains (*Escherichia..coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa*) to detect and then quantify this activity by the MIC (minimum inhibitory concentration).

In the results, the propolis samples showed antibacterial activity with different MICs. This activity is highest against *Staphylococus aureus*, MIC *staphylococcus aureus* EEP Biskra 2.95 mg/l , EEP El-bayed 1.17 mg/l , EEP Bejaia 2.62 mg/l , EEP Ain safra 2.37 mg/l .MIC *Escherichia coli* EEP Biskra 11.05 mg/l , EEP El-bayed 6.37 mg/l , EEP Bejaia 15.25 mg/l , EEP Ain safra 9.29 mg/l. MIC *Pseudomonas aureginosa* EEP Biskra 11.41 mg/l , EEP El-bayed 7.32 mg/l , EEP Bejaia 15.25 mg/l , AIN safra 8.44 mg/l . while it was moderate against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aureginosa.* The lowest MIC is 1.17 mg / L and was found in Bayed extract against S. aureus while the highest was 15.25 mg /l against E. coli and P.auruginosa with Bejaia extract.

The results obtained suggest a variability in the activity of the extracts depending on the geographical origin.

Keywords: propolis, antibiogram, Minimum inhibitory concentration, Staphylococcus aureus

الملخص

.البروبوليس اوالعكبرهوأحد منتجات النحل المشهورة بخصائصها العلاجية التي تحتوي على العديدمن المضادات الحيوية الطبيعية

.العمل الحالي هومساهمةفي تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للمستخلصات الإيثالونية للعكبرالجزائري التي تم جمعهامن 4 مناطق جغرافية مختلفة

تتمثل الطريقة المستخدمة في إجراءاختبار لخاصية التضاد الحيويللمستخلصات الإيثانولية ضد 3 سلالات بكتيرية " البكتيريا الكروية العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية للكشف عن هذا النشاط ثم قياسه بتحديد التركيز المثبط الادنى

النتائج اظهرت ان لعينات البروبوليس نشاطًا مضادًا للبكتيري امتباينا حسب التركيز المثبط الادنى وهو اعلى ضد البكتيريا الكروية العنقودية الذهبية ولكنه اقل بالنسبة للإشريكية القولونية و الزائفة الزنجارية التركيز المثبط ضد البكتيريا الكروية العنقودية الذهبية لمستخلص بسكرة 2.95 ملجم//لضد الاشريكية لمستخلص البيض 1.17 ملجم/لضد الاشريكية ، لمستخلص بجاية 2.62 ملجم/لضد الاشريكية لمستخلص عين الصفراء 2.37 ملجم//لضد الاشريكية . التركيز المثبط ضد البكتيريا للإشريكية القولونية لمستخلص بسكرة 11.05ملجم//لضد الاشريكية لمستخلص البيض 6.37 ملجم//لضد الاشريكية ، لمستخلص بجاية 15.25 ملجم/لضد الاشريكية لمستخلص عين الصفراء 9.29 ملجم/لضد الاشريكية. التركيز المثبط ضد البكتيريا الزائفة الزنجارية لمستخلص بسكرة 11.41 ملجم//لضد الاشريكية لمستخلص البيض 7.32 ملجم/لضد الاشريكية ، لمستخلص بجاية 15.25 ملجم//لضد الاشريكية لمستخلص عين الصفراء 8.44 ملجم/لضد الاشريكية

كا ن التركيز المثبطا لادنى اقل في مستخلص البيض حيث بلغ 1.17 ملجم / لضد البكتريا العنقودية و الزائفة الزنجارية كان اعلى تركيز لمستخلص بجاية بقيمة 25.25 ملجم/لضد الاشريكية.

تشيرالنتائج التي تم الحصول عليها إلى تباين في نشاط المستخلصات اعتمادًا على الأصل الجغرافي.

الكلماتالمفتاحية: عكبر ، مضادحيوي ، أدنى تركيز مثبط ، ستافيلوكوكس أوريوس

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).

BFGF : Basic fibroblast growth factor.

CAPE : Caffeic acid phenethylestern

CD : Cluster of differentiation.

CMI : Concentration minimal inhibitrice

CTAB : Cetyltrimethyl ammoniumbromide

DMSO : Diméthyl-sulfoxyde

DPPH : 1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl

EAP : Extrait aqueux de la propolis

EEP : Extrait éthanolique de la propolis

E.coli *: Escherichia coli*

FCS : Fœtal calf serum

ENOS : EndothelialNitric oxide synthase .

ERK : Extracellular signal-regulated kinases.

HIF : Hypoxia-inducible factors .

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells.

HDL : High-density lipoproteins.

LDL : Low density lipoprotein.

IFN: Interferon

IFNγ : Interferon gamma .

IL : Interleukin.

LPS: lipopolysaccharide.

MAPK : Mitogen-activated protein kinases.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NADPH-oxydase: Nicotinamide adéninedinucléotide phosphate-oxydase.

NF-kappa B: Nuclear factor-kappa B.

NK: Natural Killer.

P.aeruginosa *: Pseudomonas aeruginosa.*

PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase .

PBMC : Peripheral blood mononuclear cell.

PMA: Phorbol miristate acetate.

QSI: Quorum Sensing Inhibitor.

ROS: Reactive Oxygen Species.

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

TNF : Tumor necrosis factor.

VEGF : Vascular endothelial growth factor.

VLDL : Very Low Density Lipoprotein.

SOMMAIRE

Introduction 1

Partie théorique 2

Chapitre I :Présentation de la propolis 4

I- 1- Definition de la propolis : 4

I .2. Historiquede la propolis 4

I .3. Origine de la propolis 5

I.4. Le role de la propolis dans la ruche 6

Chapitre II- Les Caractéristiques de la propolis 6

II.1. Propriétés Organoleptiques 6

II .2. Propriétés physico-chimiques 6

II.3.La Composition chimique de la propolis 7

Chapitre III- Propriétés thérapeutiques de la propolis 12

III.1. Activité antimicrobienne de la Propolis 12

III.1.1. Activité antibactérienne 12

III.1.2. Activité antifongique 14

III.1.3.Activité antivirale 16

III.1.4. Activité antiparasitaire 16

III.2.Activité anti oxydante 17

III.3. Action immunomodulatrice de la propolis 18

III.3.1.Action sur les macrophages et le système de complément 18

III.3.2. Action sur les lymphocytes et la production des anticorps 19

III.3.3.Effet Anti-inflammatoire 19

III.3.4. Activité antiallergique 20

III.4.Activité antitumoral 20

III.5.Effet Hepatoprotecteur 21

III.6.Activité anti-ulcéreuse 21

III.7.Les mecanismesd'action moléculaires de la propolis 22

III.7.1.Les mécanismes de l'action sur la lymphoprolifération 22

III.7.2. Les mecanismes de l'Activité anti-inflammatoire 23

III.7. 3. Les mecanismes de l'activité anti-oxidante 23

III.7.4. Les mécanismes de l'activité cardioprotectrice 24

III.7.5.Mécanismes dela supression de l'angiogenese 26

Chapitre IV : l'usage de la propolis 28

IV.1.Les extraits de la propolis 28

IV.2.Utilisation de la propolis en dermatologie 28

Partie expérimentale 30

II.1. Matériel et Méthodes 31

II.1. Objectif de l'étude 32

II.2.Lieu et la période de l'étude 32

II.3. Le plan experimentale 32

II.4. Préparation des échantillons de propolis 33

II.4.a. La matière première 33

II.4.b. Préparation des extraits éthanoliques des propolis(EEP) 33

II.5.La stérilisation 35

II.5.a. La méthode dela chaleur humide 35

II.5.b. La stérilisation par l'eau bouillante 35

II.6.Préparationdes milieux de culture 35

II.7.Préparation des souches 36

II.7.1. Conservation des souches 36

II.7.2. Culture sélective 36

II.8. Etude des souches bacteriennes 36

II.8.1.Etude microscopique 37

II.8.2. Etude biochimique 38

a- Test de Milieu Triple Suger Iron (TSI) 38

b- Mannitol Mobilité 39

c- Citrate de simmons 39

d- Gélose Hektoen 40

e- Gélose pourpre de bromocrésol (BCP) 40

f- Gélose chapman 40

g- Test KOH 41

h- Test catalase 41

II.9. Le test d'activité antibiotique (Antibiogramme) 42

II.9.1. Préparation de l'inoculum 42

II.9.2. La technique de diffusion sur gélose par puit 43

II.9.3. La méthode de diffusion par disque 44

II.9.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) (méthode de dillution) 44

a- Préparation des dilutions 45

II.10. Détermination de la concentration des dilutions 45

II.11. Le dosage de la tenur en polyphénol 45

II.2. Résultats et Analyse 47

1.Identification microscopique des souches 48

A.Coloration de gram 48

B.Coloration de la capsule 49

2.Etude Biochimique des souches 51

2.1. Le milieu TSI 51

2.2. Mannitol Mobilité 52

2.3. Citrate de Simmons 54

2.4.Gélose Hektoen 55

2.5.Gélose BCP 57

2.6.Gélose Chapman 57

2.7.Test de Gram au KOH 58

2.8.Test de catalase 59

3. Résultats de Test de détection de l'activité antibacterienne 61

4. Résultats de test de CMI 63

Les graphes de l'évaluation des CMI par la méthode des puits 65

Les graphes de l'évaluation de QMI pour la méthode des disques 73

5. Résultat de dosage des polyphénols totaux 74

II.3. Discussion 76

II. 3-1. L'études des souches bacteriennes 77

II.3.2. La detection de l'activité antibiotique des extraits 77

II.3.3. La determination des CMI 78

II.3.4. La quantification de la teneur en Polyphénol totaux 79

Conclusion 80

Liste des figures

Figure 1:Les abeilles ferment les vides de la ruche par la propolis 4
Figure 2 : Composition générale de la propolis brute 7
Figure 3 : Le squelette structurel des flavonoïdes lipophiles. . **Error! Bookmark not defined.**
Figure 4 : Structures chimiques des principaux constituants de l'extrait éthanolique de la propolis. 9
Figure 5 : Structures chimiques des principaux constituants de l'extrait aqueux de propolis.R1, R2 et R3 désignent les chaînes latérales de l'acide quinique, de l'acide caféique, des dérivés de l'acide cinnamique (artepilline C, baccharine et drupanine), des dérivés de l'acide caféoylquinique (acide 3,4-dicaféoyl quinique et acide 3,5-dicaféoyl quinique 10
Figure 6: Voies de transduction du signal en réponse au stress oxydatif généré par les ROS et l'action des composants de la propolis 24
Figure 7: Représentation schématique de la relation entre le stress oxydatif, les maladies cardiovasculaires et l'angiogenèse, et les effets de la propolis sur ces systèmes intégrés. 25
Figure 8:les mécanismes anti-angiogéniques proposés par EEBP (Kunimasa, K et al(2011). 27
Figure 9:Propolis en petite morceaux 34
Figure 10:AGITATION DE PROPOLIS(24H A FROID) 34
Figure 11:FILTRATION DE L'EXTRAIT 34
Figure 12: Sterilisation a la chaleur humide 35
Figure 13:Materiel necessaire pour la méthode de diffusion par puits 44
Figure 14:Observation microscopique d'Escherichia coliaprés une coloration de gram (grossissement x100) 48
Figure 15:Observation microscopique dePseudomonas aeruginosaaprés une coloration de gram (grossissement x100) 48
Figure 16:Observation microscopique d'une Staphylococcusaureusapres une coloration de gram (grossissement x100). 49
Figure 17:Observation microscopique d'une Escherichia coliapres une coloration de capsule 49
Figure 18:Observation microscopique dePseudomonas aeruginosaaprés une coloration de capsule. 50
Figure 19:Observation microscopique deStaphylococcusaureusaprés une coloration de capsule 50
Figure 20:Resultat de TSI pour Escherichia coli 51
Figure 21:Resultat de TSI pour Pseudomonas aeruginosa. 51
Figure 22:Resultat de TSI pour Staphylococcusaureus. 52
Figure 23 :Resultat test de mannitol mobilité pour Escherechia coli 52
Figure 24: Resultat test de mannitol mobilité pour Pseudomonas aeruginosa 53
Figure 25 : Resultat test de mannitol mobilité pour Staphylococcusaureus 54
Figure 26:: Resultat de test citrate de simmons pour Eschericha Coli. 54

Figure 27 :Resultat de test citrate de simmons pour Pseudomonas aeruginosa. 55
Figure 28: Resultat de test citrat de simons pourStaphylococcus aureus..... 55
Figure 29: Resultat d'un ensemensementd'Echerichia coli sur milieu hektoen..... 55
Figure 30Resultat d'un ensemensement de Pseudomonas aeruginosasur milieu Hektoen..... 56
Figure 31: Resultat d'un ensemensementd'Echerichia coli sur milieu BCP..... 57
Figure 32: Resultat d'un ensemensement d'echerichia coli sur milieu BCP. 57
Figure 33: Photo des colonies de Staphylococcus aureus sur milieu Chapman..... 58
Figure 34: Résutat de test KOH sur escherchia coli. 58
Figure 35: Resultat de test KOH sur Pseudomonas aeruginosa. 59
Figure 36 : Resultat de test KOH sur Staphylococcusaureus..... 59
Figure 37 :Photo represete un catalase + goute de l'eau oxygené. 59
Figure 38: photo représente un catalase - une goutte de l'au destillé avec une bacterie catalas - 59
Figure 39:Resultat de test catalase pour l'Escherchia coli..... 60
Figure 40: Resultat de test catalase pour la Pseudomonas aeruginosa 60
Figure 41: Resultat de test catalase pour la Staphylococcus aureus 60
Figure 42:Résultats de lactivité des extraits sur Staphylococcus aureus par methode des puit et des disque..... 61
Figure 43 : Résultats de lactivité des extrait sur Escherichia coli par méthode des puits et des disques..... 61
Figure 44: Résultats de lactivité des extrait sur pseudomonaseaeruginosaparméthode des puits et des disque..... 62
Figure 45 : Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis S. aureus..... 63
Figure 46:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis P. aeruginosa 64
Figure 47:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis E. coli..... 64
Figure 48:Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie Staphylococcus aureus pour l'extrait de Biskra..... 65
Figure 49: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérieEscherichia coli pour l'extrait deBiskra..... 65
Figure 50:Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bacteriePseudomonas aeruginosa pour l'extrait de Biskra 66
Figure 51: Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie Staphylococcus aureus pour l'extrait deEL-Bayed..... 66
Figure 52: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie E.coli pour l'extrait de EL-Bayed..... 67

Figure 53 : Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie P.aeruginosa pour l'extrait de El-Bayed. 67
Figure 54: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie Staphylococcus aureus pour l'extrait de Bejaia 68
Figure 55: Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie E.coli pour l'extrait de Bejaia 68
Figure 56:Représentationgraphique des diamétre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie P.aeruginosa pour l'extrait de Bejaia. 69
Figure 57:Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie Staphylococcus aureus pour l'extrait de Ain Safra. 69
Figure 58:Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérieE.coli pour l'extrait de Ain Safra 70
Figure 59:Représentationgraphique des diametresd'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie P.aeruginosa pour l'extrait de Ain Safra 70
Figure 60:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis S. aureus. Par la méthode des disques. 71
Figure 61: :Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie S. aureus pour l'extrait de Biskra. 73
Figure 62:Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie S. aureus pour l'extrait de El bayed. 73
Figure 63:Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie S. aureus pour l'extrait de Bejaia 74
Figure 64:Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux. 75
Figure 65:Histograme représente la quantité de polyohénol en mg dans 100g de propolis des différentes régions. 75

Liste des tableaux

Tableau 1:Composés caractéristiques de la propolis de différentes origines géographiques et de la source végétale respective 11
Tableau 2:Les activités biologiques de la propolis dépendent des constituants de la propolis. 13
Tableau 3:Effets de la propolis contre les micro-organismes pathogènes et les virus 15
Tableau 4 :les mesures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-visle Staphylococcus aureus.. 61
Tableau 5:les mesures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-vis*Escherichia coli* 62
Tableau 6:les mésures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-vis pseudomonaseaeruginosa 62
Tableau 7:Tableau récaputulatif des Résultats des CMI. 71
Tableau 8 : Tableau récaputulatif des Résultats des CMI. Méthode des disque 74
Tableau 9:Résultat de dosage des polyphénols totaux dans les différentes echantillons de lapropolis dans pour 100g. 75

Introduction

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25 à 30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons), les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années. En effet, il existe plusieurs filières de recherche scientifique qui focalisent sur l'exploration de ces substances qui constituent une alternative prometteuse aux substances d'origine synthétique et des modeles de developpement de nouvelles substances de synthese.Des efforts énormes sont consentis dans le domaine de la recherche médicale en vue de trouver de nouvelles molécules naturelles actives efficaces et non toxique (Sforcin*et* Bankova, 2011).

Les produits de la ruche représentent un type des sources naturelles exploitées par l'homme depuis des millénaires. Ils sont issus de substances naturelles, produits par les abeilles.Parmi ces produits, il y a la propolis quiestune matière produite par les abeilles pour garantir l'asepsie de leur ruche, qui est aussiréputée pour ses effets bénéfiques dans le traitement et la prévention des affections respiratoires. C'est un excellent immunostimulant qui se révèle d'avoir aussi des propriétés antibiotiques et cicatrisantes.

La propolis a suscité l'intérêt des chercheurs au cours des dernières décennies en raison de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques, telles que les propriétés immunomodulatrices, antitumorales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, entre autres (Bankova et al., 2000).

Le présent travail a été conçu pour étudier les activités bologiques principalment l'activité antibacterienne desextraits éthanoliques de la propolis algérienne obtenus à partir des quatre région differentes (Ain safra,El-bayed,Biskra et Bejaia).De ce fait nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir antibacterien de trois souches bacteriennes (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa*) à travers un antibiogramme et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits.

Partie théorique

Chapitre I :
Etude bibliographique

Chapitre I :Présentation de la propolis

I- 1- Definition de la propolis :

La propolis, ou «colle d'abeille» est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. Le nom de propolis vient du grec pro (avant) et polis (ville).La propolis est un produit complexe fabriqué par les abeilles (Apis mellifera) à partir de leurs sécrétions salivaires qui a montré son efficacité contre une variété de bactéries, de virus, de champignons et de moisissures. Elle s'est même avéré être un immunostimulant non spécifique (Castaldo et Capasso, 2002).



Figure 1:Les abeilles ferment les vides de la ruche par la propolis (https://www.consoglobe.com).

I .2. Historiquede la propolis

Dès l'antiquité, la propolis était employée comme moyen thérapeutique contre les affections de la peau, les plaies et les suppurations. Les Égyptiens, les Grecs, les Romains et les Mayas utilisaient les produits issus de la ruche à des fins préventives, curatives et alimentaires. La propolis avait un rôle religieux dans l'Égypte ancienne (3200 à -1100 ans avJC), les Egyptiens utilisaient cette résine pour embaumer les morts, elle était réputée pour ses propriétés conservatrices et son arôme. On l'employait aisément lors de la momification (Crane, 1999). Les Grecs (700 à -600 ans av JC), ont observé que cette substance résineuse se situait à l'entrée de la ruche comme barrière de protection

contre les prédateurs (Golder, 2004). Hippocrate recommandait la propolis pour la guérison des plaies et des ulcères (Viel et Dore, 2003).

A Rome, les soldats romains, eux, partaient au combat avec un morceau de propolis pour cicatriser leurs futures plaies. La propolis était réputée pour réduire les œdèmes, apaiser les douleurs nerveuses et guérissait les plaies cutanées ou encore les abcès (Ransome, 1937). Durant la même période, en Amérique du Sud, les Incas utilisaient la propolis comme antiseptique

Les Arabes connaissaient aussi la propolis. Avicenne a parlé de deux sortes de cire: la cire propre et la cire noire, cette dernière étant probablement la propolis. Il a dit:«par sa forte odeur, elle fait éternuer...» et «Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement» (Crane, 1999; Fearnley, 2001).

Au XVIème siècle, elle servait à cicatriser les blessures de flèches. C'est surtout au XVIII et XIXème siècle que la propolis fut utilisée pour panser les plaies. Elle était très répandue sur les champs de batailles notamment lors de la guerre des Boers en Afrique du Sud pour soigner les soldats et accélérer le processus de cicatrisation. Elle était reconnue pour son action antiseptique, anesthésique et cicatrisante (Ransome, 1937;Fearnley, 2001).

I .3. Origine de la propolis

La propolis est un produit complexe fabriqué par les abeilles (Apis mellifera) à partir de leurs sécrétions salivaires et les resines des plantes que collectent les abeilles et les mélanges avec la cire, par conséqunece la composition de la propolis est dépendante en partie des plantes de la zone geographique ou les abeilles habitent.

Les abeilles ne produisent pas la propolis avec la meme cadence, la race des abeilles et la sous espece joue un role aussi dans la qualité et la composition de la propolis, il y a certaines sous especes qui propolisent peu comme *Apis melliferacarnica*, la sous espece *Apis melliferacaucasica* est la plus productrice de la propolis. (Stefan Bogdanov and Vassya Bankova. 2016)

En Algerie, la propolis provient de deux sous especes d'abeille *Apis melliferaintermissa*, et *Apis melliferasahariensis* qui sont des races proches des abeilles de sud européen.

I.4. Le role de la propolis dans la ruche

Les abeilles appliquent de la propolis en couche mince sur les parois internes de leur ruche ou de toute autre cavité qu'elles habitent. Elle est utilisée pour boucher les trous et les fissures, réparer les peignes, renforcer les bords fins du peigne et pour rendre l'entrée de la ruche étanche ou plus facile à défendre. (Ghisalberti E.L 1978), et aussi pour polir les cellules du nid d'abeilles. Les cadavres des intrus qui ne peuvent être évacués tels que lézards, serpents et souris sont embaumés avec de la colle d'abeille, protégeant ainsi la colonie contre la flore désagréable et la flore bactérienne des cadavres en putréfaction (Ghisalberti*et al.*, 1978 ;Bankova*et al.*, 2000). La propolis est aussi employée par les abeilles pour enduire les alvéoles afin d'optimiser la régulation du microclimat dans la ruche (PROST, 2005).

Chapitre II- Les Caractéristiques de la propolis

La propolis est une matière lipophile, dure et cassante à froid mais devient molle, souple, gommeuse et très collante à chaud (Hausen et al. 1987).Elle possède une odeur aromatique caractéristique et agréable et sa couleur varie du jaune-vert au rouge et au brun foncé selon sa source et son âge (Marcucci, 1995 ; Bankova et al., 2000).

II.1. Propriétés Organoleptiques

- Couleur : jaune, orange, verte, violette, brune, noire, dependant de son origine.
- Odeur : la propolis possède une odore caracteristique.
- Saveur : âcre, piquante, parfois amère, qui donne une insensibilisation de la muqueuse buccale (SAUVAGER, 2014).

II .2. Propriétés physico-chimiques

- La Consistance : variable selon la température : dure et friable à 15°C, molle à 30°C et gluante et collante au-delà et fond à 60/70°C.
- La Densité est de 1.2.
- La Solubilité : très peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'alcool, l'acétone, le benzène et l'éther.

II.3.La Composition chimique de la propolis

La composition chimique de la propolis est assez complexe et varie en fonction du moment de la collecte, de climat de l'origine géographique, de la flore locale, de la variété des arbres et des espèces végétales utilisées pour la collecte (Crane E1990, Bankova, V2005). La propolis est généralement composéede 50% de résine, 30% de cire d'abeille, 10% d'huiles essentielles et aromatiques, 5% de pollen d'abeille et 5% de autres substances qui comprennent des vitamines telles que les vitamines A, B1, B2, B6, C, D, E, l'acide nicotinique (vitamine B3) et l'acide folique (vitamine 9), ainsi que des macro et oligo-éléments tels que le calcium, le magnésium, le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse, le nickel, le cobalt, le vanadium et le strontium (Burdock GA1998.Bankova V 2005. Bankova V 2002.Castaldo S2002). (Fig.2). De plus, la propolis contient également des glucosidases.

Selon l'origine géographique (variabilité des plantes et de la saison), les propolis peuvent contenir entre 250 et 350 constituants. Les principaux constituants identifiés dans la propolis sont les flavonoïdes, les acides phénoliques et leurs esters et les terpènes (Nolkemper S,2010).

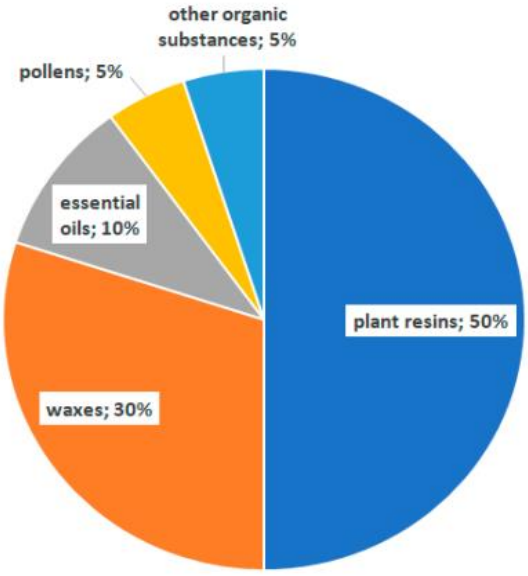


Figure 2 : Composition générale de la propolis brute

Les flavonoïdes peuvent être classés en divers sous-groupes tels que les flavones, les flavanones, les flavonols, les dihydroflavonols et les isoflavones (Fig. 3) (Marcucci MC 2000. Gardana C,2007).

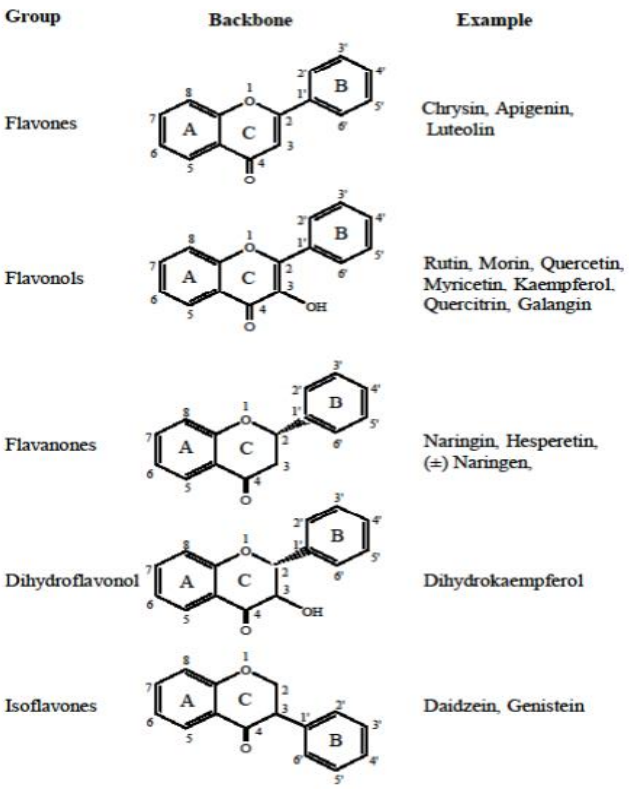


Figure 3 : le squelette structurel des flavonoides

L'extrait éthanolique de la propolis comprend des constituants phénoliques tels que l'ester phénéthylique d'acide caféique (CAPE), la quercétine, la lutéoline, le kaempférol, la galangine, l'apigénine, la chrysine et la naringénine (Fig. 4).

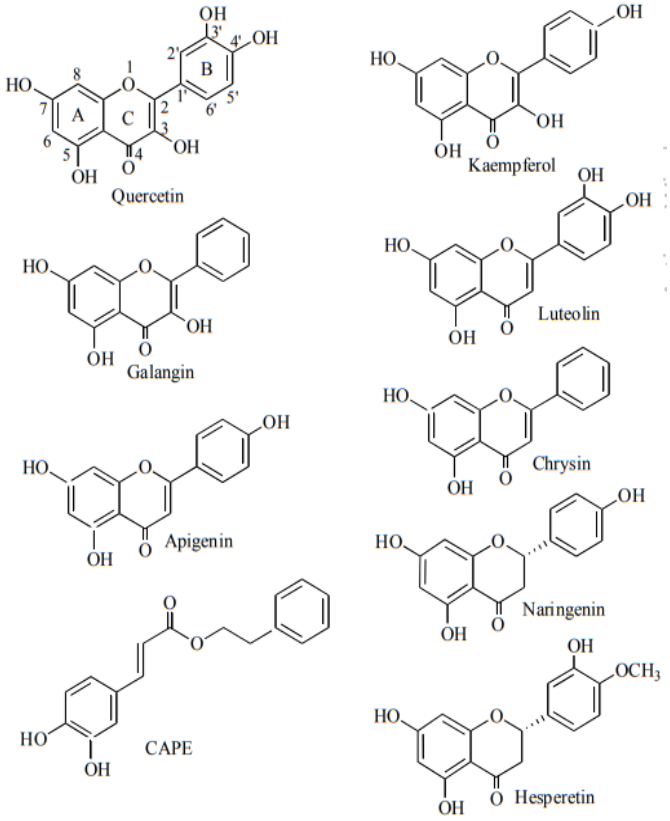
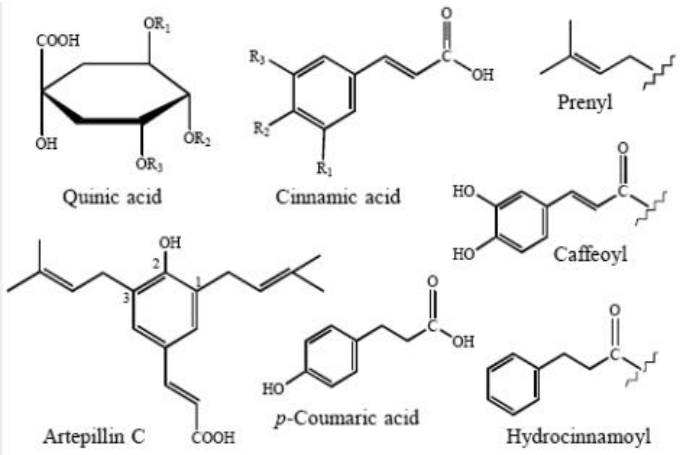


Figure 3 : Structures chimiques des principaux constituants de l'extrait éthanolique de la propolis.

.(Farooqui, T., & A. Farooqui, A. (2010))

L'extrait aqueux de propolis ne contient que la partie soluble de la propolis mais contient des constituants majeurs comprenant des dérivés d'acide cinnamique prénylé tels que l'artepilline C, la baccharine et la drupanine; les dérivés de l'acide caféoylquinique tels que l'acide chlorogénique, l'acide 3,4-di-caféoylquinique et l'acide 3,5-di-caféoylquinique.(Fig 5).



	R1	R2	R3
Artepillin C	prenyl	OH	prenyl
Druoanin	H	OH	prenyl
Baccharin	H	hydrocinnamoyl	prenyl
Quinic acid	H	H	H
Caffeic acid	H	OH	OH
Cinnamic acid	H	H	H
Chlorgenic acid	caffeoyl	H	H
3,4-dicaffeoyl quinic acid	caffeoyl	caffeoyl	H
3,5-dicaffeoyl quinic acid	caffeoyl	H	caffeoyl

Figure 4 : Structures chimiques des principaux constituants de l'extrait aqueux de propolis.R1, R2 et R3 désignent les chaînes latérales de l'acide quinique, de l'acide caféique, des dérivés de l'acide cinnamique (artepilline C, baccharine et drupanine), des dérivés de l'acide caféoylquinique (acide 3,4-dicaféoyl quinique et acide 3,5-dicaféoyl quinique

(Farooqui, T., & A. Farooqui, A. 2010).

Ainsi, la variabilité chimique de la propolis provenant de différentes origines phytogéographiques et botaniques pose un problème car différents échantillons de propolis exercent des activités biologiques complètement différentes.

Tableau 1:Composés caractéristiques de la propolis de différentes origines géographiques et de la source végétale respective

Origine géographique	Sources végétales	Constituants typiques (composants principaux)	Références
Méditerranéen, Algérie	*Populussp.*Cistussp	Pinocémbrine, pinobanésine et son acétate, chrysine, apigénine, pectolinarigénine, pilosine, ladanéine, galangine, naringénine, tectochrysine, méthoxychrysine, esters prényliques des acides caféiques, acides feruliques, acides diterpéniques comme l'acide hydroxyditerpénique, le labdane et le clérodane	(Piccinelli et al,2013)
Suisse	P. tremula	Le p-coumarate de benzyle, le férulate de benzyle et les glycérides phénoliques tels que le dicoumaroylacétylglycerol, le diféruloylacétylglycerol, le ferouloylcumaroyleacétyl glycérol et le caffeoylcoumaroylacétylglycerol	(Bankova et al., 2002)
Grèce	Probablement Conifersp.	Les flavonoïdes, les acides diterpéniques tels que isocupressic, pimarique, et les acides communic, isoagatholal, agathadiol, ferruginol, 8-élémène et totarol	(Popova et al., 2010a ; Celemi et al., 2013)
Russie	Betulasp,Plus spécifiquement B. verrucosa, B. pendula et B. Pubescens	Les acides cinnamiques, les sesquiterpénols de phénylpropanoïde, l'acacétine, l'apigénine, l'émanine, la rhamnocitrine, le kaempferide, l'α-acétoxybétulénol	(Bankova et al., 2000 ; Isidorov et al., 2014)
Afrique,Nigeria,Kenya	Probablement M. schweinfurthii	Isoflavonoïdes, isoflavonoïdesprénylés et stilbénoïdes. Les triterpènes, les lignanes d'arylnaphtalène tels que la tétrahydrojusticidine B et la 6-méthoxydiphylline, les geranylstilbènes et la macarangine de geranylflavon	(Zhang et al., 2014 ; Petrova et al., 2010)
Oman	Azadirachtaindica, Acacia sp. Et Mangiferaindica	Les triterpènes, les flavanonesprénylées telles que la 7-O-méthyl-8-prénylnaringénine, la 3, 8-diprénylnaringénine et la 8-prényl-5,7-dihydroxy-3 - (3-hydroxy-3- méthylbutyl) -4-méthoxyflavanone, Chalcones, cardanol, cardols et acides anacardiques	(Popova et al., 2013)
Indonésie, Myanmar	Mangiferaindica	Alk (én) ylrésorcinols, les triterpènes de type cycloartane, les cycloartanes et les flavanonesprénylées	(Trusheva et al., 2011 ; Li et al., 2009)
Europe, Amérique du Nord, Nouvelle-Zélande, et les zones tempérées de l'Asie	Populussp., Plus principalement P.nigra	Pinocémbrine, pinobanksine, chrysine, galangine, acide caféique, acide férulique, acide cinnamique et leurs esters	(Bankova et al., 2000 ; Falcao et al., 2010 ; Sun et al.,2012)
Brésil Propolis rouge Propolis vert	Baccharissp.Principalement B. dracunculifolia Dalbergia ecastaphyllum	Les phénylpropanoïdesprénylés, les acides phénoliques, les acides p-coumariquesprénylés, les acétophénones, les acides diterpéniques, les acides caffeoylquiniques, le kaempferide, l'isosakuranétine et le kaempferolFormononetin, isoliquiritigenin, liquiritigenin, medicarpin et biochanine A	(Bankova et al 2005/2000 ;Park et al.2002 da silva et al.2013 ;Daugch et al2008;Silva et al 2008).

Chapitre III- Propriétés thérapeutiques de la propolis

De nombreux articles scientifiques sont publiés chaque année dans différentes revues internationales liées aux propriétés pharmacologiques de la propolis (Banskota 2001).Les propriétés pharmacologiques de chaque type de propolis seront conditionnées par sa composition. (Bankova V 2005). Depuis une cinquantaine d'années, la littérature scientifique a rapporté et confirmé un bon nombre de propriétés therapeutiques de la propolis (Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S 2001) comme les effets antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, antioxydants, hépatoprotecteurs, immunomodulateurs, antitumoraux, antiradiation, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et autres activités.

III.1. Activité antimicrobienne de la Propolis

L'activité antimicrobienne de la propolis est la propriété biologique la plus importante(Bogdanov, 2016). Même si la propolis a une composition chimique différente, ansi que l'emplacements géographiques, tous présentent une activité antimicrobienne importante. (Kujumgiev et al., 1999).

III.1.1. Activité antibactérienne

L'activité bactéricide de la propolis et/ou de ses constituants est la plus largement documentée,cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram– (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+. (Dolci P, 2003) (Lu LC, 2005) .

Cela s'explique par la structure spécifique à l'espèce de la membrane externe des bactéries Gram négatives et la production d'enzymes hydrolytiques qui décomposent les ingrédients actifs de la propolis (Ke˛dzia, B;Hołderna-Ke˛dzia, E. Aktywnos´c´. 2013) malgré la difference de la compositon de la plupart des échantillons examinés de la propolis,les resultats indiquent que la propolis possède une forte activité antibactérienne (ghisalberti,1979).

Cette activité antibactérienne de la propolis peut etre similaire malgré la différence de l'origine géographique et botanique ou par allieurdifférante. La propolis prélevée dans les ruches de la sous espece *Apis melliferacarnica* (abeille carniolienne–de la slovénie)a montré une activité antibactérienne plus faible que les sous especes*Apis melliferaanatolica* et *Apis melliferacaucasica*.

Tableau 2:Les activités biologiques de la propolis dépendent des constituants de la propolis.

Activité	Composants impliqués	Références
Antimicrobienne (En générale)	Les Terpenes (les diterpenes, et les triterpenes)	(Popova MP, 2009) (Abd El Hady FK, 2002) (Serkedjieva J.1992)
Antibacterienne	Chrysine, apigenine, pinocembrine and galangine Polyphenols, flavonoides	(Orsi RO, 2005) (Bankova V, 1995)
Antiviral (anti-virus de l'influenza et anti-Herpes simplex virus type2)	Polyphenols, flavonoides, acides phenylcarboxyliques,esters de l'acide cinnamique substitué (acidecaffeique, acide p-coumarique, acide benzoique, galangine, pinocembrine, chrysine)	(Serkedjieva J, 1992) (Nolkemper S, 2009)
Anti-oxidante	Ester phénéthylique d'acide caféique (CAPE), Acidecaffeique, quercetine,kaempférol, luteoline, chrysine, Propolines, Polyisoprenylatedbenzophenone, Artepilline C Dérivées de l'acide Caffeoylquinique	(Gómez-Romero M, 2007) (Kumazawa S & , 2004) (Loke WM, 2008) (Chen C-N,2004) (Kumazawa S,2007) (Cuesta Rubio O,2002) (Nakanishi I,2003) (Izuta H,2009)
Anti-inflammatoire	CAPE, quercetine, chrysine	(Mirzoeva OK,1996) (Moura SA,2010)
Immunomodulatrice	Ester phénéthylique d'acide caféique (CAPE)	(Sforcin JM,2007) (Park SG,2008)
Hepatoprotectrice	CAPE, chrysine, diterpenes	(Lin SC,1997) (Pushpavalli G,2010)
Cardioprotectrice	CAPE, acacetine, chrysine, quercetine	(Chopra S,1995) (van Acker SA,1996)
Anticancereuse Antitumoral	CAPE, artepilline C, chrysine, quercetine, propoline C et D Artepilline C, acide caféique, CAPE, quercetine, derivés de l'acide cinnamique, baccharine, drupanine, propolines	(Kimoto T, 1998) (OrsoliN, 2004) (Chen C-N, 2004) (Siess MH, 2000) (Seda Vatansever H,2004) (Chen CN, 2009)
Anti-ulcere	Acide Caffeique, acide ferulique, acide p-coumariqueet acide cinnamique,les huiles essentielles	(Cestari SH, 2009) (Lemos M, 2007)

Aussi les expériences ont révélé qu'il pourrait y avoir desdifférences dans l'activité antibactérienne des extraits de propolis en fonction des différentes races d'abeilles. (Silici et Kutluca, 2005).

Les bactéries anaérobies du genre Fusobacterium étaient les plus sensibles aux faibles concentrations (0,01-0,06 mg /ml) d'extrait éthanolique de propolis (EEP). Cependant, les bactéries du genre Actinomyces, Bacteroides, Clostridium, Peptococcus, Peptostreptococcus et Propionibacterium étaient sensibles à l'EEP à des concentrations élevées (1–3 mg / mL) (IzabelaPrzybyłek and Tomasz M. Karpiński 2019). L'organisme le plus sensible était toujours Bacillus cereus, suivi par Bacillus subtilis et Staphylococcus aureus. (Ghisalberti, 1979).

L'activité antibactérienne de la propolis contre des bactéries pathogènes ou nocives est résumée dans le tableau 2 ci-dessous (Ghisalberti, 1979;Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001b; Orsolic et al., 2004; David et al., 2012; Gressler et al., 2012). La propolis est plus active contre les pathogènes à Grampositifs mais de nombreuses bactéries à Gram négatives sont également inhibées (Tableau 3).

Des recherches ont révélé une activité antibactérienne contre *Micrococcus luteus,Salmonella typhimurium*et*Klesbsiellapneumonae* (Victorino et al., 2007). Bien que l'effet antibactérien de la propolis est bactéricide (Grange et Davey, 1990;Mirzoeva et al., 1997; Pepeljnjak et Kosalec, 2004), par inhibition de leur mobilité (Mirzoeva et al., 1997). Chaque type de propolis agit différemment. (Savka et al.2015), ont montré que l'activité antibactérienne de la propolis de peuplier repose également sur l'action inhibitrice des molécules du QS (quorum sensing ou de communication cellulaire) appelés aussi quorum sensinginhibitor (QSI). La pinocébrine flavonoïde est un important agent QSI.

III.1.2. Activité antifongique

La propolis possède des propriétés antifongiques importantes sur différents champignions. Les acides aromatiques tels que les acides benzoïque, férulique et caféique, les esters d'acide phénolique, les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont les principales classes de composés du EEP responsables de cette

activité.L'activité antifongique contre *Candida albicans* a été rapportée par différents auteurs (Burdock., 2011; Imhof et al., 2005).

Tableau 3:Effets de la propolis contre les micro-organismes pathogènes et les virus d'aprés(Ghisalberti, 1979;Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001b; Orsolic et al., 2004; David et al., 2012; Gressler et al., 2012).

Microorganisme	Espèces
Bactéries à Gram positif	*Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Corynebacterium spp., Corynebacteriumdiphtheriae, Diplococcuspneumonae, Enterococcus spp., Mycobacteriasp., Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Streptococcus: S. critecus, S. epidermis, S. faecalis, S. mutans, S. pyogenes, S. viridans, S. sobrinus,*
Bactéries à Gram négatif	*Branhamellacatarrhalis, E. coli, Helicobacter pylori, Klebsiella mozaemae, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella : S. choleraesuis, S. dublin, S. enteritidis, S. exneri, S. gallinarum, S. pullorum, S.paratyphi-A, S. paratyphi-B, Shigella dysinteriae, Sh. sonnei*
Champignons	*Aspergilussp., Candida albicans, C. guiliermondi, C. parapsilosis, C. tropicalis;Cryptococcussp., Cryptococcusneoformans, Histoplasmacapsulatum, Madurellamycetomi, Microsporum: audoinini, canis, cepleo, distortum, ferrugeneum, gypseum; Piedrahortae, Phialophorajeanselmei, Saccharomyces sp., Trichophyton: sp., mentagrophytes, rubrum, Trichosporoncutaneum*
Virus	*Adenovirus, Coronavirus, Herpes symplex, InfluencaA et B virus, Newcastle disease virus, Polio virus, Vaccinia, Rotavirus; VesicularStomatitis Virus, Coronar virus*
Parasites	*Cholomonasparamecium, Eimeria: magna, media, perforans; Giardia lambia, Giardia duodenalis, Trichomonas vaginalis, Trypanosomacruzi, Trypanosomaevansi*

L’EEP a un potentiel intéressant en tant qu'agent thérapeutique qui cible la formation de tubes germinatifs par les spores de *C. albicans*(La germination est l'un des facteurs de virulence interdépendants importants dans la pathogenèse des infections à Candida) (N.S. Haghdoosta, T.Z. Salehi b, A. Khosravi a, A. Sharifzadeh a 2016).

III.1.3.Activité antivirale

Il existe peu de données disponibles concernant les effets antiviraux de la propolis, mais les études réalisées ont montré que la propolis de diverses régions géographiques présente une activité antivirale importante, agissant à différents niveaux et interférant avec la réplication de certains virus (Fokt et al., 2010).L’activité antivirale a été étudiée in vitro contre plusieur virus.

A cause de la composition complexe de la propolis, plusieurs composés pourraient être responsables de l'activité contre les virus de l’Herpes (HSV), l'Adénovirus et le virus de la stomatite vésiculeuse, tandis que les flavonoïdes sont probablement les composés inhibiteurs du poliovirus. (Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. 1992).

La propolis est très active in vitro contre le poliovirus et les virus de l'herpès, tandis que le virus de la stomatite vésiculaire et l'adénovirus sont moins sensibles (Fokt et al., 2010).

III.1.4. Activité antiparasitaire

Une autre propriété biologique importante déjà attribuée à la propolis est l'activité antiprotozoaire.Cette propriété estévaluée par un effet inhibiteur de croissance in vitro sur une culture de parasites après incubation en présence de différentes concentrations de propolis.

Plusieurs publications ont rapporté l'effet de la propolis européenne sur les protozoairestelles que la trichomonase, la toxoplasmose, la giardiase, la maladie de Chagas, la leishmaniose et le paludisme. En effet, une activité antiprotozoaire a également été rapportée sur *Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis,Toxoplasma*

gondii, *Leishmania donovani* et *Trypanosomacruzi*,aussi une activité antiprotozoaire de l'EEP a été rapportée contre *Giardiaduodenalis*, ainsi qu'un effet inhibiteur sur l'adhérence des trophozoïtes et une réduction de la fréquence des battements de flagelles dans une grande partie des trophozoïtes. (Fokt et al., 2010).

La Propolis aussi semble avoir un effet prophylactique contre le paludisme dans les zones d'endémie du Brésil (Gama GB 1993).

III.2.Activité anti oxydante

La propolis contient principalement des flavonoïdes et des composés phénoliques, qui auraient des propriétés antioxydantes.En raison de son effet antioxydant, la propolis peut protéger les humains contre les processus oxydatifs délétères.Plusieurs groupes de chercheurs ont étudié les propriétés antioxydantes de la propolis et de ses constituants actifs.

Matsushigeetal. (1995) a étudié l'activité antioxydante de cinq échantillons de propolis différents, prélevés au Brésil,en comparaison avec les extraits de Methanol les extraits aqueux de la propolis brésilienne ont montré des effets antioxydants plus forts envers les radicaux libres DPPH et les radicaux anions superoxide.

De même, Oyaizu et al. (1999a, 1999b) ont également examiné l'activité antioxydante des extraits de propolis chinoise, australienne, néo-zélandaise et japonaise et observé une activité positive.

Moreno et al. (2000a) ont également examinél'activité piégeant les radicaux libres de la propolis de plusieursrégions d'Argentine. Les auteurs ont montré que tous les échantillons ont piégé les radicaux libres DPPH et que les échantillons prélevés à Tucuma´n et Santiago delEsteroont révélé le plus haut degré d'activité.

La propolis est une source prometteuse de polyphénols biologiquement actifs responsable d'une activité antioxydante élevée realisée par les tests DPPH, ABTS, FRAP et ORAC.La propolis brune et la verte présentent des quantités de composés bioactifs plus élevées que les espèces rouges.

Les mécanismes d'action antioxydante peuvent inclure la suppression de la formation et l'élimination ou l'inactivation des espèces réactives à l'oxygène(ROS), (Alfred NgengeTamfu et all 2019).

III.3. Action immunomodulatrice de la propolis

La connaissance des mécanismes d'action de la propolis sur le système immunitaire a progressé ces dernières années. Des tests in vitro et in vivo ont démontré que la propolis peut activer les macrophagesen augmentant leur activité microbicide. La propolis améliore l'activité lytique des cellules tueuses naturelles contre les cellules tumorales. Il stimule également une production d'anticorps plus élevée, suggérant son utilisation dans les vaccins, comme adjuvant.

On savait peu de choses sur l'action immunomodulatrice de la propolis jusqu'aux années 1990, mais au cours de la dernière décennie, de nouveaux articles intéressants ont été publiés, apportant une contribution importante à ce domaine de recherche.

La propolis possède une action immunomodulatrice in vitro et in vivo sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise (Orsatti CL, MissimaF, Pagliarone AC, et al. (2010) ; Park JH, Lee JK, Kim HS, et al.2004).

III.3.1.Action sur les macrophages et le système de complément

Dans les modèles d'immunosuppression, l'administration d'un dérivé hydrosoluble de propolis à des souris a empêché les effets du cyclophosphamide et amélioré le taux de survie des animaux (Dimov et al., 1991). Ces auteurs ont également suggéré que la propolis module l'immunité non spécifique via l'activation des macrophages.

La propolis a stimulé la production de cytokines, telles que l'IL-1 et le TNF-, par des macrophages péritonéaux de souris (Moriyasu et al., 1994) ; La propolis (0,150 mg / g) a également été capable de moduler à la fois la production in vivo et in vitro de la protéine de complément C1q par les macrophages ainsi que la fonction de récepteur du complément soit directement soit via des cytokines (Dimov et al., 1992).

Des essais in vitro ont montré que la propolis inhibe les voies classiques et alternatives du système du complément (Ivanovska et al., 1995a). Le C3 était l'une des cibles de l'action de la propolis, et les flavonoïdes et les composés phénoliques ont

été désignés comme ses principaux composés anticomplémentaires (Georgieva et al., 1997).

Il a été démontré que six composés isolés de propolis, identifiés comme dérivés de l'acide caféoylquinique, amélioraient lamotilité et propagation des macrophages (Tatefuji et al., 1996).

III.3.2. Action sur les lymphocytes et la production des anticorps

La propolis supprime fortement la synthèse d'ADN des cellules mononucléaires du sang périphérique humain (PBMC) et des cellules T purifiées de manière dose-dépendante. Ces effets sont au moins en partie médiés par certains de ses constituants, à savoir l'ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE) et les flavonoïdes quercétine et hespéridine (Ansorge et al., 2003).

Elle augmente la production de cyto- kines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (Orsi ROF, et al.2000)(Sforcin JM,2007)

Des études antérieures ont montré que les flavonoïdes possèdent un effet immunosuppresseur sur la réponse lymphoproliférati④etétant donné que la propolis en contient (Bankova et al., 1998b), cela pourrait expliquer l'origine des effets signalés.

III.3.3.Effet Anti-inflammatoire

L'une des propriétés médicinales traditionnelles bénéfiques de la propolis est son effet anti-inflammatoire. La propolis est couramment utilisée pour le traitement de certaines maladies inflammatoires cutanées (Marcucci, 1995).Une réduction significative de l'inflammation aiguë provoquée par le zymosan chez la souris après l'administration orale de dérivés solubles dans l'eau de la propolis à une dose de 150 mg / kg (Ivanovska et al.1995)

L'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes et du CAPE est principalement liée à leur activité antioxydante (Krol et al.1996).

L'extrait de propolis a inhibé de manière significative le développement d'un œdème dans la patte arrière induit par la carraghénine chez les rats à une dose orale de 100 mg / kg (Park et al. 1996).

III.3.4. Activité antiallergique

Il a également été montré que la propolis exerçait une activité antiallergique. La prise de propolis réduit les éternuements et les irritations dans le cas de rhinite allergique par inhibition de la libération d'histamine (ShinmeiYet al.2009). La prise orale quotidienne de propolis pendant deux mois a permis une réduction du nombre et de la sévérité des crises nocturnes et une amélioration des fonctions ventilatoires chez des patients souffrants d'asthme. En parallèle, ces auteurs ont constaté une diminution des prostaglandines, des leucotriènes et des cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de cytokines anti-inflammatoires chez ces patients (Khayyal MT et al.2003).

III.4.Activité antitumoral

Différents types de propolis peuvent contenir une quantité variée d'acide 3,5-diprényl-4-hydroxyl-cinnamique (DHCA), qui était fréquemment appelée artepilline C. Une découverte a indiqué que le DHCA présentait des effets inhibiteurs sur la cancérogenèse rénale en raison de sa propriété antioxydante (radical scavenger). Matsuno et al ont rapporté que le DHCA est l'un des composés antitumoraux efficaces dans la propolis, et Kimoto et al ont montré que le DHCA est capable de réduire la charge tumorale dans certains modèles animaux (Ying-Nong Lee a, 2006).

La propolis possède plusieurs composés actifs antitumorauxet son action antiproliférative sur les cellules tumorales est attribuée à l'effet synergique de ses constituants,les principaux mécanismes par lesquels la propolis affecte les cellules tumorales sont liés à l'inhibition de la croissance cellulaire et à l'induction de l'apoptose (Sforcin, 2007).

Orsolic et al. (2006) ont suggéré que l'activité antitumorale de la propolis et de certains de ses constituants est associée à l'augmentation de l'immunité antitumorale non spécifique, via l'activation des macrophages, qui à son tour pourrait produire des

facteurs solubles et interférer directement dans les cellules tumorales ou dans les fonctions d'autres cellules immunitaires.

L'administration de propolis à des souris porteuses de mélanome a été soumise à une expression d'IL-2 stimulée par le stress, ainsi qu'à une production de cytokines Th1 (IL-2 et IFN-γ), indiquant l'activation d'une immunité à médiation cellulaire antitumorale. La propolis a également stimulé l'expression et la production d'IL-10, ce qui pourrait être lié à des effets immunorégulateurs. Les données indiquent que la propolis a exercé une activité immunomodulatrice dans ce test, qui peut être liée à son action antitumorale in vivo.(Missima,F.et al .2010).

III.5.Effet Hepatoprotecteur

L'effet hépatoprotecteurd'unepropolis cubaine a été examiné par « Gonzalez et al » en 1994 dans un modèle murin d'hépatotoxicité aiguë induite par une dose orale élevée (600 mg / kg) de paracétamol, l'extrait de propolis a réduit les dommages au foie induits par le paracétamol.Les memes résultats ont été rapporté par Ramirez et al. (1994) sur un modelexperimentale similaire.

Merino et al. (1996) ont trouvé une réduction significative des cellules gonflées dans le foie des rats traités à la propolis (25, 50 et 100 mg / kg de poids corporel).

Banskota et al. (2000) ont examiné les effets protecteurs des hépatocytes de neuf échantillons de propolis différents prélevés au Brésil, au Pérou, aux Pays-Bas et en Chine sur la mort cellulaire induite par le D-GalN / TNF dans les hépatocytes primaires de souris en culture à des concentrations de 200 et 100 g / ml. Il a été observé que presque tous les extraits de méthanol possédaient des effets protecteurs des hépatocytes plus forts que les extraits d'eau correspondants.En outre, tous les extraits de méthanol possédaient une activité hépatoprotectrice significative.

III.6.Activité anti-ulcéreuse

Tossoun et al. (1997) et Boyanova et al. (2005), ont rapporté que le miel et la propolis ont été efficaces en tant que traitement des ulcères cutanés chroniques. En

effet, la propolis bulgare possède un effet inhibiteur in vitro sur la croissance d'*Helicobacter pylori*. En utilisant différentes méthodes (diffusion sur gélose, méthode des puits, disques secs ou humides) pour évaluer l'activité d'un extrait éthanolique de propolis bulgare (EEP à 30%);Kimoto et al. (1998) sont parvenus à conclure que cette propolis possédait une activité antibactérienne considérable contre *H. pylori* et pouvait inhiber la croissance de *Campylobacter jejuni* et de *Campylobacter coli*.

III.7.Les mecanismesd'action moléculaires de la propolis

III.7.1.Les mécanismes de l'action sur la lymphoprolifération

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires possibles responsables de la régulation négative de la croissance cellulaire par la propolis, Ansorge et al. (2003) ont étudié la voie du signal de la kinase MAP (protéine activée par un mitogène), mesurant l'induction de l'expression de l'ARNm de la kinase régulée par le signal extracellulaire(extracellular signal-regulated kinases 2 (ERK-2) dite aussi MAP kinase 1), qui est capable de réguler plusieurs facteurs de transcription qui à leur tour contrôlent la régulation des gènes critiquesdes lymphocytes dont celui de l'interleukineIL-2.

L'ERK-2 est impliqué dans l'induction de phénomène de sénéscence cellulaire (arret de divion) et l'apoptose en cas de detection de domage à l'ADN cellulaire, on parle ici de « Ras-Raf-MEK-ERK pathway » qui est un mecanisme important dans l'étude de la cancerogenese.

L'Erk-2 a été fortement supprimée dans les PBMC (peripheralbloodmononuclearcells) stimulés à la propolis, ce qui suggère clairement qu'une façon de signalisation déclenchée par la propolis est médiée par la MAP kinase Erk-2, bien que le rôle potentiel de la propolis comme immunorégulateur soit souligné (Ansorge et al. (2003)). Une autre explication des effets inhibiteurs de la propolis sur la lymphoprolifération vient de l'observation que CAPE (caffeicacidphenethyl ester) a des effets inhibiteurs à la fois sur les facteurs de transcription NF-B et NFAT (Marquez et al., 2004).

III.7.2. Les mecanismes de l'Activité anti-inflammatoire

La propolis exerce une activité anti-inflammatoire. Il supprime non seulement la génération des prostaglandines et de leucotriènes en inhibant l'expression et les activités des cyclooxygénases et des lipoxygénases (Fig.5), mais aussi en retardant l'expression génique de l'oxyde nitrique synthase, l'activation de NF-kB médiée par le TNF et en réduisant le système immunitaire.Réponse dans les cellules T (BanskotaAH (2001) ,Mirzoeva OK (1996) , Woo KJ,(2005). L'inhibition de l'activation de NF-kB peut être la base moléculaire de ses propriétés anti-inflammatoires de la propolis.

III.7. 3. Les mecanismes de l'activité anti-oxidante

Divers composés de la propolis ont été décrits comme de puissants inhibiteurs du stress oxydatif. Il est bien connu que la composition de la propolis est variable ; cependant, l'un de ses principaux composants, l'ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE), bloque la production de ROS dans plusieurs systèmes (Hoşnuter M, 2004).De plus, dans les cellules endothéliales aortiques bovines, la propolis augmentait l'expression de lasynthase de l'oxyde nitrique « eNOS » et inhibait la NADPH oxydase (NOX) (Silva V et all 2011). La propolis turque a inhibé les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)à l'ADN dans les fibroblastes en culture (Aliyazicioglu Y et all 2011).

L'activité antioxydante des composants phénoliques de la propolis peut réduire les dommages à l'ADN induits par (H_2O_2) et peut être aussi liée à une activité chimiopréventive. La propolis rouge de Cuba a montré des effets protecteurs dans des modèles de lésions hépatiques induites par l'alcool, probablement en raison de ses propriétés antioxydantes (Remirez D et al 1997). La propolis a inhibé l'apoptose des macrophages via des effets sur le glutathion (GSH) et la voie des facteurs de nécrose tumorale / facteur nucléaire kappa B (TNF / NF-κB) (Claus R et al 2005, Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG 1994). De plus, la propolis brésilienne de *Baccharisdracunculifolia* a modulé les dommages à l'ADN induits par la 1,2-diméthlyhydrazine (DMH) dans les cellules du côlon (de Lima ROA et al 2005).

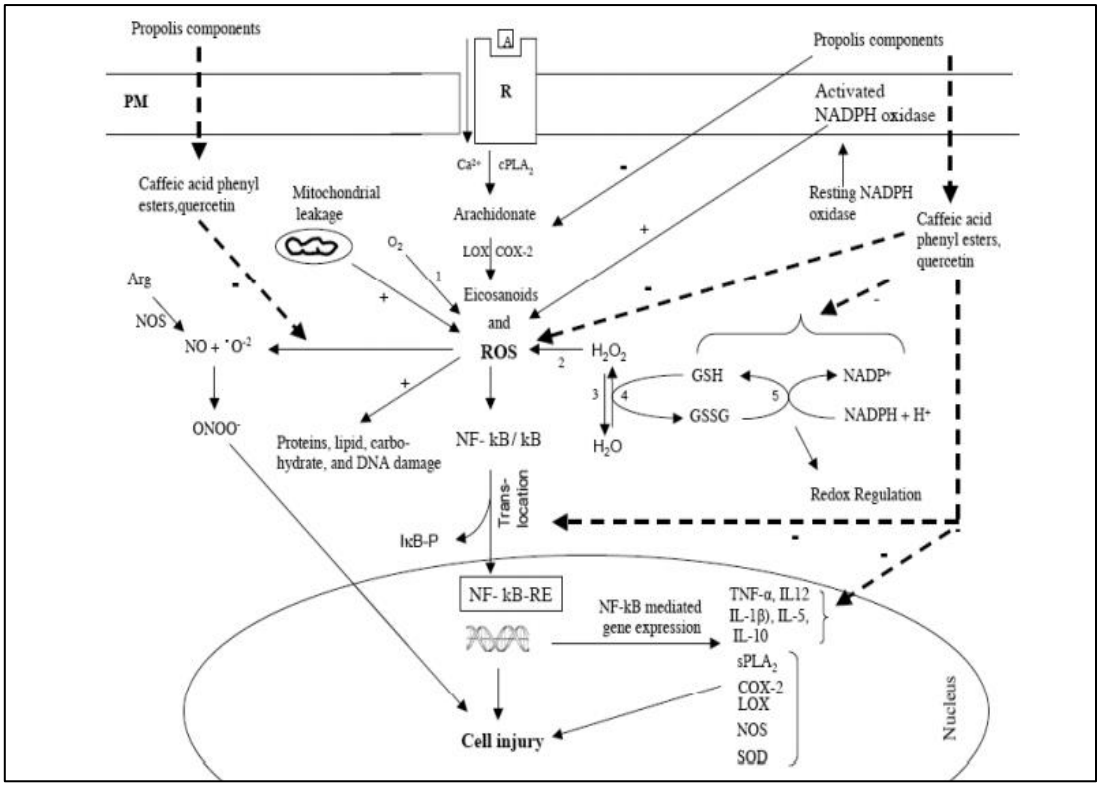


Figure 5: Voies de transduction du signal en réponse au stress oxydatif généré par les ROS et l'action des composants de la propolis

(Farooqui, T., & A. Farooqui, A 2010).

III.7.4. Les mécanismes de l'activité cardioprotectrice

La modulation des marqueurs des maladies cardiovasculaires par la propolis a été démontrée dans plusieurs études. Des tests in vitro et in vivo ont été développés pour élucider les mécanismes moléculaires sur la régulation du métabolisme du glucose et des lipoprotéines ;la modulation de l'expression des gènes ;la diminution de l'activité des récepteurs piégeurs, des cytokines inflammatoires et du stress oxydatif ;l'amélioration de la fonction endothéliale et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.Alors en tant que riche source de polyphénols, la propolis représente une stratégie alternative potentielle pour la prévention des troubles cardiovasculaires. (Julio Beltrame Daleprane et DulcinéiaSaesAbdalla 2013).

La propolis a également affecté positivement les niveaux de HDL et de LDL chez le rat. Le traitement des rats diabétiques avec de la propolis d'origine de peuplier a diminué les niveaux de cholestérol total, de cholestérol LDL, de cholestérol VLDL et de triglycérides, renforçant le cas selon lequel la propolis module le métabolisme

lipidique et peut être utile dans les syndromes causés par des anomalies lipidiques sanguines (Fuliang HU 2005).

La propolis verte brésilienne, rouge brésilienne et brune chilienne a réduit la zone de lésions athérosclérotiques lorsqu'elle était administrée de manière préventive. L'effet inhibiteur le plus fort a été observé pour la propolis rouge brésilienne, qui a également induit une régression des lésions athérosclérotiques(Daleprane JB et all 2012). Les polyphénols de la propolis ont inhibé la progression de l'athérosclérose chez les souris LDLr (-/-) en améliorant le profil lipidique et en régulant à la baisse les cytokines pro-inflammatoires, les chimiokines et les facteurs angiogéniques. La propolis a régulé à la baisse l'expression de l'ARNm de gènes clés impliqués dans le processus athérosclérotique, tels que MCP-1, INFg, IL6, CD36 et TGFβ (Daleprane JB et all 2012).

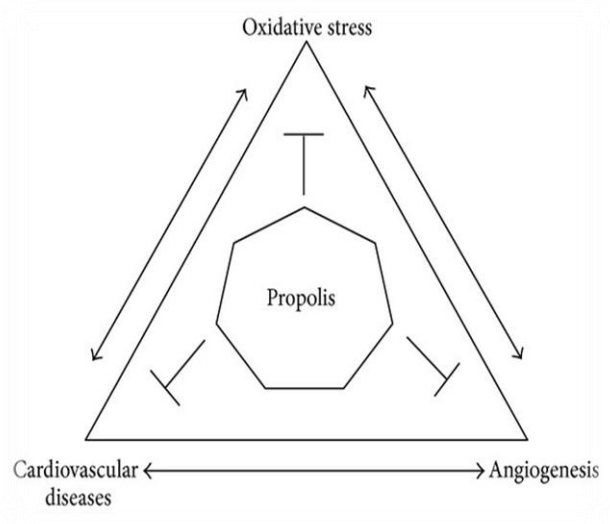


Figure 6: Représentation schématique de la relation entre le stress oxydatif, les maladies cardiovasculaires et l'angiogenèse, et les effets de la propolis sur ces systèmes intégrés.

La propolis influence de multiples voies de signalisation biochimique, y compris des mécanismes de protection réduisant les événements liés aux maladies inflammatoires chroniques. (Julio Beltrame Daleprane and DulcinéiaSaesAbdalla 2013).

III.7.5.Mécanismes de la supression de l’angiogenese

Il a été récemment signalé que la propolis supprime l'angiogenèse induite par les tumeurs par l'inhibition de la formation des nouveaux viseauxet l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales.(M.R. Ahn,et al.,2007).

L'angiogenèse est définie comme le processus dans lequel un réseau de nouveaux vaisseaux sanguins émerge de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse s'est avérée essentielle à la croissance tumorale et aux métastases, qui sont deux facteurs majeurs qui entravent le traitement du cancer (J. Folkman,1995). Différentes étapes de l'angiogenèse peuvent être affectées par la propolis et ses composants. (Julio Beltrame Daleprane and DulcinéiaSaesAbdalla 2013).

L'étude des effets de nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse a révélé que l'un des principaux mécanismes antiangiogéniques de ces médicaments est l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales (J. Folkman,2003). Les stimuliangiogéniques tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) sont connus pour activer la kinase 1/2 (ERK1 / 2) et Akt régulée par le signal extracellulaire, qui transduisent les signaux de survie dans les cellules endothéliales et empêchent simultanément l'apoptose en inactivant les protéines pro-apoptotiques (M. J. Cross,2003. Eguchi, A. 2007). D'autre part, les stimuli apoptotiques sont connus pour activer une cascade de caspases qui conduit finalement à la fragmentation oligonucléosomique de l'ADN et au clivage de protéines telles que la poly ADP-ribose polymérase (PARP) et la lamine A / C (G. M. Cohen,1997).

La propolis a un role de l'inactivation de ERK1 / 2.En utilisant la molécule U0126(type d’une arylsulfur a fonction isocyanure) , un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activation de ERK1 / 2, il a été montré que l'inactivation de ERK1 / 2 par U0126 était suffisante pour reproduire la plupart des changements inhibiteurs induits par l' extrait de la propolisaux niveaux morphologiques et moléculaires dans les cellules endotheliale de veine ombilicale humaine (HUVEC) tubulaires.(Kunimasa, K,2011).

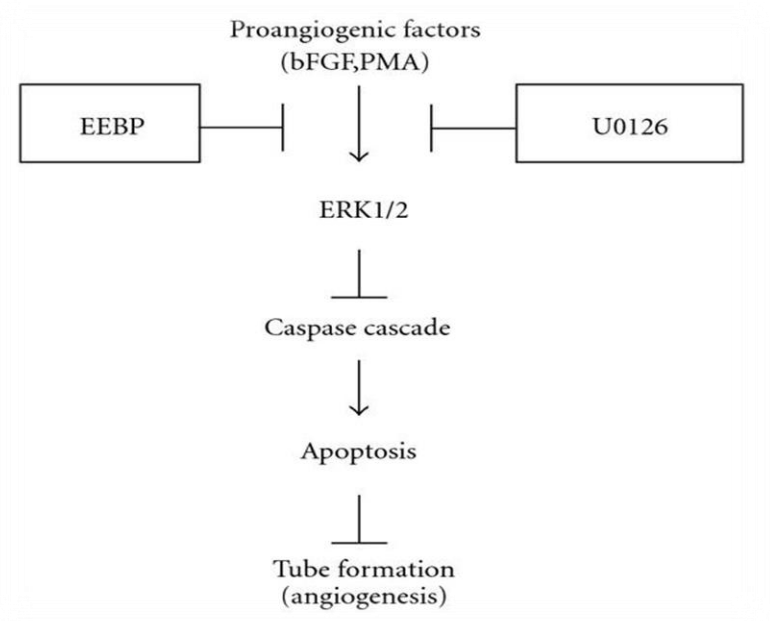


Figure 7:les mécanismes anti-angiogéniques proposés par EEBP(Kunimasa, K et al(2011).

Durant le processus de l'angiogenèse, des facteurs proangiogéniques tels que le bFGF et le MAP stimulent la signalisation ERK1 / 2, par la suite, le signal de survie inactive la voie des caspases, maintenant ainsi la survie cellulaire et facilitant l'angiogenèse. En revanche, l'EEBP inhibe l'activation de ERK1 / 2, activant ainsi la voie de la caspase et induisant l'apoptose, ce qui conduit par conséquent à la suppression de l'angiogenèse.(Kunimasa, K.2011).

L'EEBP avait très peu d'effet sur Akt, mais l'inactivation de l'ERK1 / 2 seule est suffisante pour prévenir l'angiogenèse et induire l'apoptose dans les cellules endothéliales.(Kunimasa, K2011).

La propolis rouge brésilienne diminue l'accumulation du facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie (HIF1α) dans des conditions hypoxiques, ce qui à son tour atténue l'expression du gène VEGF (Daleprane JB et all 2012).

Chapitre IV : l’usage de la propolis

La propolis possède des applications dans la thérapeutique et la medecine traditionnelle, l’etablissement des connaissances basées sur les essais experimentale a aidé à élargir son usage et meme à la production des formulations à base de la propolis.

IV.1.Les extraits de la propolis

Il existe plusieurs méthodes différentes pour extraire des composés actifs de la propolis, les solvants d'extraction habituellement utilisé sontl’eau, l’éthanolet ses mélanges hydroalcooliques, le méthanol est utilisé pour l’extraction des composées actifs de la propolis mais n’est pas destiné à la consommation directe,il y a aussi des fluides dispersifs pour former des microcapsules,

L’extraction par le dioxyde de carbone supercritique est une autre methode innovante d’extraction,certains flavonoïdes et dérivés d'acide cinnamique dans la propolis sont efficaces dans les tests anti-cancéreux et ce sont des composés hydrophobes ; Les extractions de dioxyde de carbone supercritique sont généralement bonnes pour purifier et fractionner ces composés hydrophobes à partir de matrices végétales.Les extraits par des fluides supercritiques possède de meilleurs effets biologiques que ceux obtenus par extractions par solvants organiques.

Autre etude a demontréque les extraits de propolis générés par les extractions CO_2 + éthanol à des pressions croissantes sont riche en composés efficaces. (Ying-Nong Lee et al.2006).

IV.2.Utilisation de la propolis en dermatologie

L'effet des préparations de propolis sur la cicatrisation des plaies et la régénération des tissus est reconnu depuis longtemps. Cet effet avec les propriétés antibiotiques et les effets astringents attribués à la propolis justifie son usage pour les plaies. Un certain nombre de rapports sur l'utilisation de la propolis dans le traitement de divers problèmes dermatologiques sont apparus ces dernières années. L'application

d'une solution alcoolique de propolis favoriserait le processus de régénération tissulaire,aussi il existe uneéfficacité du traitement à la propolis pour les brûlures au deuxième degré, la neurodermatite, les eczémas microbiens et autres problèmes dermatologiques. (Ghisalberti, 1979).

Partie expérimentale

II.1. Matériel et Méthodes

II.1. Objectif de l'étude

L'objectif principale de notre travail est d'étudier l'effet antibactérien de la propolis algerienne contre des bacteries pathogènes chez l'homme à travers la determination des concentrations minimales inhibitrices de la croissance bacterienne des extraits de propolis.

Et comme un objectif secondaire, une etude quantitative de la teneur en polyphénols dans les extraits de propolis a été faite.

II.2.Lieu et la période de l'étude

La partie expérimentale a été réalisée à deux endroits :

- Au laboratoire de Microbiologie de l'Hopital Youcef Ben Khedda a Berrouaghia - wilaya de Médéa.
- Au laboratoire de la faculté de Science à l'université Yahia Fares – Médéa.

Et ceci dans la periode entre aout et septembre 2020.

II.3. Le plan experimentale

Le plan experimentale se divise en 4 parties :

1- Préparation et identification des souches bacteriennes :

Les souches ont été repiqué dans des milieux de culture selectives et puis elles ont subi un ensemble de test de confirmation des caracteristiques microscopiques et biochimiques.

2- Essais de detection de l'activité

Lancement d'une etude d'antibiogramme limitée par la methode des puits et la methode des disques de diffusion, ou des prelevementdes extraits non dilués sont testés sur les memes boites petries en meme temps.

3- Essais antibiogramme

Dans cette étape l'étude antibiogramme est élargie, des dilutions de chaque extrait sont testé sur des boites petries séparés pour determiner la CMI ensuite.

4- Quantification des extraits et Dosage des polyphénols.

Dans cette étape la quantification des extraits à été faite sur les extraits par mesure de quantité des matieres extraites seche dans les extraits, et puis un dosage de la teneur en polyphénol totaux a été fait ar la méthode de FolinCiocalteux.

II.4. Préparation des échantillons de propolis

II.4.a. La matière première

Pour réaliser le travail, trois échantillons de propolis brutes ont été ramenés de 3 zones geographiquesdifferentes de l'Algerie(Biskra, el Bayedh et Bejaia) récolté entre 2019 et 2020, en addition d'une poudre de propolis commerciale (de Ain safra).La propolis est récoltée par raclage des cadres mellifères des ruches.

II.4.b. Préparation des extraits éthanoliques des propolis(EEP)

La propolis de chaque échatilliona été coupée en petits morceaux et puis une quantité en moyenne de 20 grammes de la propolis brute de chacuna été macérée dans 100ml d'éthanol80% sous agitation pendant 24 h à froid a une tampérateur ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique.

L'extrait éthanolique résultant sont filtrés sur papier filtreWhatman n°1, ensuite, les extraits résultants sont conservés à 4 °C dans le réfrigérateur et à l'abri de la lumière dans des jarres en verre bien fermés pour éviter toute évaporation jusqu'à leur utilisation.

- ✓ **Mode operatoire de l'extraction**

- Préparer d'abord l'alcool par pesée de 80 grammes d'alcool pure et compléter le poidsà 100 grammes par l'eau distillée.
- Mesurer à partir de cet alcool 100 ml

- Couper la propolis en petits morceaux par un couteau propre et sec.
- Peser 20 grammes de propolis sur une cuvette.
- Mettre les morceaux dans le récipient d'extraction en verre (erlenmeyer)
- Ajoutez les 100 ml de l'alcool 80% (p/p)
- Mettre l'aimant
- Mettre sous agitation pendant 24 h.
- Laissez le mélange à décanter pour 1 h
- Procéder à une filtration par papier filtre a l'aide d'un entonnoir.

Les papiers filtres et les résidus dans les recipients ont été récupérés pour évaluer la solubilité de la propolis en pesant ses résidus et ce qui a resté sur les papiers filtres après dessication.



Figure 8:Propolis en petite morceaux.



Figure 9: Agitation de propolis 24h a froid.



Figure 10: Filtration de l'extrait.

II.5.La stérilisation

II.5.a. La méthode dela chaleur humide

La stérilisation à la chaleur humide est faite dans un autoclave mais à cause des contraintes de travail, certaines étapes de sterilisation ont été réalisé à l'aide d'un autocuiseur large, l'autocuiseur nous permet de ramener la vapeur chaude et la pression nécessairepour la sterilisation des milieux de culture les tubes àessaie etles disques préparés pour notre extrait et tous ce qui est en verre.



Figure 11:sterilisation a la chaleur humide

.

II.5.b. La stérilisation par l'eau bouillante

Pour les bouchons et les embouts de micropipette ont été mets dans l'eau bouillante pour 5 minutes (ne pas dépasser les 5 pour le risque de déformation de la résine) et les récupérer à l'aide d'une pince métalliquestérile et les garder dans un recipientsterile.

II.6.Préparationdes milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont :

- ✓ Milieu Chapman.
- ✓ Milieu Hektoen.
- ✓ Milieu Mueller Hinton .
- ✓ Milieu TSI.
- ✓ Milieu BCP.

Les milieux ont été preparés a l'aide d'un système chauffant muni d'un agitateur magnétique ensuite ils sont sterilisés par chaleur humide et puis coulés sur les boites petri(25 ml pour chaque boite) devant un bec Bunsen.

Pour les boites pétries ont été esessuyées d'abord par l'alcool 70 % en utilisant la gaze) et puis laissées à dessécherjuste avant l'usage.

Le milieu TSI a été coulé en pente dans des tubes d'essai a 15 ml.

II.7.Préparation des souches

L'évaluation de l'effet antibactérien de la propolis ont été testécontre deux groupes de bactéries :

- Bactéries à Gram négatif :*Escherichia coli,Pseudomonas aeruginosa.*
- Bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus.*

Les souches ont été fournies par le laboratoire centrale unité de microbiologie de Centre Hospitalo Universitaire Frantz Fanon à Blida.Les souches sont des souches de contrôle (ATCC).

II.7.1. Conservation des souches

A partir des souches pures, on a fait des repiquages sur des boites petri a gélose solide et incubation 24h à 37°C. ensuite conservés dans le réfrigérateur à 7±1°C. Les repiquages sont réalisés tous les 3 jours.

II.7.2. Culture sélective

La culture sélective est faitepar un repiquage sur Hektoen pour E.coli et le *Pseudomonas aeruginosa*, et sur un milieu Chapman pour le *Staphylococcus aureus* à une température de 37°C pendant 24h.

II.8. Etude des souches bacteriennes

L'identification consiste àevaluerquelques caractères importants de nos souchesbacteriennes par un examen microscopique (coloration de Gram, Gram au KOH, coloration des capsules) ou bien macroscopique (aspect des colonies dans ls milieux Hektoenet milieux BCP, milieux TSI).ou bien les caracteresbiochimques (test

catalas, test de coagulase, le metabolisme sur les mileux d'identification TSI, citrate de simmons).

II.8.1.Etude microscopique

a- Coloration de gram

Coloration de Grame permet de savoir certain caracteristique de la bacterie alors :

- Bacteries gram positive en violé.
- Bacteriegrame négative en rose.
- Morphologie : bacille, cocci….
- Mode de regroupment.

✓ Technique

Avant la colorationil faut preparer un frottis (bacterialsmear) en prélevant 2 à 3 colonies de bactérie et les étaler sur la lame par une goutte d'eau physiologique,laisser-les sécher et puis fixer les bactéries par passage de la lame sur bec bunsen pourquelques secondes.

- La coloration au violet de gentiane (Crystal violet) 1 min.
- Rincer à l'eau destillée
- Mordançages par iodure (solution de lugol 1%) 1 min.
- Décoloration par l'alcool 10 s.
- Rincer par l'eaudestillée.
- Contre coloration par la fuchsine basique 1 min.
- Laver la lame par l'eau destillée.
- Dessèchement de la lame.
- Observation microscopique a l'objectif 100 en ajoutant l'huile d'imerssion.

b- Coloration de la capsule

La coloration des capsules est plus delicate que les autres types de procédures de coloration différentielle car les matériaux capsulaires sont solubles dans l'eau et peuvent être délogés et éliminés avec un lavage vigoureux. Les frottis ne doivent pas être chauffés car le rétrécissement cellulaire résultant peut créer une zone claire autour de l'organisme qui est un artefact qui peut être confondu avec la capsule.

✓ **Principe**

Coloration primaire par le violet de gentiane (1% aqueux) est faite sur un frottis non fixé à la chaleur. À ce stade, la cellule et le matériau capsulaire prendront lacouleur sombre.

Etape de décoloration par le sulfate de cuivre (20%), parce que la capsule est non ionique, contrairement à la cellule bactérienne, la tache primaire adhère à la capsule mais ne s'y lie pas. Dans la méthode de coloration des capsules, le sulfate de cuivre est utilisé comme agent décolorant. Le sulfate de cuivre lave la tache primaire violette du matériau capsulaire sans enlever la tache liée à la paroi cellulaire. Dans le même temps, la capsule décolorée adsorbe le sulfate de cuivre et la capsule apparaîtra en halo sur un fond bleu contrairement à la couleur violet foncé de la cellule, en cas d'absence des capsules, les halos ne sont pas remarquables.

✓ **Technique**

- Préparez de minces frottis de culture bactérienne sur une lame de microscope.
- Laisser le frottis sécher à l'air uniquement.Ne pas fixer à la chaleur car cela entraînerait un rétrécissement ou une destruction de la capsule.
- Appliquer 1% deviolet de gentiane et laisser reposer sur la lame pendant 2 minutes.
- Laver doucement le violet de gentiane avec 20% de sulfate de cuivre. Attention : ne lavez pas le sulfate de cuivre et la tache directement dans l'évier.
- Éponger la lame avec du papier absorbant.
- Observez avec la lentille à immersion d'huile.

II.8.2. Etude biochimique

a- Test de Milieu Triple Suger Iron (TSI)

Le milieu TSI va servir aussi à révéler certaines caractéristiquespour les bactéries gram négatif, alors les tubes ont été praparés de façon inclinée pour former une pente. On procède à former une suspension riche de bactéries à partir de plusieurs

colonies isolées dans une culture de milieu sélective dans 5 ml de sérum salin jusqu'àce que le milieu devienttrouble. Ensuitel'ensemencement est fait par piqure centrale et puis striation de surface.

Après, une incubation à 37C° pendant 18 heures a 24 heures

- Le virage du culot au jaune traduit la fermentation du glucose et la production des especes acide.
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz.
- Le virage de la pente au jaune traduit l'utilisation du lactose ou le saccharose ou les deux à la fois.
- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfuré(H_2S).

b- Mannitol Mobilité

Le milieu Mannitol mobilité se présente sous forme de gélosemolle contenant du mannitol, du rouge de phénol et des nitrates à 1 g/1000.La présence de nitrate de potassium dans le milieu inhibe les enzymes responsables de dégagement gazeux.

✓ Technique

- Ensemencerles bacteries dans un bouillon Nutritif, et l'incubation se fait à 37°c pendant 24h et cela pour que les bactéries produisent les flagelles nécessaires à son déplacement
- Ensemencer par piqûre centrale unique, cequi permet d'apprécier en plus de l'utilisation du mannitol, la mobilité du germe.

✓ Lecture

- Si le milieu prend une coloration jaune : la bactérie est mannitol +.
- Si lemilieu reste rouge : la bactérie est mannitol -.
- Si les colonies sont trouvé entour de la piquer la bacterie est immobile.
- Si les colonies sont trouvées dans toute la gélose la bacterie est mobile.

c- Citrate de simmons

La gélose de Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) permet la recherche de la capacité des bacteriesà fermenter le citrate de sodium.Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraîne alors une

acidification qui provoque une coloration bleue du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH).

- ✓ Technique
  - Preparer le mileu dans des tubes inclinés.
  - Par pipette pasteur prelver des colonies bien isolée.
  - Encemencé la pente du milieu par des streies.
  - Ne pas fermer le rube a fond.
  - Incubation 24h a 37°c.

d- Gélose Hektoen

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants et inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.

Ce milieu permet de détecter simultanément l'utilisation du lactose, du saccharose et de la salicine. Cette utilisation se traduit par une acidification et donc un virage du bleu de bromothymol au jaune.

- ✓ **Lecture**
  - Colonies jaunes ou orangés : acidification du milieu par fermentation d'au moins un des glucides présents dans le milieu.
  - Colonies vertes ou bleues : pas d'acidification du milieu, aucun des glucides n'est utilisé : (lactose –),(saccharose –) et (salicine -).
  - Colonies à centre noir : formation de sulfure d'hydrogène (H_2S +).
  - Colonies sans centre noir : pas de formation de sulfure d'hydrogène (H_2S -).

e- Gélose pourpre de bromocrésol (BCP)

La gélose BCP (BromoCrésol Pourpre) contient le lactose et lebromocrésol pourpre et permet de connaitre le caractère lactose des bactéries.

Le milieu vire au jaune s'il y a acidification du milieu par fermentation du lactose (lactose +) au cas contraire le milieu reste violet (lactose –).

f- Gélose chapman

La gélose Chapman est un milieu d'isolement sélectif utilisé pour la recherche des *Staphylococcus*.La présence de mannitol et de rouge de phénol permet de connaitre le caractère mannitol des bactéries.

- Le milieu devient jaune en cas d'acidification du milieu par fermentation du mannitol (mannitol +).
- Sille milieu reste rouge alors il n'yapas d'acidification (mannitol –).

g- Test KOH

C'est un test alternatif au gram qui a pour bute de distinguer entre les bactéries gram+ et bactéries Gram-. Le KOH cause la lyse et la destruction de mince couche de peptidoglycane des bactéries gram- et a cause de pH élevé de KOH, les composants cellulaire et l'ADN dans le lysat deviennent épais et gluant et le mélange devient d'aspect visqueux montrant la formation d'un filament lorsque on élever l'oese d'1-2 cm, par contre dans le cas des bactéries Gram+ la couche de peptidoglycane épaisse prévenir sa lyse par le KOH ce qui fait l'absence de changement au niveau de sa composition et donc l'absence de filament.

✓ **Technique**

- On mélange sur une propre lame une goutte de réactif KOH 3% et des colonies de l'espèce a tester.

h- Test catalase

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne lesbactéries à Gram +.La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

H_2O_2	→	½ O_2 + H_2O
Produit toxique pour les bactéries		formation des bulles

✓ **Technique**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

✓ **Lecture**

- Bulles d'oxygène :La bactérie possède la catalase, elle est dite : Catalase+
- Pas de bulle : La bactérie ne possède pas la catalase, elleest dite : Catalase–

II.9. Le test d'activité antibiotique (Antibiogramme)

L'antibiogramme designele test dedétermination de la sensibilité d'une bactérie aux antibiotiques, ou un inoculum bacterien est mis en présence d'un produit d'activité antibiotique potentielle dans un milieu de culture approprié (liquide ou solide) et puis une observation de la culture après incubation revèle si le produit a pu inhiber la croissance des bacteries.

Le test est utilisable pour la detection de l'activité et aussi il est adaptable pour sa quatification. Dans notre cas c'est l'extrait de la propolis l'EEP est le produit testé pour son activité antibiotique.

Le test est utilisépour de déterminerla concentration minimale d'inhibition (CMI) de la croissance bactérienne.

L'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches de références estréalisée par deux types de techniques différentes et complémentaires :

- Les techniques de diffusion sur gélose (méthode de puits et méthode de disque)
- Les techniques de contacte directe ou le produit est incorporé dans tous le milieu de culture (milieu slide ou liquide – bouillon-).

Les méthodes utilisées dans ce travail sont les methodes de diffusion par puit et par disque.

II.9.1. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum est faite à partir des cultures jeunes18h prélvée de milieu hektoen pour E. coli et la Pseudomonas et de milieu chapman pour staphylococusauseus.

La méthode consiste alors à prélever par pipette pasteurs stérile 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5ml d'eau physiologique (sérum salin) dans un tube stérile ensuit agiter énergétiquement la solution jusqu'à obtention d'une suspension homogène. La concentration de l'inoculum est reglé contre un standard 0.5 McFarland.

Selon ce standard Mac Farland, on admet qu'une densité optique -DO-à 620nm de l'inoculum comprise entre 0,08 et 0,1 et lue contre un blanc d'eau physiologique (la

même que celui de la préparation de l'inoculum)correspondà une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml.

Dans notre situation et en absence de spectroscope on a fait une comparaison visuelle de la turbidité par rapport à une suspension de sulfate de baryum préparée par réaction de chlorure de baryum et de l'acide sulfurique.

II.9.2. La technique de diffusion sur gélose par puit

La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic (2002) et Berghe et Vlietinck (1991).

Protocole

- Préparer le milieu Muler Hinton
- Préparer l'inoculum bacterien
- Préparer un papier de repérageensuit repérer 5 puits loin de 2.5 cm l'un de l'autre en mettant les boites de gélose sur le papier de repérage
- A laide d'une pipette pasteur sterile couper des rondelles de la gélose à l'aide de côté large (puits de diametre de 6mm.)
- Tremper bien l'écouvillon dans la suspension de l'inoculum et serrer le sur la paroi de tube qui contient l'inoculum pour l'égoutter et puis passer l'écouvillon sur tous la surface de la gélose par des stries bien serrées
- Éliminer les rondelles coupées par une pipette stérile
- à la fin, les puit sont remplit par les différentes EPP ou leur dilution (dans le test de CMI) a laide d'une micropipette.
- Un puit dans chaque poite est reservé pour un temoin négatif (solvant).
- Les boites de pétri sont ensuite laissées sur paillasse pendant 30 mn et puis mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

L'action inhibitrice s'exprime par la formation d'une zone claire autour des puitsoù les bactéries n'ont pas pu se développer.La lecture du résultat est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibitionen millimètre(Mayachicw et al.,2008)à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle.

Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à celui d'un temoin.

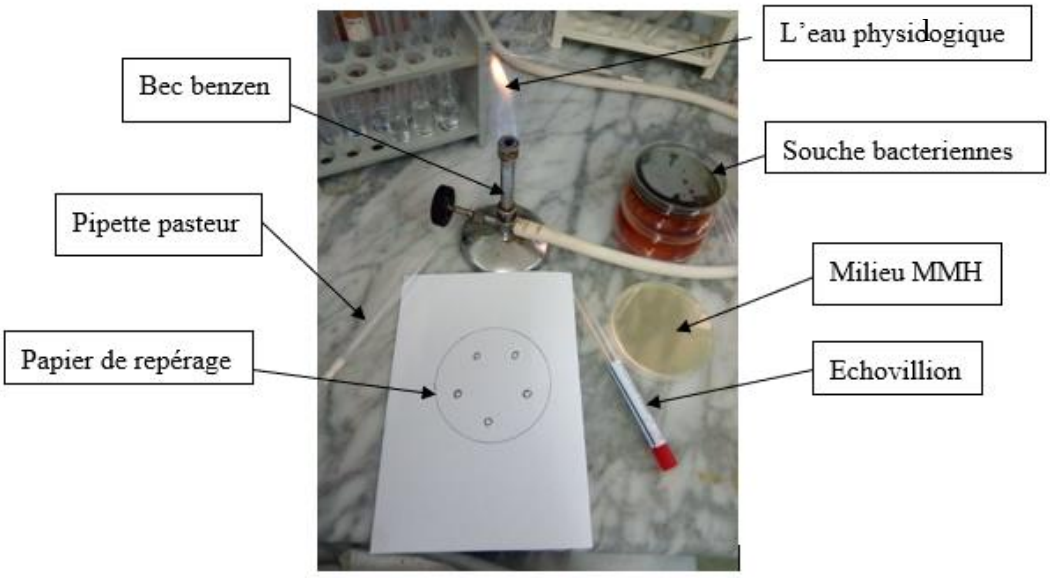


Figure 12:Materiel necessaire pour la méthode de diffusion par puits

II.9.3. La méthode de diffusion par disque

Les disques ont été preparésà partir d'un papier waltmanN° 3 de diametre 6mm etsterilisé.les disque sont remplits par 30µl (pour des extraits et pour les dillution afin de detreminé CMI).Le depot des disques se fait a l'aidd'une pincesterile sur la surface de gélose Mueller Hinton (MMH) ensemencéedéjà par l'inoculum par échovillonage.

Les boites de pétri sont ensuite laissées sur paillasse pendant 30 min et puis mises àl'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Lecture

L'action inhibitrice s'exprime par la formation d'une zone claire autour despuits où les bactéries n'ont pas pu se développer. La lecture du résultat est faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Mayachicw et al.,2008)à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle.

II.9.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) (méthode de dillution)

Pour quantifier l'activité des extraitsle test d'antibiogramme par les deux techniques suscitées est fait avec une serie de macrodilution.

a- Préparation des dilutions

Nous avons utilisé la méthode de macro dilution alors on dilue l'extrait dans le même solvant qui est l'alcool 80% par moitié, nous avons préparé 4 dilutions.

Alors dans une série de tubes à essais stériles on prélève1 ml de l'extrait à l'aide d'une micropipette dans le premier tube et puis on le mélange avec 1 ml de solvant et à partir de ce mélange on prelève 1 ml dans le prochain tube et on dilue par 1 ml et on refait la memeprocedure jusqu'au dernier tube.

Une fois que les dilutionssont déjà preparée, on procede avec les memes protocoles des deux techniques, les puits seront remplis chacun par une dilution etdes disques sont préparé pour chaque dilution, chaque serie de dilution d'un extrait est testés dans une boite de petrie à part contre un témoin négatif.

Après une incubation de 24h à 37°c,on fait la lecture des zones d'inhibition pour chaque bacterieet chaque dilution. Lesresultatssont rapportés dans des tableux.

NB : Les tests sont fait 3 fois (trireplicats) pour chaque essais (chaque bactérie) pour assurer la rentabilité des résultats.

II.10. Détermination de la concentration des dilutions

On a procédé à la récupération de résidu dissous dans l'extrait par rotavapeur, le résidu secd'un volume précis de chaque extrait sera pesé ensuite pour le calcul des concentrations des extraits et des dilutions

- ✓ **Protocole**
  - Peser le balon de rotavapeur vide propre et sec
  - Mesurer le volume de l'extrait à mettre.
  - Mettre l'extrat dans lerotavapeur.
  - Peser la quantité séchée.

II.11. Le dosage de la tenur en polyphénol

La teneur en polyphénols totaux de chaque extrait a été évalué par la métodeFolinCiocalteux, les polyphénols réagissent avec un complexe acide d'isophosphote de Molybdate et de tungstate dit le réactif de FolinCiocalteux(dilué au 1/10) dans un milieu alcalinisé par une solution de Carbonate de sodium 7.5%.

La réaction d'oxydoreduction provoque un virage de réactif de jaune au bleu. La densité optique de la coloration est évaluée par spectrophotométrie a une longeur d'onde 730 nm. L'evaluation de la concentration des polyphénols se fait ensuite contre une courbe d'étalonage par l'acide gallique et cette teneur est exprimé en equivalent d'acide gallique.

Protocole :

- Préparer une dilution de chaque extrait au 1/10
- Centrifuger
- Prelever 2 ml de chaque extrait dans des tubes à essais
- Ajouter 10 ml de reactif de folin dilué au 1/10
- Ajouter ensuite 8 ml de solution de carbonate de sodium 7.5%
- Incuber dans un bain mari a 40°c pour 5 minutes
- S'il y a formation de précipit centrifuger
- Le surnagent sera ensuite passé dans un spectrophotometre
- Préparer un blanc par les memes étapes en remplaçant les 2 ml de l'éxtrait par le solvant.
- Préparer une gamme d'étalonnage à parit d'une solution de l'acide gallique de 500 mg/l et lui faire subir les memes étapes de réaction en remplaçant les 2 ml de l'extrait par ceux des étalons

La limite de linéarité de la gamme est de 300 mg/l.

II.2. Résultats et Analyse

1.Identification microscopique des souches

A.Coloration de gram

a- Escherichia coli

Aprés la coloration de gram nous observons des bacilles en rose a gram négatif

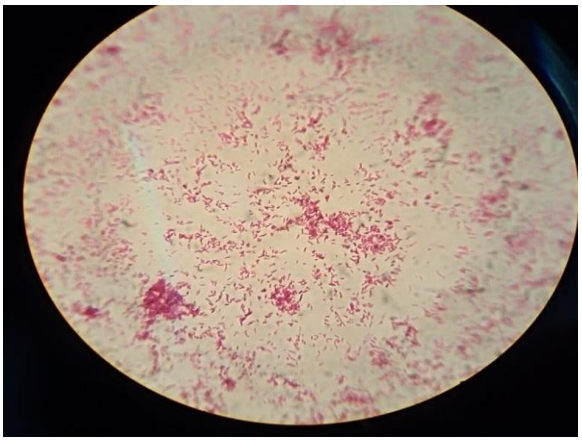


Figure 13:Observation microscopique d'Escherichia coliaprés une coloration de gram (grossissement x100)

L'observation microscopique à grossissement 100 de la bactérie après la coloration de Gram montre une morphologie bacillaire. Les bacilles ont un aspect tinctorial,une couleur rose c.à.d. qu'ils appartiennent au groupe Gram-.

b- Pseudomonas aeruginosa

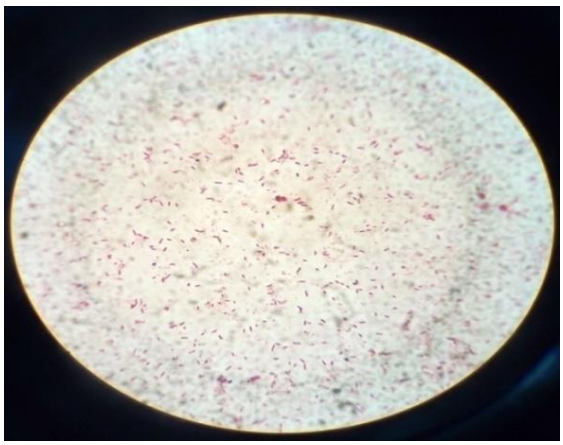


Figure 14:Observation microscopique dePseudomonas aeruginosaaprés une coloration de gram (grossissement x100)

L'observation microscopique à grossissement 100 de la bactérie après la coloration de Gram montre une morphologie bacillaireet une couleur rose c.à.d. qu'ils appartiennent au groupe Gram-.

c- Staphylococcus aureus

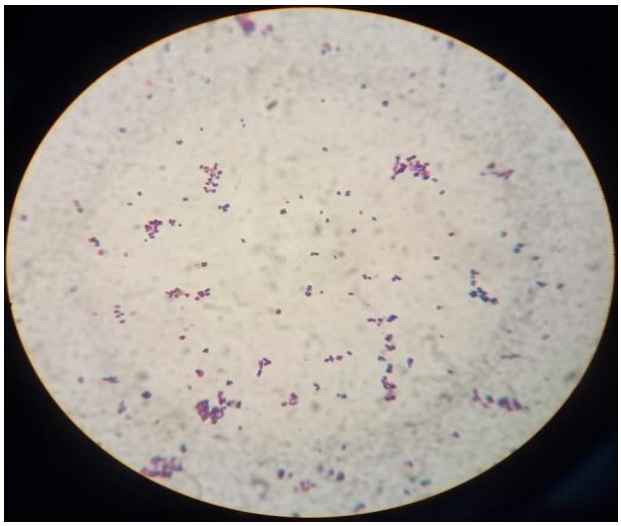


Figure 15:Observation microscopique d'une Staphylococcus aureus apres une coloration de Gram (grossissement x100).

L'observation microscopique à grossissement 100 de la bactérie après la coloration de Gram montre une morphologie des cocciune couleur violé c.à.d. qu'ils appartiennent au groupe Gram + .

B.Coloration de la capsule

a- Escherichia coli

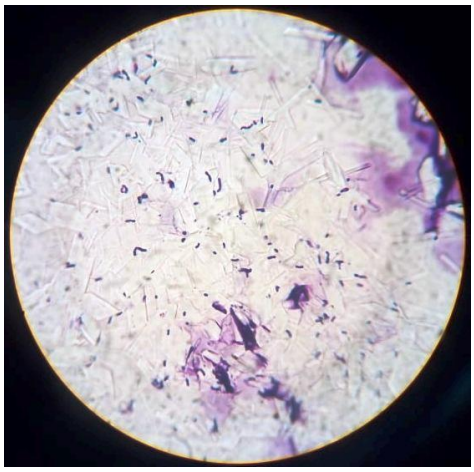


Figure 16:Observation microscopique d'une Escherichia coliapres une coloration de capsule

Nous n'observons aucune zone de halos clairautours de la bacteriec.a.d la bacterie n'est pas capsulé.*Escherichia coli*non capsulé

b- Pseudomonas aeruginosa

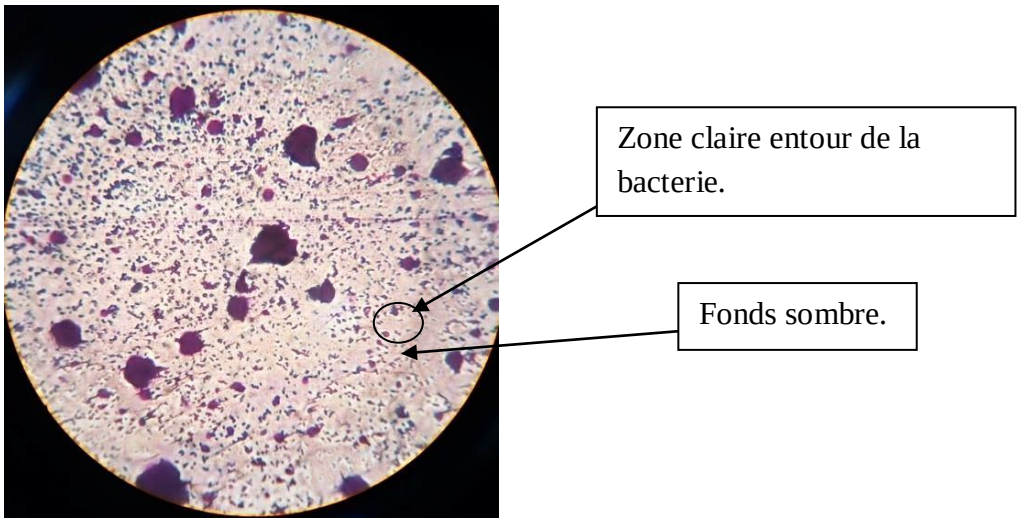


Figure 17:Observation microscopique dePseudomonas aeruginosaaprés une coloration de capsule.

Nous observons des halos clairs sur un fond sombrec.a.d la bacterie est capsulée.

c- Staphylococcusaureus

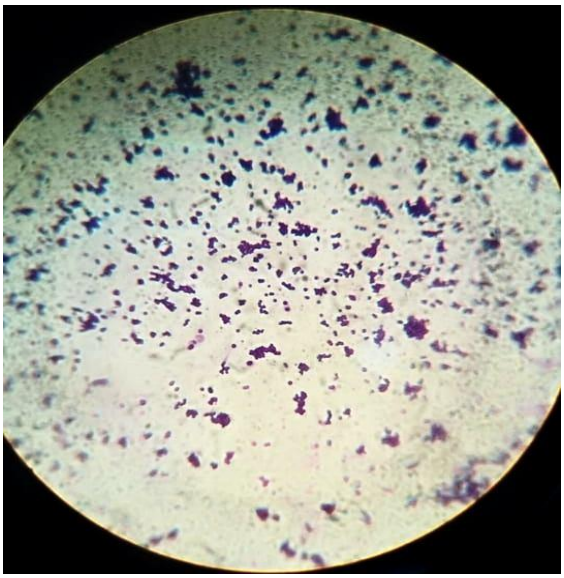


Figure 18:Observation microscopique deStaphylococcusaureusaprés une coloration de capsule.

Nous n'observons aucune zone de halos clair entoure de la bacteriec.a.d la bacterie n'est pas capsulée.

2.Etude Biochimique des souches

2.1. Le milieu TSI

a- Escherichia coli



Figure 19:Resultat de TSI pour Escherichia coli

Après une incubation de 24h nous avons observé que le milieu TSI à l'origine de couleur rouge, a viré au jaune à cause de l'acidification du milieu en fermentant les deux sucres par la bactérie (le glucose et le lactose). La bactérie n'a pas produit l'H2S (elle est H_2S négative) et le soulèvement de la gélose TSI indique que la bactérie est gazogène c.a.d elle produit du gaz.

b- *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 20:Resultat de TSI pour Pseudomonas aeruginosa.

Après une incubation de 24h nous avons observé que le milieu TSI à l'origine de couleur rouge, a resté rouge alors les deux sucres n'ont pas été utilisé par la bactérie. La bacteriene produit pas l'H_2S et la gélose TSI ne soulève pas ce qui indique que la bactérie n'est pas gazogène. *Pseudomonas aeruginosa.* (lactose - , glucose -, gaz- , H2S-).

c- *Staphylococcusaureus*



Figure 21:Resultat de TSI pour Staphylococcusaureus.

Après une incubation de 24h nous avons observé le milieu TSI à l'origine de couleur rouge qui a viré au jaune à cause de l'acidification du milieu en fermentant les deux sucres par la bactérie (le glucose et le lactose).Cet aspect révèle également que la bactérie ne produit pas l'H_2S et la bactérie n'est pas gazogène. *Staphylococcus aureus* (lactose + , glucose +, gaz - , H2S-).

2.2. Mannitol Mobilité

a- Escherchia coli



Figure 22 :Resultat test de mannitol mobilité pour Escherechia coli

Nous avons observé aprés une incubation de 24h a 37°c un virage de couleur du milieu manitol mobilité de rouge vers le jaune cela indique la fermentation du mannitol.L'aspectde la gelose indique aussi que la bacterie est mobile**.**

b- ***Pseudomonas aeruginosa***



Figure 23: Resultat test de mannitol mobilité pour *Pseudomonas aeruginosa*

Nous avons observé sur cette image apres une incubation de 24h a 37°c l'absencede virage de couleur du milieu manitol mobilité cela indique l'absence de fermentation du mannitol et que la bacterieest de manitol- avec des colonies selment entour de la piqure cela indique aussi que la bacterie est immobile**.**

c- ***Staphylococcusaureus***



Figure 24: Resultat test de mannitol mobilité pour *Staphylococcusaureus*

Nous avons observéaprés une incubation de 24h a 37°c un virage de couleur du milieu manitol mobilité de rouge vers le jaune seulement dans la partie haute du milieu cela indique la dégradation du mannitol par métabolisme aérobie, sans fermentation,*Staphylococcus aureus*est de manitol + avec des colonies seulment entour de la piqure cela indique aussi que la bacterie est immobile**.**

2.3. Citrate de Simmons

a- Escherchia coli



Figure 25: Resultat de test citrate de simmons pour *Eschericha Coli.*

Nous avons observé après une incubation de 24h a 37°C que le milieu de citrat de simmons est resté vert cela indique que l'Escherichia Coli est de citrate -

b- ***Pseudomonas aeruginosa***



Figure 26 :Resultat de test citrate de simmons pour *Pseudomonas aeruginosa.*

Nous avons observé aprés une incubation de 24h a 37°Cun virage de couleur vers le bleu du milieu cela indique que la pseudomonas aeruginosa est de citrate +.

c- S.aureus



Figure 27: Resultat de test citrat de simons pour*Staphylococcus aureus*

.

Nous avons observé après une incubation de 24h a 37°C que le milieu de citrat de simmons est resté vert cela indique que la bacterie est de citrate –.

2.4.Gélose Hektoen

a- Escherchia coli



Figure 28: Resultat d'un ensemensementd'*Echerichia coli* sur milieu hektoen

Apres une incubation de 24h nous avons observé que le milieu de culutre Hektoen à l'origine de couleur vert, il a viré au somon avec des colonies saumons de la

bacteriece qui est dua une acidification du milieu par fermentation d'au moins un des glucides présents dans le milieu.

b- *Pseudomonas aeruginosa*

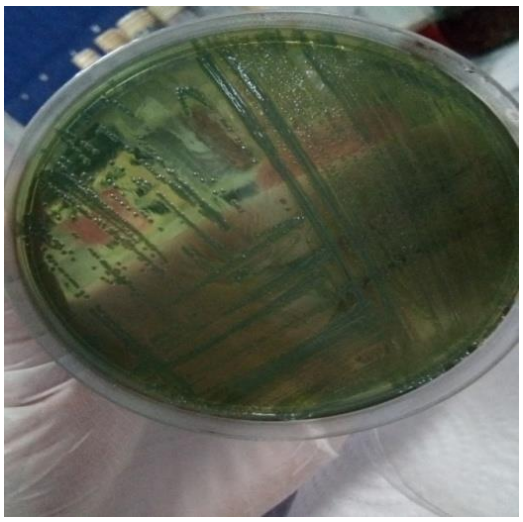


Figure 29 : Resultat d'un ensemensement de *Pseudomonas aeruginosasur* milieu Hektoen

Apres une incubation de 24h nous avons observé sur le milieu de culutre Hektoen à l'origine de couleur vert des colonies vertes cela indique qu'il n'y a pas d'acidification du milieu et aucun des glucides n'est utilisé c.a.d. (lactose -, saccharose - , salicine -).

c- *Staphylococcusaureus*

La croissance de staphylococcus est inhibée dans le milieuHektoen parceque le milieu hektoen est specifique pour l'isolment des enterobacterieset pour les bacterie bacille Gram negatif.

2.5.Gélose BCP

a- Escherchia coli

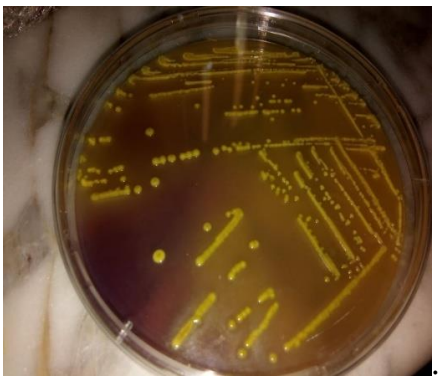


Figure 30: Resultat d'un ensemensementd'*Echerichia coli* sur milieu BCP.

Apres une incubation de 24h nous avons observé sur cette image dans le milieu de culutre BCP.Le milieu vire au jaune indiquant une acidification du milieu par fermentation du lactose, la bactérie est lactose +.

b- *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 31: Resultat d'un ensemensement *d'Echerichia coli* sur milieu BCP.

Apres une incubation de 24h nous avons observé sur cette image le milieu de culutre BCP est resté violet cela indique l'absence d'acidification du milieu (lactose –).

2.6.Gélose Chapman

a- Staphylococcusaureus

Après un ensemensement sur gélose Chapman et une incubation de 24h a 37°c nous avons observé un virage de couleur de milieu du rouge vers le jaune avec des colonie

jaunes. Cela indique l'acidification du milieu par fermentation de manitol ce qui confirme les carecterestique de *Staphylococcus aureus*.



Figure 32: Photo des colonies *de Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman.

2.7.Test de Gram au KOH

a- Escherchia coli

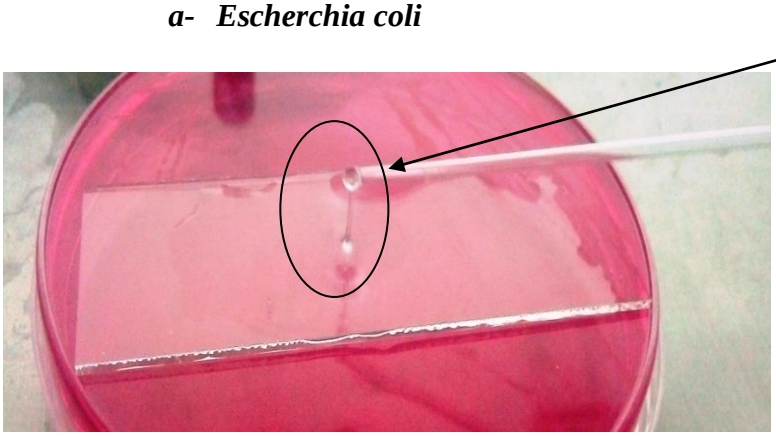


Figure 33: Résutat de test KOH *sur Escherchia coli*.

Nous avons observé surresultat de test KOH la formation d'un filament lorsque on élève lapipette pasteur d'1-2 cm cela indique que la becterie est de Gram –.

b- *Pseudomonas aeruginosa*

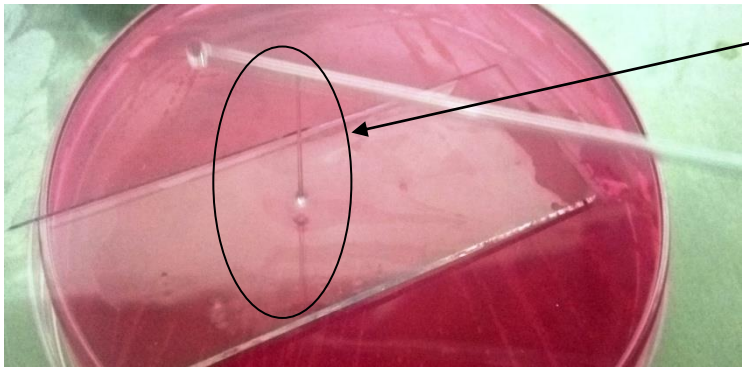


Figure 34: Resultat de test KOH sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons observé sur cette image resultat de test KOH la formation d'un filament lorsque on élève la pipette pasteur de 1 ou 2 cm cela indique que la becterie est de Gram négatif.

c- *Staphylococcusaureus*

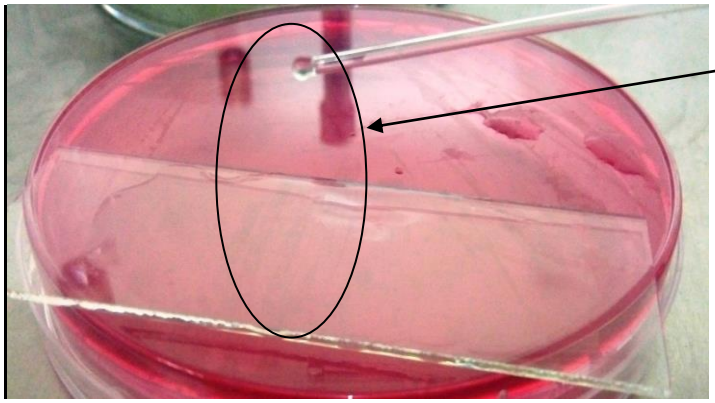


Figure 35 : Resultat de test KOH sur *Staphylococcusaureus*

Nous avons observé sur cette image resultat de test KOH l'absence d'un filament lorsque on élève pipette pasteur d'1-2 cm cela indique que la becterie est de Gram +.

2.8.Test de catalase



Figure 36 : Photo represete un catalase+ goutte de l'eau oxygené avec l'eau de javel.

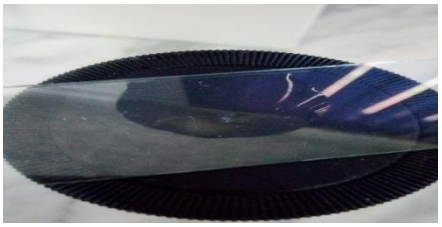


Figure 37: photo représente un catalase - une goutte de l'eau distillée avec une bacterie catalase -

a- Escherchia coli



Figure 38:Resultat de test catalase pour *l'Escherchia coli*

Nous observons après un mélage de goutte de H_2O_2 et une colonie de la bacterie, la formation des bulles d'oxygène, cela indique quel*'Escherchia coli*est de catalase +.

b- *Pseudomonas aeruginosa*

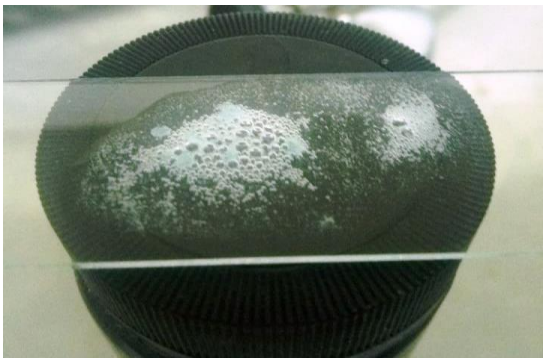


Figure 39: Resultat de test catalase pour la Pseudomonas aeruginosa

Nous observons après un mélage de goutte de H_2O_2 et une colonie de la bacterie, la formation des bulles d'oxygène cela indique que la *Pseudomonas aeruginosa* est de catalase + .

c- Staphylococcus aureus

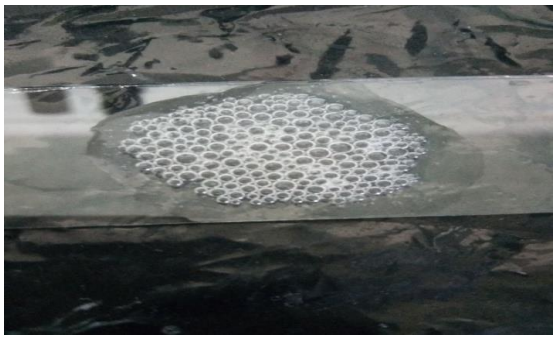


Figure 40: Resultat de test catalase pour la *Staphylococcus aureus*

Nous observons après un mélagede goutte de l'eau oxegéné et une colonie de la bacterie formation des bulles d'oxygéne cela indique que la *Staphylococcus aureus*est de catalase +.

3. RESULTATS DE TEST DE DETECTION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE



Figure 41:Résultats de lactivité des extraits sur *Staphylococcus aureus* par methode des puits et des disques

Tableau 4 :les mesures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-visle *Staphylococcus aureus*..

Méthodes / L'extrait	Puits	Disques
Bejaia (v)	Incalculable	13 mm
Biskra (b)	Incalculable	19.5 mm
El-bayed	Incalculable	22 mm

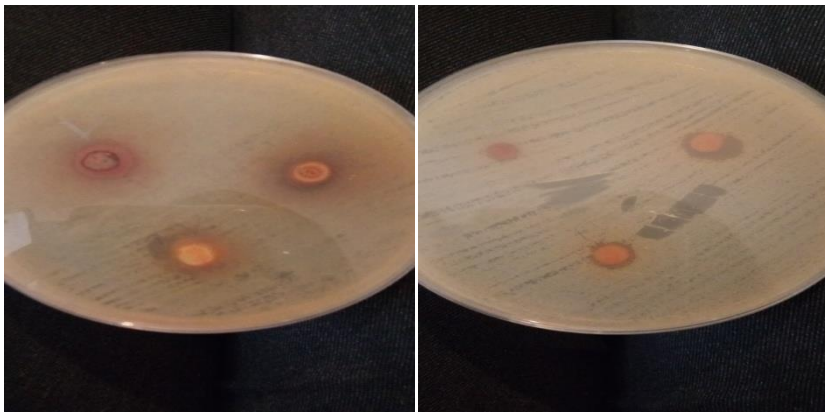


Figure 42: Résultats de lactivité des extraitssur *Escherichia coli* par méthode des puits et des disques

(v pour Bejaia , B pour Biskra , BY pour El-Bayed).

Tableau 5:les mesures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-vis*Escherichia coli*

Méthodes / L'extrait	Puits	Disques
Bejaia (v)	08 mm	0 mm
Biskra (b)	16mm	10 mm
El-bayed	08 mm	08 mm

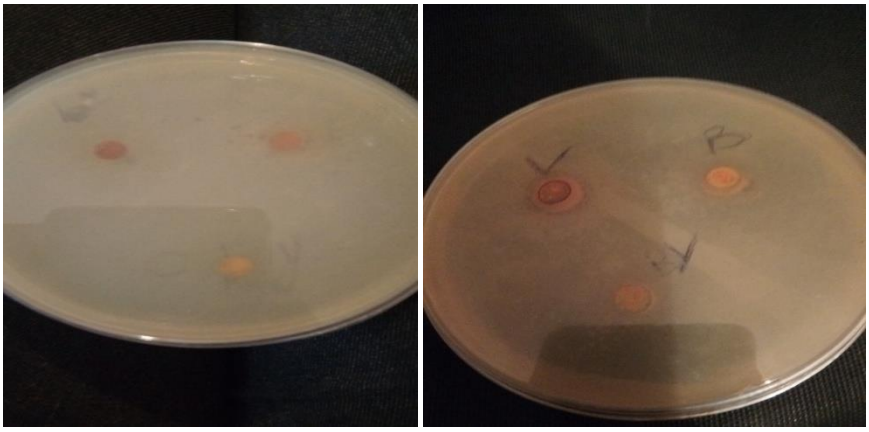


Figure 43: Résultats de lactivité des extraits sur*Pseudomonasaeruginosa*parméthode des puits et des disque

(V pour Bejaia , B pour Biskra , BY pour El-Bayed).

Tableau 6:les mésures des zones d'inhibition par les deux méthodes des puits et des disques vis-à-vis pseudomonaseaeruginosa

Méthodes / L'extrait	Puits	Disques
Bejaia (v)	9 mm	0 mm
Biskra (b)	13mm	0 mm
El-bayed	11mm	0 mm

On a terminé la determination de CMI avec la methodedes puits pour les bacteriesE.coli et Pseudomonas et par les 2 méthodes pour *Staphylococcus aureus*

4. Résultats de test de CMI

a- Staphylococcus aureus

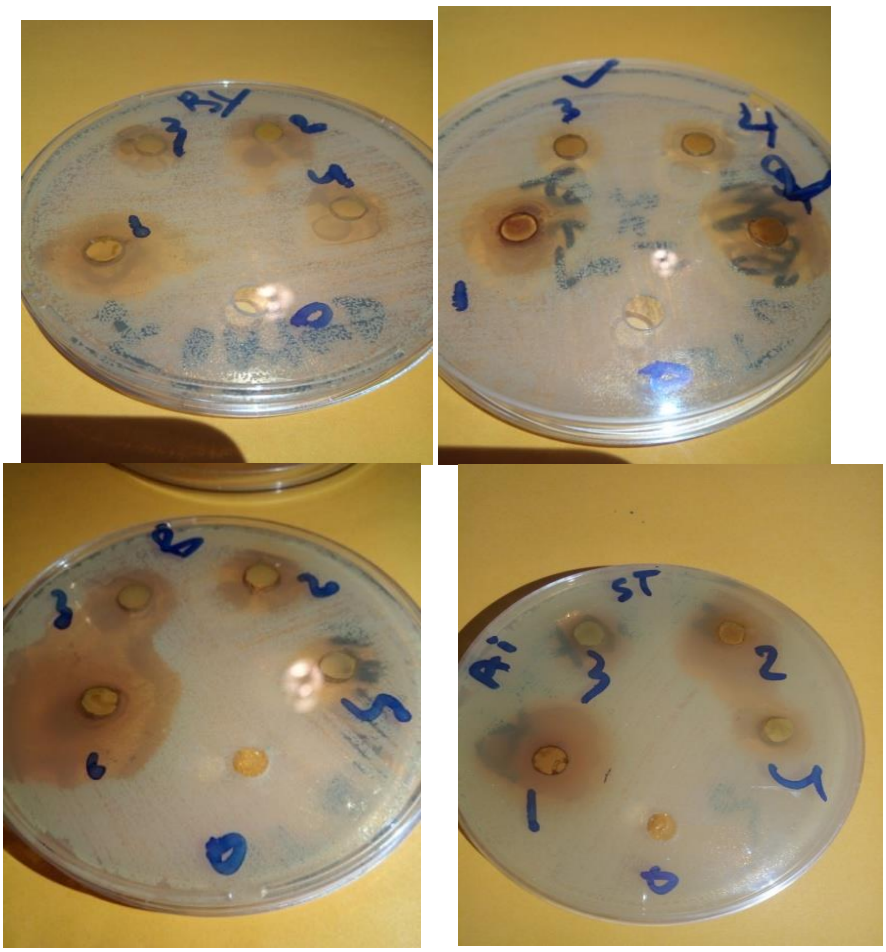


Figure 44 : Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis *S. aureus*

b- P. aeruginosa



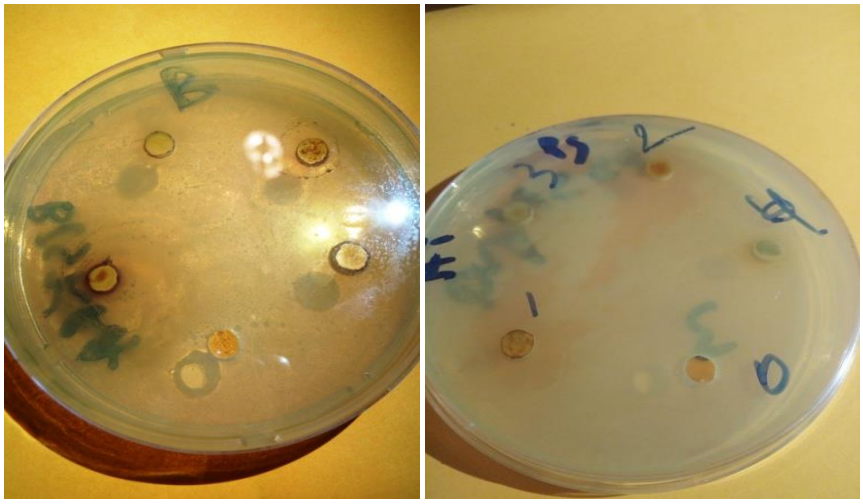


Figure 45:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis *P. aeruginosa*

c- E .coli

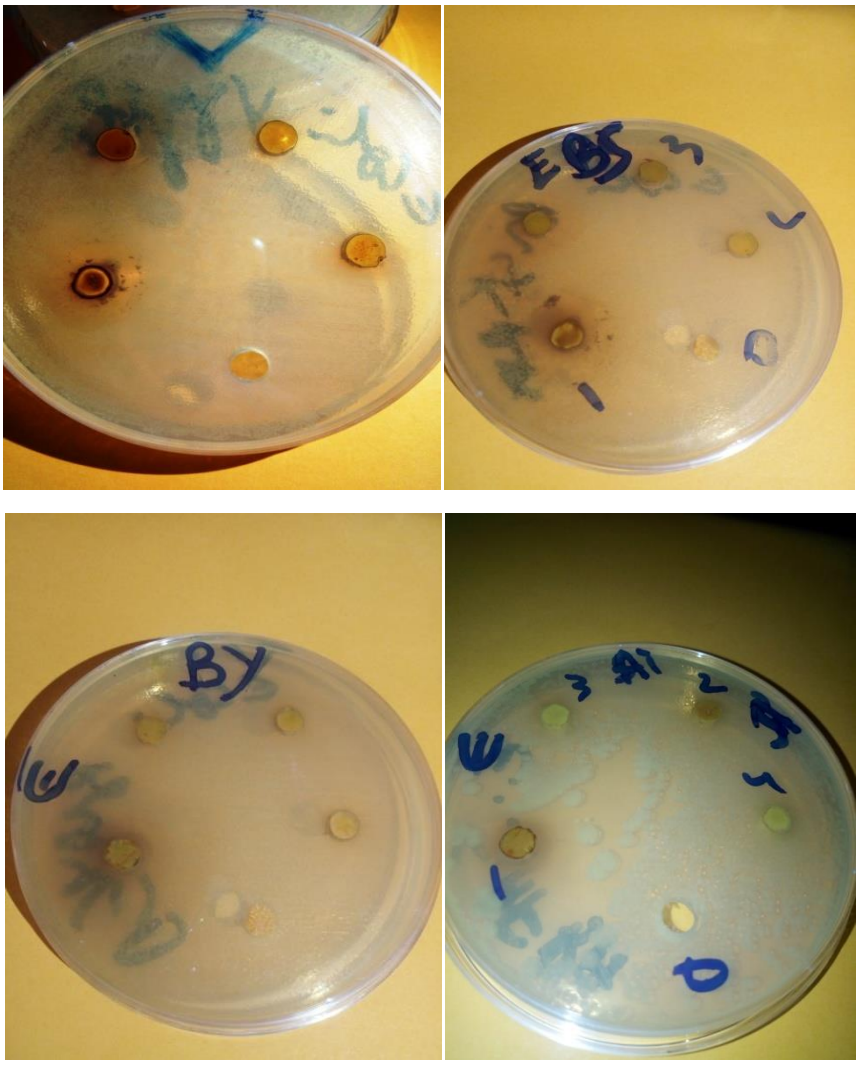


Figure 46:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis *E. coli*

Les graphes de l'évaluation des CMI par la méthode des puits

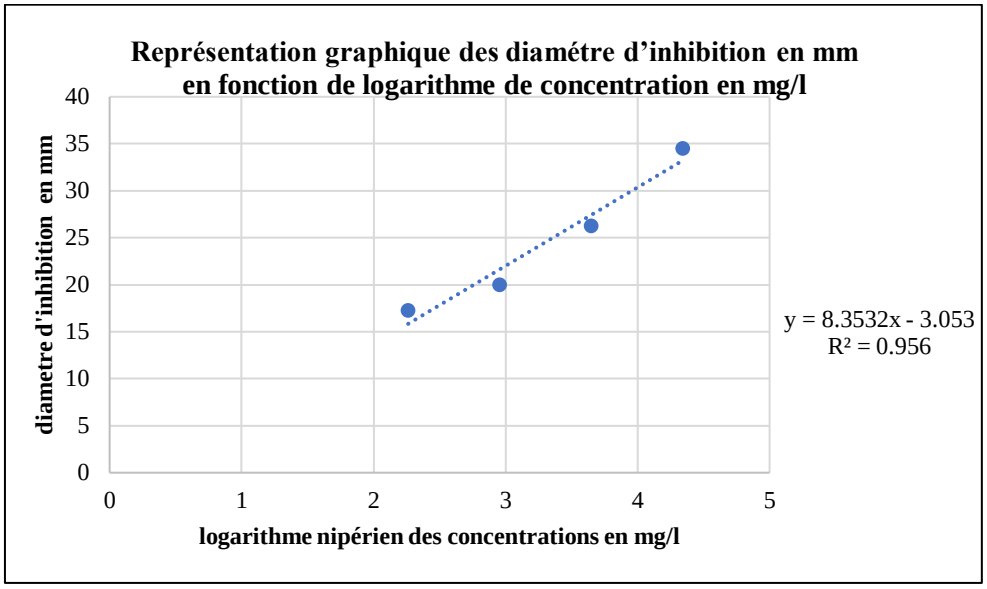


Figure 47:Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Biskra

La CMI calculée pour*Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Biskra est de 2.95 mg/l.

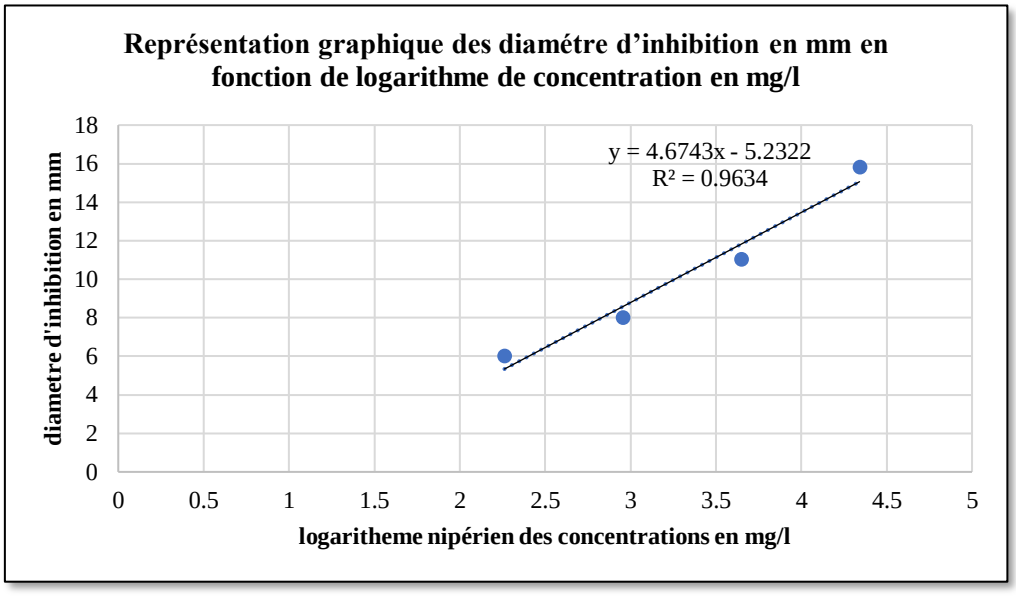


Figure 48: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie*Escherichia coli* pour l'extrait deBiskra.

La CMI calculée pour *E. coli* pour l'extrait de Biskra est de 11.05 mg/l.

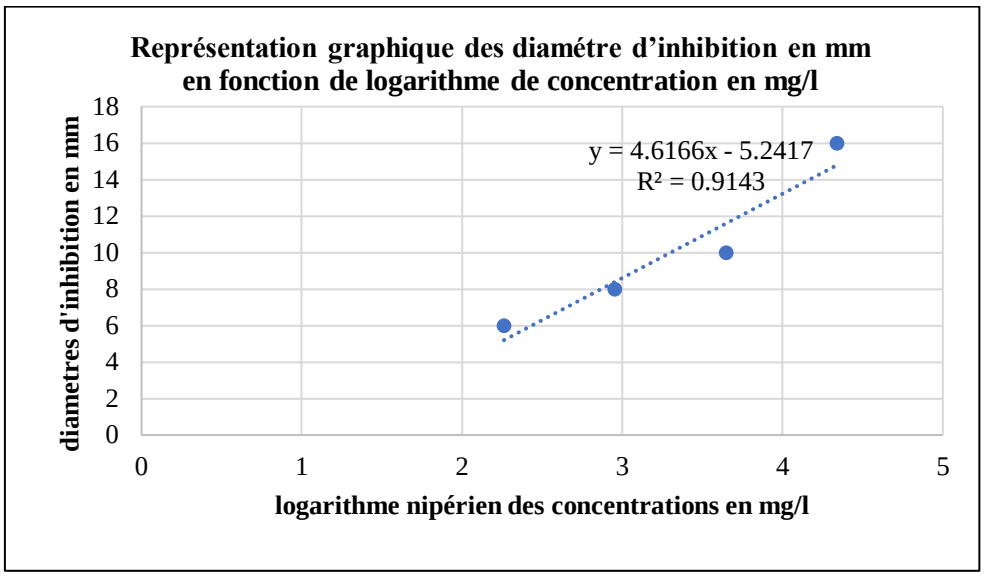


Figure 49:Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bacterie*Pseudomonas aeruginosa* pour l'extrait de Biskra

La CMI calculée pour*Pseudomonas aeruginosa* pour l'extrait de Biskra est de 11.41 mg/l.

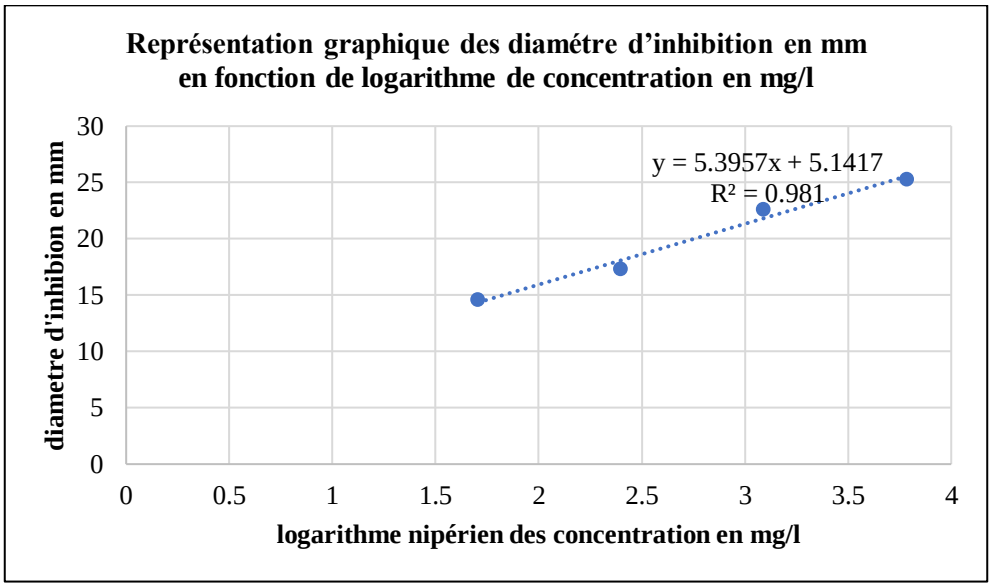


Figure 50: Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de EL-Bayed

La CMI calculée pour*Staphylococcus aureus* pour l'extrait de El-Bayed est de 1.17mg/l.

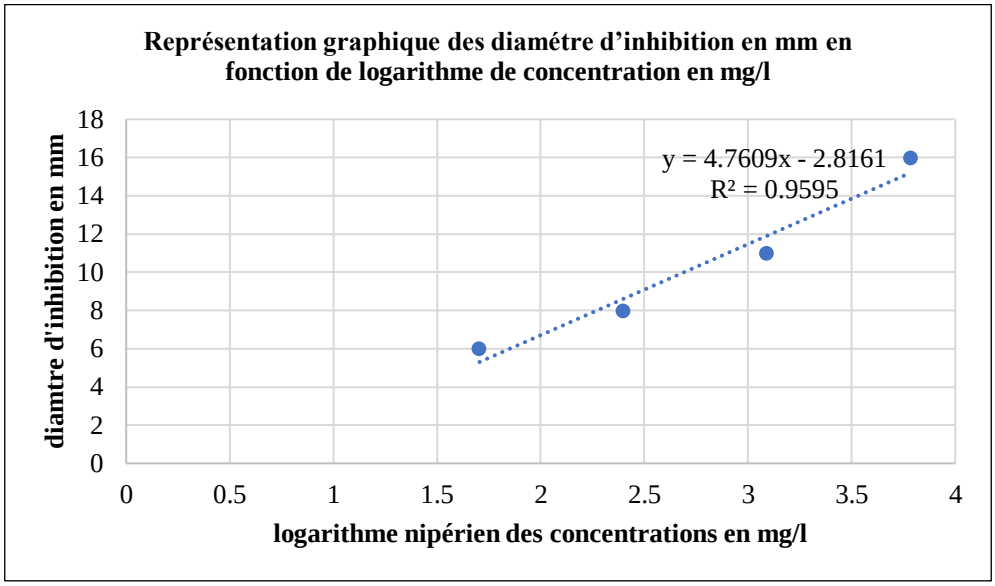


Figure 51: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie *E.coli* pour l'extrait de EL-Bayed

La CMI calculée pour *E.coli* pour l'extrait de El Bayedest de 6.37 mg/l.

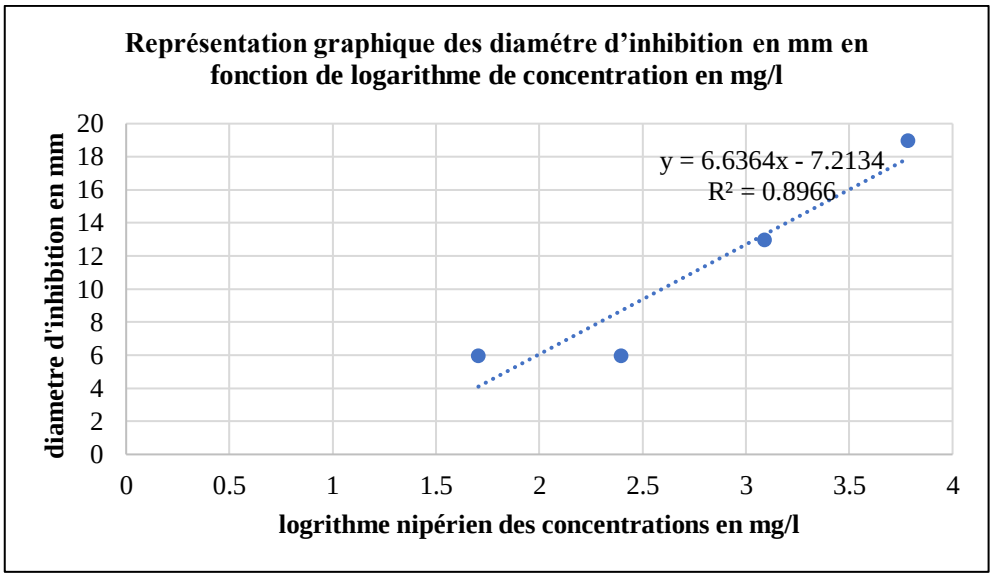


Figure 52 : Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie *P.aeruginosa* pour l'extrait de El-Bayed.

La CMI calculée pour *Pseudomonas* pour l'extrait de El Bayed est de 7.32mg/l.

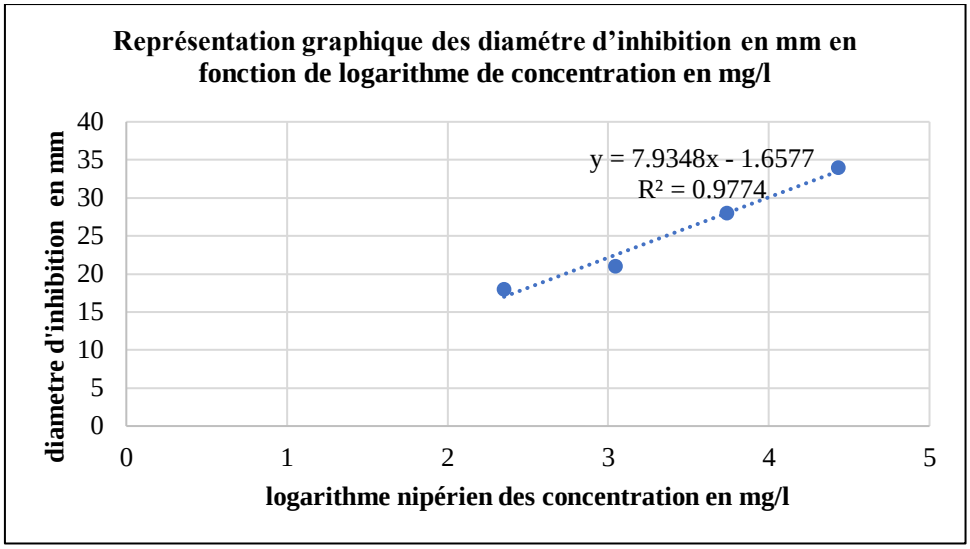


Figure 53: Représentationgraphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Bejaia

La CMI calculée pour *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Bejaia est de 2.62 mg/l.

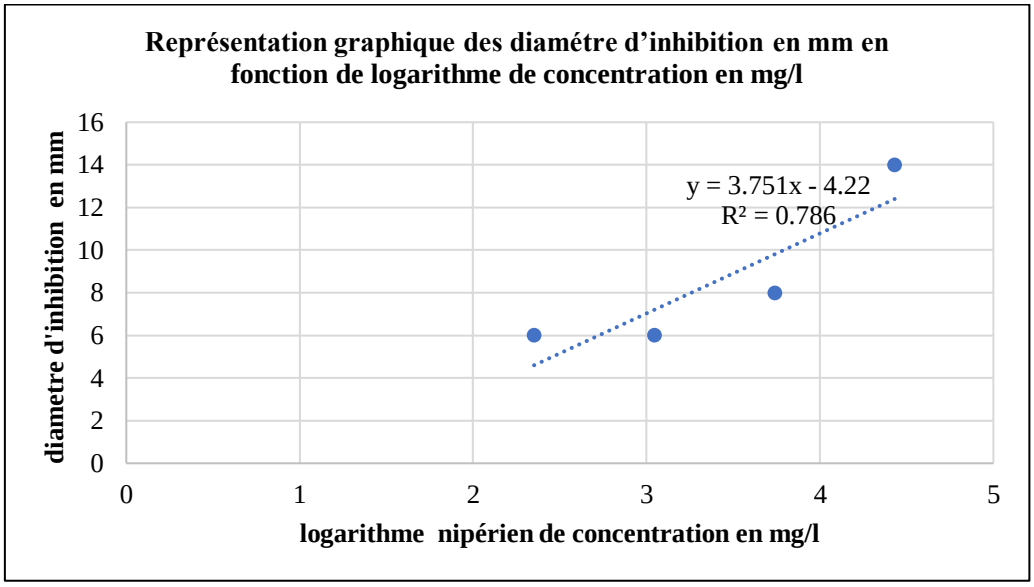


Figure 54: Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie *E.coli* pour l'extrait de Bejaia

La CMI calculée pour*Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Bejaia est de 15.25 mg/l.

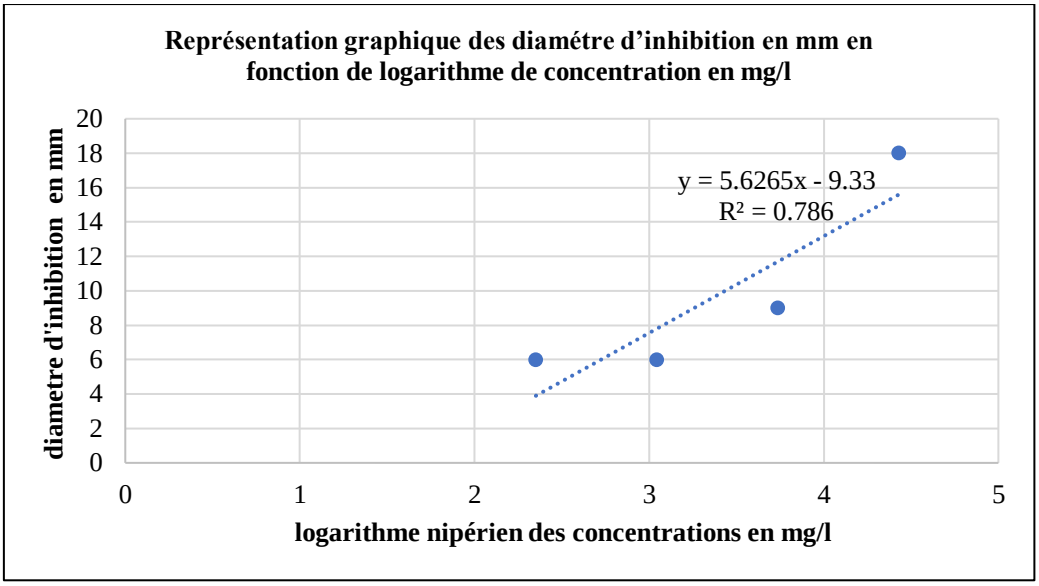


Figure 55:Représentationgraphique des diamétre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pourle calcul de la CMI de la bactérie *P.aeruginosa* pour l'extrait de Bejaia.

La CMI calculée pour*Pseudomonas* pour l'extrait de Bejaia est de 15.25 mg/l.

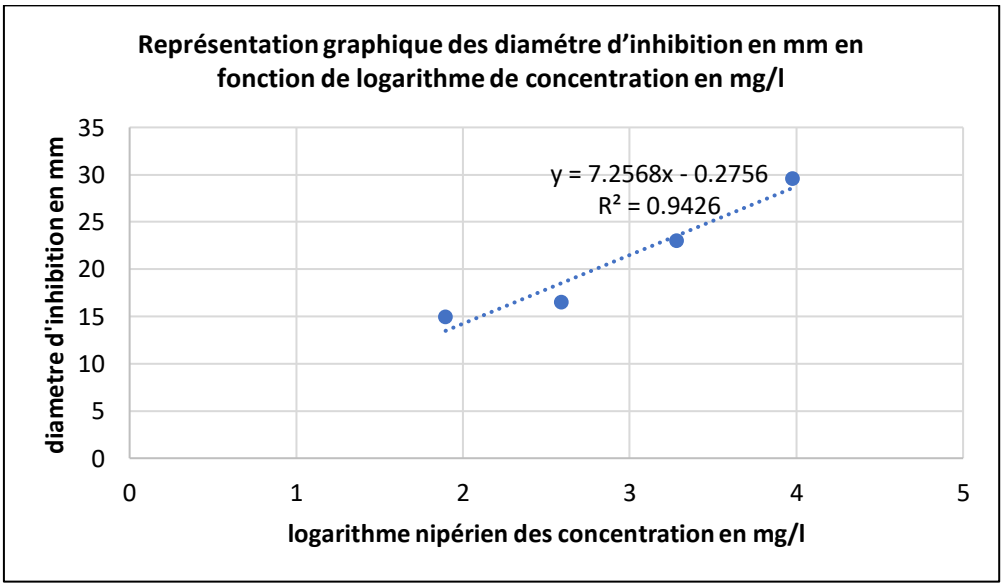


Figure 56:Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie Staphylococcus aureus pour l'extrait de Ain Safra.

La CMI calculée pour *Staphylococcus aureus* pour l'extrait de Ain Safra est de 2.37 mg/l.

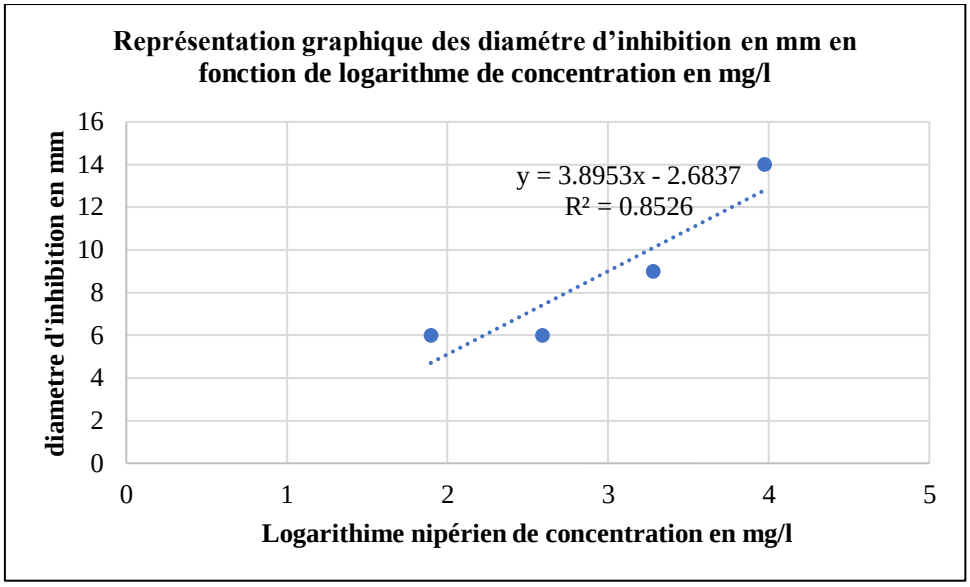


Figure 57:Représentationgraphique des diametre d'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérieE.coli pour l'extrait de Ain Safra

La CMI calculée pour *E.coli* pour l'extrait de Ain Safra est de 9.29 mg/l.

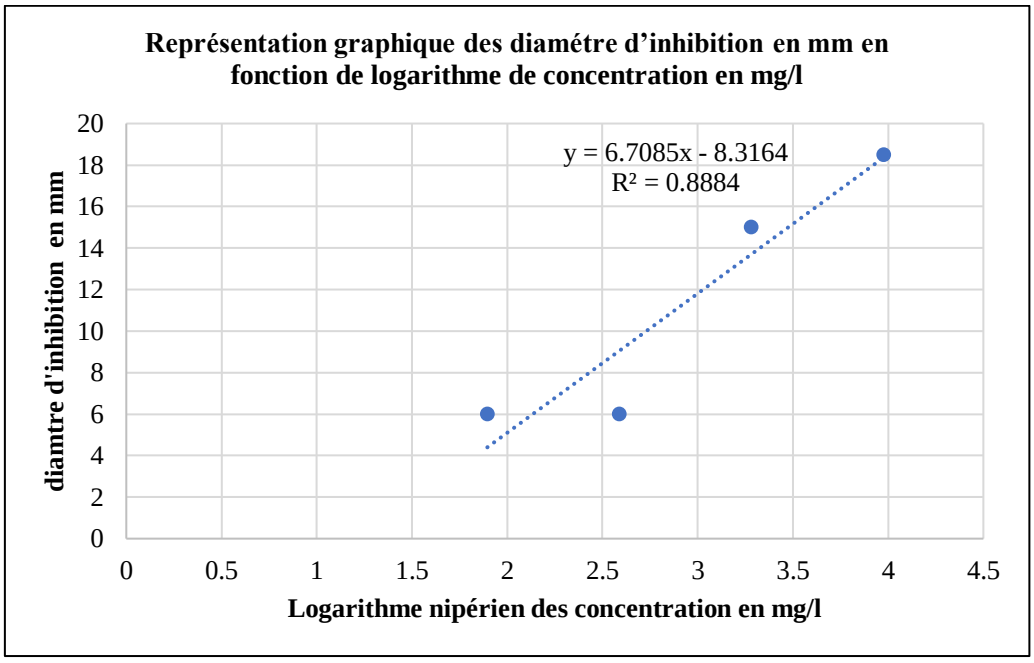


Figure 58:Représentationgraphique des diametresd'inhibition en mm en fonction de logarithme de concentration en mg/l pour le calcul de la CMI de la bactérie *P.aeruginosa* pour l'extrait de Ain Safra

La CMI calculée pour *Pseudomonas* pour l'extrait de Ain Safra est de 8.44 mg/l.

Tableau 7:Tableau récaputulatif des Résultats des CMI.

Extrait / Bacteries	CMI Biskra	CMI El bayed	CMI Bejaia	CMI Ain safra
S. aureus	2.95 mg/l	1.17 mg/l	2.62 mg/l	2.37 mg/l
E. coli	11.05 mg/l.	6.37 mg/l	15.25 mg/l	9.29 mg/l.
P.aeruginosa	11.41 mg/l	7.32 mg/l	15.25 mg/l	8.44 mg/l

4-2. Les résultats de la technique des disques

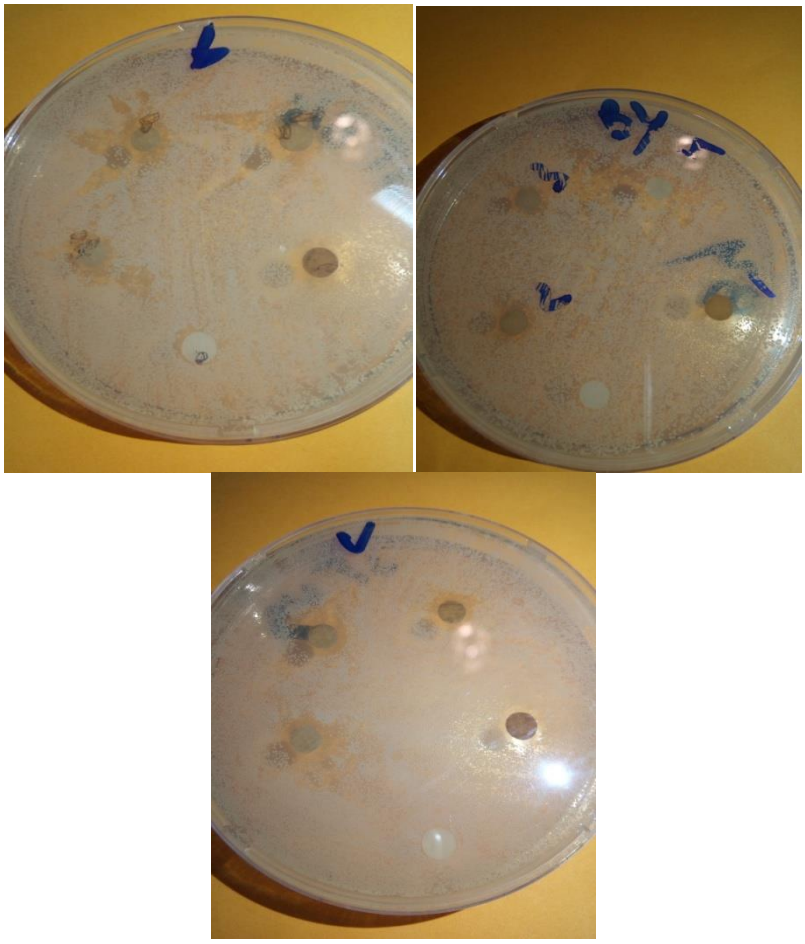


Figure 59:Diamètres des zones d'inhibition en photos vis-à-vis *S. aureus*. Par la méthode des disques.

NB : La technique des disques a été utilisé seuelement pour tester contre le Staphylococcus

Les graphes de l'évaluation de QMI pour la méthode des disques

a- Extrait de biskra

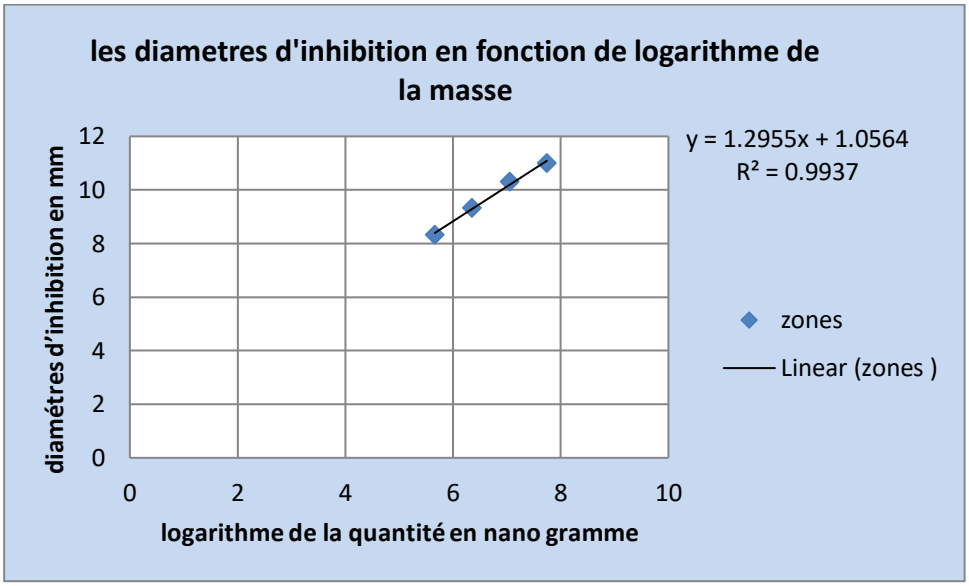


Figure 60: Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de la masse pour le calcul de la QMI de la bactérie S. aureus pour l'extrait de Biskra.

La QMI calculée est de 45.42nano-gramme ou 0.04542 µg.

b- Extrait de bayed

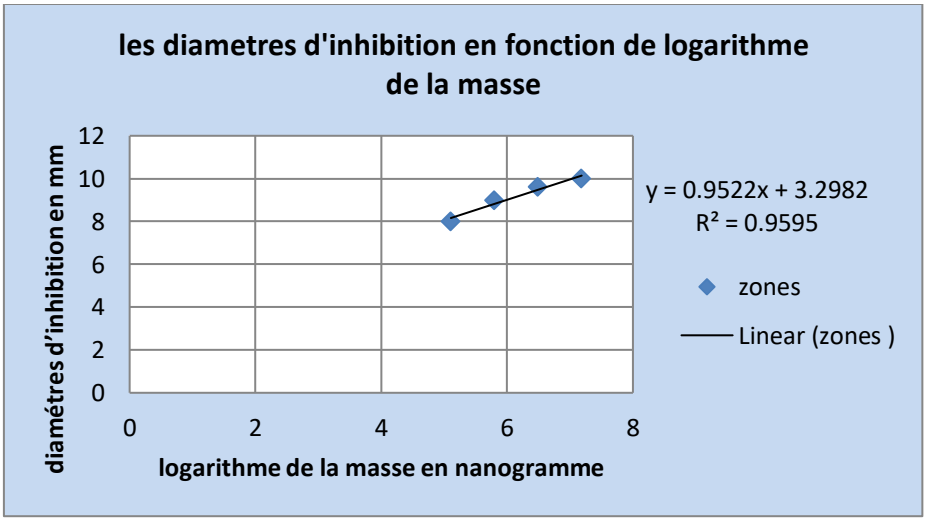


Figure 61:Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de la masse pour le calcul de la QMI de la bactérie *S. aureus* pour l'extrait de El bayed.

La QMI calculée est de17.07 nanogramme ou 0.01707 µg.

c-Extrait de Bejaia

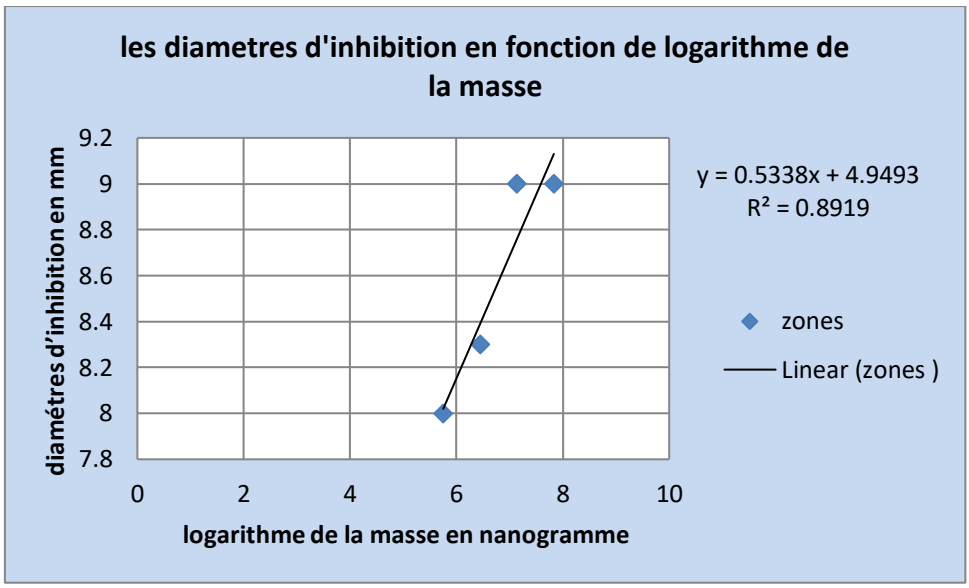


Figure 62:Représentation graphique des diametres d'inhibition en mm en fonction de logarithme de la masse pour le calcul de la QMI de la bactérie *S. aureus* pour l'extrait de Bejaia

La QMI calculée est de7.15 nanogrammes ou 0.00715 µg

Tableau 8 : Tableau récaputulatif des Résultats des QMI.(Méthode des disques)

Extrait / Bacteries	QMI Biskra	QMI El bayed	QMI Bejaia
S.aureus	45.42 nanogramme	17.07 nanogramme	7.15 nanogramme

5. Résultat de dosage des polyphénols totaux

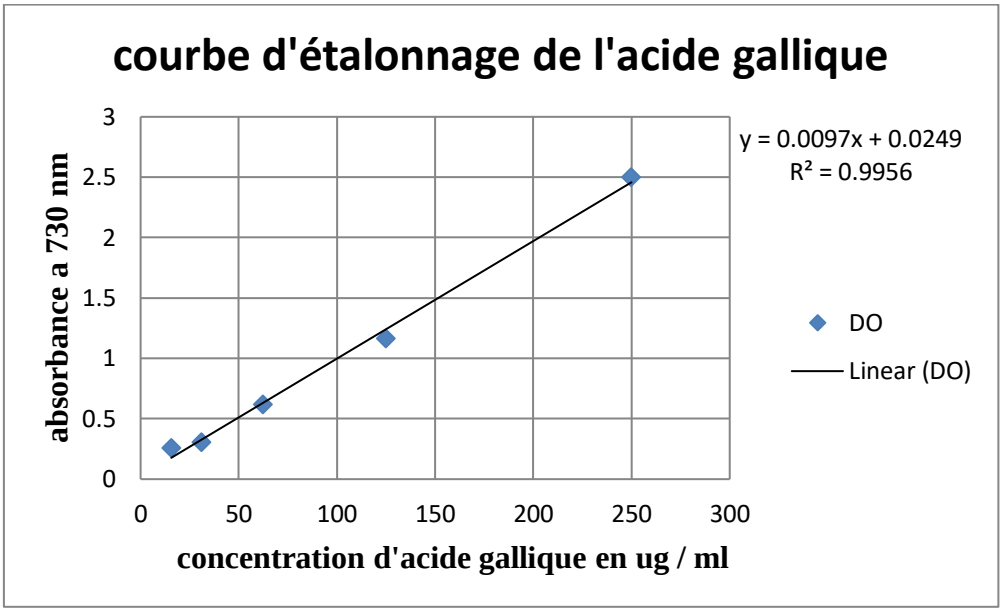


Figure 63:Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Tableau 9:Résultat de dosage des polyphénols totaux dans les différentes echantillons de lapropolis dans pour 100g.

L'extrait	Biskra	EL-Bayed	Bejaia	Ain safra
La quantité de polyphénol	3.29425 g EAG/100g	3.6637 g EAG/100g	2.697 g EAG/100g	2.097 g EAG/100g

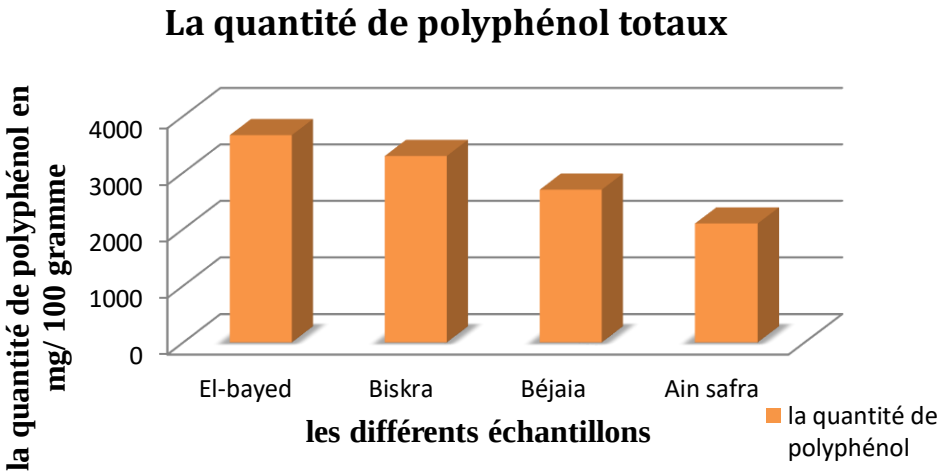


Figure 64:Histograme représente la quantité de polyohénol en mg dans 100g de propolis des différentes régions.

II.3. Discussion

II. 3-1. L'études des souches bacteriennes

Les caracteristiques morphologiques et biochimiques des trois souches ont été bien confirmé à travers l'etude microscopique et les tests réalisés.

Le test de gram au KOH confirme par la coloration de gram sur les trois souches.

L'étude a montrée que l'E.coli est un bacille gram négatif, mobile, non capsulé, glucose +, mannitol +, H2S -, lactose +, catalase +, citrate - et gazogène, ces caractères sont confirmés dans plusieurs études préalables comme celles de Manning (2011) et deLamouriN et al (2018),

La coloration de capsule montre que l'*E. coli* est non capsulée vu l'absence de halo claire qui entoure la bacterie, notre résultat est identique aux résultats citées par (Jann, K., &Jann, B.1992)(SagarAryal2018) qui montre que l'*Escherichia coli* peut être capsulé ou non capsulé et si elle est capsulé elle est plus pathogène.

Nos résultats confirme les caracteristiques de Staphylocoques aureus qui sont des coques à Gram+ , non capsulés, groupés en amas plans irréguliers sur milieu solide, catalase + , mannitol +, lactose +, saccharose +, ce qui est similaire aux résultats de (Carbonnelle et *al*., 1988), (Achille 2006) et (benabdallahkhodjaA et al 2016).

Nos résultats des l'identification biochimique sur la *P.aeruginosa*montre sous microscope que cette bacterie est de Gram- et elle a une forme bacillaire, lactose - , glucose -, gaz- , H2S-, manitol -, citrate +,nos résultats confirme les résultat obtenus par (Boudouda Rahma 2015). L'ensemencement sur le milieu héktoen montre que la *P.aeruginosa*est de lactose – , saccharose– , salicine – . et sur le milieu BCP l'absence d'acidification du milieu alors la P.aeruginosa est de lactose –.

II.3.2. La detection de l'activité antibiotique des extraits

Les extraits de propolis brute ont montré des activités antibiotiques plus au moin importantes vis-à-vis des 3 bacteries, la méthode des puits montrent des zones d'inhibition plus importante que celles de la méthode des disques à cause de la quantité plus importante mise dans les puits, le témoin négatif est revenu sans zone d'inhibition ce qui permet d'attribuer toute zone d'inhibition aux composés extraites et n'ont pas aux solvant qui est l'alcool.

L'effecacitédes extraits de propolis dans l'etude de l'activité antibacterienne est confirmé par Drago et al (2000),Park et al (2002) et Rhajaoui et al (2001).

Les extraitsethanoliques ont une activité plus elevé que les extraits aqueux et pour cette raison que nous avons utilisé l'ethanol pour la préparation des différents extraits de la propolis et ceci revient aussi à la capacité de l'éthanol à solubiliser les molécules actives.

Dans les résultats préliminaires, les extraits de Biskra et de bayed montrent une activité importante.

II.3.3. La determination des CMI

La détermination de la CMI est une étape indisponsable pour l'evaluation de l'activité antibactériennes d'une substance.dans notre travail on a testé l'activité antibactérienne de nos échantillons par la méthode de diffusion sur gélose (disques et puits) en mesurant les diamètres des halots d'inhibition.

Nos résultats montrent que la méthode des puits donne des zones d'inhibition importante avec toutes les bacteries qui ont été testées par rapport a la méthode des diques qui a donné des zones d'inhibition qu'avec la *S. aureus,* ceci peut etre s'expliquer par les quantités limitées que peut un disque porter. Pourcetteraisonlànous avons choisi la méthode des puits pour la détermination de la CMI.

Le determination de la CMI se fait par son calcul à travers de la courbe linéaire de logarithme de la concentration des extraits en fonction de la zoe d'inhibition et vue que les zones d'inhibition représenter dans ces graphes contiennent le diametres des puits et des disques alors il faut les prendre en compte un diamtre de 6 mm représente un résultat négatif dans le graphe et son logarithme de concentration correspond à la CMI.

Les extraits préparés ont tous une activité antibacterienne le tableu 7 montre les valeurs des CMIs de chaque exrait pour chaque bacterie, la CMI la plus petite signifie une actevité plus elevé et une sensibilité plus grande de la bacterie.

Dans touts les EEPs la *staphylococcus aureus* été la bacterie la plus sensible qui a la CMI la plus petite par apport a*l'Echerichia coli* et la *Pseudomonas aeruginosa,* ce qui indique que les EEPs ont une activité forte sur les bacteries Gram+ par apport aux bacteries Gram- , Ces résultats ont été similaires avec Dolci P (2003), Lu LC (2005) et selon .(Ghisalberti, 1979) l'organisme le plus sensible a la propolis était toujours le *Staphylococcus aureus.*

Les résultats ont montré aussi que l'éxtrait de El-bayed est le plus actif selon la méthode des puits pour le*staphylococcus aureus*,*l'Escherichia coli et*le *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI la plus petite par rappot aux autres extraits.

Nos propolis testées sont faiblement actives sur la P aeruginosa nos resultats sont enaccord avec (drago et all 2000 Koo et al2000).

Cette différence dans l'activité entre les différents extraits dépend de différents facteurs comme leur composition, leur origine florale et la zone géographique selon (Crane E1990, Bankova, V2005).

Dans la méthode des disques ou les extraits ont donnés des zones d'inhibition que contre la *staphylococcus aureus*.

II.3.4. La quantification de la teneur en Polyphénol totaux

Selon Nathalie Boizot et Jean-Paul Charpentier (2016),la méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de FolinCiocalteu est utilisée dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductiblespour ces raisons que nous avons utilisé cette méthode.

Notre résultat montre que l'extrait de El-bayed est l'extrait qui contient la quantité la plus elevé des polyphénoles.

Conclusion

La propolis est un produit de la ruche caractérisé par différentes propriétés biologiques qui lui permettre d'occupere une grande place dans la medcine.

Notre travaila confirmé l'activité antibactérienne des extraits éthanoliques de la propolis récoltées dans 4 regionsalgeriennes (Biskra,Béjaia,El-bayed et Ain safra) sur desles trois bacteries(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudompnasaeruginosa*).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la propolis par la méthode de diffusion sur gélose et la determination de la CMI montre que la propolis étaitplus active contre les bacteries Gram (+)*Staphylococcus aureus* par apport aux bacteries Gram (–), (l'*Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa).*

L'effet bactéricide des produits de la propolis dépend de différents facteurs comme leur composition, leur origine florale et géographique ceci explique les différences constatées durant l'étude.

Ces résultats pourraient trouver une application possible dans le traitement des certaines affection causées par des germes pathogènes.

Les annexes

Annexe I

Tableaux des log de concentrations et les diamètres d'inhibition pour chaque extrait et pour chaque bactérie.

Méthode des puits

L'extrait de Biskra :

A. staphylococcus aureus.

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(76,8) mg/l	34,5mm
LN(38,4) mg/l	26,3mm
LN(19,2) mg/l	20mm
LN(9.6) mg/l	17,3mm

B. Escherichia coli

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(76,8) mg/l	15,8
LN(38,4) mg/l	11
LN(19,2) mg/l	8
LN(9.6) mg/l	0

C. Pseudomonas aeruginosa

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(44) mg/l	25,3mm
LN(22) mg/l	22,6mm
LN(11) mg/l	17,3mm
LN(5.5) mg/l	14,6mm

Extrait de Elbayed

A. S.aureus

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(44) mg/l	16mm
LN(22) mg/l	11mm
LN(11) mg/l	8mm

LN(5.5) mg/l	6mm

B. Escherichia coli

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(44) mg/l	16mm
LN(22) mg/l	11mm
LN(11) mg/l	8mm
LN(5.5) mg/l	6mm

C. *Pseudomonas aeruginosa*

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(44) mg/l	19mm
LN(22) mg/l	13mm
LN(11) mg/l	6mm
LN(5.5) mg/l	6mm

Extrait de Bejaia

A. Staphylococcus aureus

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(84) mg/l	34mm
LN(42) mg/l	28mm
LN(21) mg/l	21mm
LN(10,5) mg/l	18mm

B. *Escherichia coli*

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(84) mg/l	14mm
LN(42) mg/l	8mm
LN(21) mg/l	6mm
LN(10,5) mg/l	6mm

C. *Pseudomonas aeruginosa*

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(84) mg/l	18mm
LN(42) mg/l	9mm
LN(21) mg/l	6mm

LN(10,5) mg/l	6mm

L'extrait de Ain safra

A.Staphylococcus aureus

LN concentration	Diamétre des zones d'inhibition
LN(53,25) mg/l	29,6mm
LN(26,625) mg/l	23mm
LN(13,3125) mg/l	16,5mm
LN(6,65625) mg/l	15mm

B.Escherichia coli

LN concentration	Diamétre des zones d'inhibition
LN(53,25) mg/l	14mm
LN(26,625) mg/l	9mm
LN(13,3125) mg/l	6mm
LN(6,65625) mg/l	6mm

C.Pseudompnas aeruginosa

LN concentration	Diamètre des zones d'inhibition
LN(53,25) mg/l	18,5mm
LN(26,625) mg/l	15mm
LN(13,3125) mg/l	6mm
LN(6,65625) mg/l	6mm

Méthode des disques

Extrait biskra s.aureus

ln c	zones
Ln(76,8)	11
Ln(38,4)	10,3
Ln(19,2)	9,33
ln(9,6)	8,33

Extrait bayedh s.aureus

c	zones
Ln(44)	10
Ln(22)	9,6
ln(11)	9
ln(5,5)	8

Extrait bejaia s.aureus

lnc	zones
Ln(84)	9
ln(42)	9
Ln(21)	8,3
Ln(10,5)	8

Annexe II

Le tableau des valeurs de la courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les concentrations d'acide gallique en	L'absorbance a 730 nm
250 µg/ml	2,5 nm
125 µg/ml	1,163 nm
62,5 µg/ml	0,616 nm
31,25 µg/ml	0,304 nm

L'absorbance de chaque extrait :

Les différentes EEPs	L'absorbance a 370 nm
EEP Biskra	1.210 nm
EEP El-bayed	0.7890 nm
EEP Bejaia	0.995 nm
EEP Ain safra	0.779 nm

La Bibliographie

- **Abd El Hady FK, Hegazi AG (2002).** Egyptian propolis: 2. Chemical composition, anti- viral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. Z Naturforsch [C] 2002; 57: 386-394
- **Alfre Ngenge Tamfu et al 2019).**A new isoflavonol and other constituents from Cameroonian Propolis and evaluation of their anti-inflammatory, antifungal and antioxidant potential Saudi Journal of Biological Sciences 27(6)
- **Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, et al (2011)** Preventive and protective effects of Turkish propolis on H_2O_2 induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. Acta Biologica Hungarica. 2011;62(4):388–396.
- **Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., & Cormier, M. (1992).** In vitro antiviral activity of propolis. Apidologie, 23(3), 231–240
- **Ansorge Siegfried , Dirk Reinhold , and Uwe Lendeckel 2003**Propolis and Some of its Constituents Down-Regulate DNA Synthesis and Inflammatory Cytokine Production but Induce TGF-β1 Production of Human Immune Cells.Zeitschrift für Naturforschung C 85 :7-8
- **Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001).** Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy Research, 15(7), 561–571.
- **Bankova V (2005).** Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol; 100: 114-117.
- **Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S (1995).** Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propo- lis. Z Naturforsch C 1995; 50:167-172. (Bankova V, 1995)
- **Bankova VDA, Popov S, Evstatieva L, Kuleva L (1991)** A study on the origin of bulgarian propolis. Apiacta 40: 13–7
- **Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG(2002)**. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Zeitschrift für Naturforschung; 57c: 530-533
- **Bankova, V. Recent** (**2005)** trends and important developments in propolis research. eCAM ; 2: 29-32.

- **Benabdallah khodja akram et Hamlaoui Yahia (2016)**.Etude phénotypique de quelques souches d'echerichia coli productrices des cerbapénémases. (2016).
- **BERGHE, V. A. and VLIETINCK, A. J. (1991).** Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Method for Plant Biochemistry6: 47-68.
- **Bogdanov, S., (2016).** Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, Bee Product Science, 6.
- **Boudouda Rahma (2015)** Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de Pseudomonas aeruginosa Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
- **Boyanova Galina Gergova , Rossen Nikolov , Sirigan Derejian , Elena Lazarova , Nikolai Katsarov , Ivan Mitov , Zacharii Krastev . (2005),** Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods 54(Pt 5):481-483.
- **Brehon, S., Giraud, C., Certain, A. (2000).**L'alcool dans les médicaments; analyses des risques et de l'information des spécialités administrées par voie orale ou injectable. Journal de Pharmacie Clinique. Vol 1(19), 32 Pharmacothérap.

- **Burdock GA (1998)** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol 36: 347–63)
- **Castaldo S, Capasso F.** Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 2002; 73 Suppl 1: S1-6.
- **Carbonelle D.,Kouyoumdjian S., Audurier A.,1988.** Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. France. 251p

- **Cestari SH, Bastos JK, Di Stasi LC(2009)**. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Baccharis dracunculifolia in the Trinitrobenzenesul- phonic Acid Model of Rat Colitis. Evid Based Complement Alter- nat Med 2009; (in press).

- **Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L, Lin JK.(2004)** Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. eCAM 2004; 1: 175-185.
- **Chopra S, Pillai KK, Husain SZ, Girl DK(1995)**. Propolis Protects against doxorubicin-induced myocardiopathy in rats. Exp Mol Pathol ,62: 190-198
- **CHOUINI Asma TABOUCHE Khalida(2013)** Bactériologie des fientes des Hirondelles (Région de Guelma) 2013 univ guelma.
- **Claus R, Kinscherf R, Gehrke C, et al(2000)**. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. Arzneimittel-Forschung.;50(4):373–379.
- **Crane E. Bees & Beekeeping(1990)**. Science, Practice and World Re-courses. Ithaca/NY: Comstock Publishing Associates; ISBN:0-8014-2429-1.
- **Crane, E., (1999).** History of other products from bees the world history of beekeeping and honey hunting, Gerald Duckworth & Co Ltd, London, pp. 545-553
-
- **Cuesta Rubio O, Frontana-Uriba BA, Ramirez-Apan T, Cardenas J.(2002).**Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. Z Naturforsch ;57c:372-8.
- **Daleprane JB, da Silva Freitas V, Pacheco A, et al.(2012)** Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. Journal of Nutritional Biochemistry. 2012;23(6):557–566
- **Daleprane JB, Schmid T, Dehne N, et al(2012)**. Suppression of hypoxia-inducible factor-1α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. Journal of Nutrition.;142(3):441–447.

- D. **A. Murphy, S. Makonnen, W. Lassoued, M. D. Feldman, C. Carter, and W. M. F. Lee(1885),** "Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006), American Journal of Pathology, vol. 169, no. 5, pp. 1875–1885, 2006.
- **David, E., B., DE Carvalho, T., B., Boni De Oliveira, C., M., CoradiI, S., T., Sforcin, J., M., Guimaraes, S., (2012).**Characterisation of protease

activity in extracellular products secreted by Giardia duodenalis trophozoites treated with propolis. Natural Product Research, 26 (4), 370-374.

- **Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., (1992).**Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram- negative infections and adjuvant effect of the watersoluble derivative. Vaccine, 10, 817-823.
- **Dolci P, Ozino OI (2003)** Study of the in vitro sensitivity to honey bee propolis of Staphylococcus aureus strains characterized by diffe- rent sensitivity to antibiotics. Ann Microbiol 53: 233–43

- **Drago, L., Mombelli, B. D. E., Vacchi, E., Fassina, M. C, Tocalli, L., Gismondo, M. R (2000).** In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. J. Chemother. Vol 12 (5) : 390-5.
- **Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B. (1996)** Antimicrobial evaluation andchromatographic analysis of some essential and tixed olls. Pharmazie; 51 pp.993-995.
- **Fearnley, J., (2001).** Bee propolis: natural healing from the hive. Souvenir Press London, pp. 172.
-
- **Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., M., Cunha, A., and Aguiar, C., (2010).** How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. in Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Microbiology Book. A.Mendez-Vilas Ed., 1 (2), 481- 493.
- **Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. (2016).** Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp. Journal de Mycologie Médicale, 26(2), 122–132.
- **Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE(2005)**. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. **PHARMACOLOGICAL RESEARCH**. ;51(2):147–152
- **Gama GB (1993)**. The propolis and malaria. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 26:193.

- **Gardana C, Scaqlanti M, Pietta P, Simonetti P (2007).**Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal; 45: 390-399.
- **Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I., (2004).** Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. Thermochimica Acta, 422, 115-124.
- **G. M. Cohen (1997)**, "Caspases: the executioners of apoptosis," Biochemical Journal, vol. 326, no. 1, pp. 1–16,
- **Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Moreno-Torres R, García- Salas P(2007)** , Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis- mass spectrometry. J Sep Sci 2007; 30: 595-603.
- **Gressler, L., T., Da Silva, A., S., Machado, G., Dalla Rosa, L., Dorneles, F., Gressler, L., T., Oliveira, M., S., Zanette, R., A., De Vargas, A., C., Monteiro, S., G., (2012).**Susceptibility of Trypanosoma evansi to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. Research in Veterinary Science, 93 (3), 1314-1317.
- **HARLEY J P., KLEIN D A. et PRESCOTT L M., 2010** : Microbiologie. Edition 3 De Boeck, Bruxelles. 1086 pages.
- **Haghdoost, N. S., Salehi, T. Z., Khosravi, A., & Sharifzadeh, A. (2016).** Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of Candida albicans. Journal de Mycologie Médicale, 26(4), 298–305.
- **Hausen, B., M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., (1987).** Propolis allergy II. the sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. Contact Dermatitis, 17, 171-177.
- **Hoşnuter M, Gürel A, Babucçu O, Armutcu F, Kargi E, Işikdemir A(2004).** The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. Burns.30(2):121–125
- **Imhof M. Lipovac Ch. Kurz J. Barta H.C. Verhoeven J.C.(2005) Huber**. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis 89, Issue2Pages 127-132

- **Izuta H, Narahara Y, Shimazawa M, Mishima S, Kondo S, Hara H.** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. Biol Pharm Bull 2009; 32:1947-1951.
- **Ivanovska, N., Stefanova, Z., Valeva, V., Dimov, V., Bankova, V., and Popov, S., (1993),** Immunomodulatory action of lysine derivatives of cinnamic acid. In: Immunotherapy of Infections (K. N. Masihi, ed.). Marcel Dekker Inc, New York, USA, 177-182.
- **Ivanovska ND V.B.Dimov[a]V.S.Bankova[b]S.S.Popov[b] (1995)** Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo vol 47, Issue 3, Pages 145-147
- **Jann, K., & Jann, B. (1992).** *Capsules of Escherichia coli, expression and biological significance. Canadian Journal of Microbiology, 38(7), 705–710.*
- **J. Folkman,** "Angiogenesis and apoptosis," Seminars in Cancer Biology, vol. 13, no. 2, pp. 159–167, 2003.
- **J. Folkman,** "Clinical applications of research on angiogenesis," The New England Journal of Medicine, vol. 333, no. 26, pp. 1757–1763, 1995.
- JulioBeltrameDaleprane1 andDulcinéiaSaesAbdalla2 2013 Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions.Evidence-BasedComplementaryandAlternativeMedicine.p8
- **KazuhiroKunimasa Mok-RyeonAhn TomomiKobayashi RyojiEguchi Shigenori Kumazawa Yoshihiro Fujimori, Takashi Nakano , Tsutomu Nakayama , Kazuhiko Kaji , and Toshiro Ohta (2011**) Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesisby Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2 , Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 8 pages.
- **Ke˛dzia, B.; Hołderna-Ke˛dzia, E. Aktywnos´c´** antybiotyczna propolisu krajowego i europejskiego. The antibiotic activity of native and European propolis. Post. Fitoter. 2013, 2, 97–107
- **Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS, et al. (2003**) A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. Fundam Clin Pharmacol 17: 93–102.
- **Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M, Mito K.** Apoptosis and suppression of tumor growth by

artepillin C extracted from Brazilian propolis. Cancer Detect Prev 1998; 22: 506 -515.

- **Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., S., Chritov, R; Popov, S., (1999).**Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology, 64 (3), 235-240.
- **Koo, H., Gomes.,Rosalen., Amberasano., Park., Cury. (2000**). In vitro antimicrobiol activity on propolis and Arnica-montana against oral pathogens. Arsh Oral Biol. Vol 45 (2): 141-148.
- **Krell, R. (1996).** Value-Added products from beekeeping. FAO Agricultural services. Bulletin n0 124.
- **Kumazawa S, Hamasaka T,Nakayama T**. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem 2004; 84: 329- 339
- **Kumazawa S,** Ueda R, Hamasaka T, Fukumoto S, Fujimoto T, Nakayama T. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis col- lected in Okinawa, Japan. J Agric Food Chem 2007; 55: 7722- 7725.
- **Kunimasa, K., Ahn, M.-R.,Kobayashi, T., Eguchi, R., Kumazawa, S., Fujimori, Y., … Ohta, T. (2011).** Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK1/2. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,
- **L. AlMsrghitaş, D. S. Dezmirean, and O. Bobiş (2013)**; ‘’Important Developments in Romanian Propolis Research ‘’ Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine ; 9 pages.)
- **Lamouri Noumidia Sarah MesselemMelouka Bouchera (2018)** Anitibiorésistance des souches Escherichia coli univ Belhadj Bouchaib d’Aïn-Témouchet
- **Lee, Y., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E., & Thrupp, L. D. (2002).** *Antibacterial activity of citrate and acetate. Nutrition, 18(7-8), 665–666.* doi:10.1016/s0899-9007(02)00782-7
- **Lemos M, de Barros MP, Sousa JP, da Silva Filho AA, Bastos JK (2007)**, de Andrade SF. Baccharis dracunculifolia, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. J Pharm Pharmacol 2007; 59: 603-608.

- **Lima ROA, Bazo AP, Said RA, et al (2005).** Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. Environmental and Molecular Mutagenesis.;45(1):8–16
- **Lin SC, Lin YH, Chen CF, Chung CY, Hsu SH (1997).** The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. Am J Chin Med ; 25: 325-332.
- **Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD (2008) .**Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. Am J Clin Nutr 2008; 88:1018-1025.
- **López BGC, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaya ACHF (2014)**. Phytochemical markers of different types of red propolis. Food Chem ;146:174—80.
- **Lu LC, Chen YW, Chou CC (2005)** Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. Int J Food Microbiol 102: 213–20
- **Marcucci MC, Ferreres F, Custódio AR, Ferreira MM, Bankova VS, García-Viguera C, Bretz WA(2000)**. Evaluation of phenolic com- pounds in Brazilian propolis from different geographic regions. Z Naturforsch C 2000; 55: 76-81.
- **Marcucci MC(1995)** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 26: 83–99.
- **Mastsushige k kusumotoD, Yzmzrnoto Y, Kadotas NambaT (1995).**quality evaluation of propolis JTRAD MED 12 :45-53
- **M. J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh (2003),** "VEGF-receptor signal transduction," Trends in Biochemical Sciences, vol. 28, no. 9, pp. 488–494.
- **Mirzoeva OK, Calder PC(1996)**. The effect of propolis and its compo- nents on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids ; 55: 441-449.
- **Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Colder, P.C., (1997).** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research, 52, 239-246.
- **Missima, F., Pagliarone, A. C., Orsatti, C. L., Araújo, J. P., & Sforcin, J. M. (2010).** The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and

production by melanoma-bearing mice submitted to stress. Phytotherapy Research, 24(10), 1501–1507. doi:10.1002/ptr.3142

- **Moura SA, Ferreira MA, Andrade SP, Reis ML, Noviello MD, Cara DC (2010).**Brazilian green propolis inhibits inflammatory angio- genesis in a murine sponge model. Evid Based Complement Alter- nat Med; (in press).
- **M.-R. Ahn, K. Kunimasa, T. Ohta et al.(2007),** "Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation," Cancer Letters, vol. 252, pp. 235–243, 2007.
- **M T Khayyal[1], M A el-Ghazaly, A S el-Khatib, A M Hatem, P J F de Vries, S el-Shafei, M M Khattab (2003**) A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients 17(1):93-102.
- **Nakanishi I, Uto Y, Ohkubo K, Miyazaki K, Yakumaru H, Urano S, Okuda H, Ueda J, Ozawa T, Fukuhara K, Fukuzumi S, Naga- sawa H, Hori H, Ikota N (2003).** Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. Org Biomol Chem 2003; 1:1452-1454
- **Nathalie Boizot, Jean-Paul Charpentier (2016)** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques. Le Cahier des Techniques de l'Inra.
- **Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P (2009)**. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. Phy- tomedicine; 17:132-138
- **N.S. Haghdoost a , T.Z. Salehi b, A. Khosravi a , A. Sharifzadeh a 2016.**Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of Candida albicans Pages 298-305
- **Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, et al. (2010)** Th1/Th2 cyto- kines' expression and production by propolis-treated mice. J Ethno- pharmacol 129: 314–8
- **Orsi ROF, Soares SRC, Calvi A, et al. (2000)** Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. J Venom Anim Toxins 6: 205–19

- **Orsi RO, Sforcin JM, Rall VLM, Funari SRC, Barbosa L, Fernan- des JR A (2005).**Susceptibility profile of Salmonella against the antibacte- rial activity of propolis produced in two regions of Brazil J Venom Anim Toxins incl Trop Dis; 11: 109-116
- **OrsoliN, KnezeviAH, Sver L, TerziS (2004)** BasiI. Immunomodu- latory and antimetastatic action of propolis and related polypheno- lic compounds. Ethnopharmacol; 94: 307-315.
- **Orsolic *et al*. -2006)**CYTOTOXICITY OF PROPOLIS AND ITS POLYPHENOLIC COMPOUNDS ON PRIMARY CULTURE OF HUMAN URINARY BLADDER TRANSITIONAL CELL CARCINOMA Pharmacologyonline 3: 408-415.
- **OYAIZUM ,Ogighara H, Fujimoto Y.(1999a)** Antioxidative activity of extract from propolis.J jap oil cheur soc 48 :48 :135-138.
- **OYAIZUM ,Ogighara H, Fujimoto Y.(1999b)** Antioxidative activity of extract from propolis.nihon yukaga 48 :48 :135-138.
- **MORENOMIN, ISLA MI ,SAMPIETRO,AR Vattuone (2000)** comparision of the free radical scavenging activiyu of propolis from serveral region of argentina.J Ethnopharmacrol 71 :109-114.
- **Park HD, et al. (1996)** The S. cerevisiae nitrogen starvation-induced Yvh1p and Ptp2p phosphatases play a role in control of sporulation. Yeast 12(11):1135-51.
- **Park JH, Lee JK, Kim HS, et al. (2004)** Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. Int Immunopharmacol 4: 429–36
- **Park SG, Lee DY, Seo SK, Lee SW, Kim SK, Jung WK, Kang MS, Choi YH, Yea SS, Choi I, Choi IW (2008) .** Evaluation of anti-allergic properties of caffeic acid phenethyl ester in a murine model of sys- temic anaphylaxis. Toxicol Appl Pharmacol 2008; 226:22-29
- **Pascual C, Gonzalez R (1994) ,** Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. Journal of Ethnopharmacology. 1994;41(1-2):9–13.
- **Pepeljnjak, S., Kosalec, I., (2004).** Galangin expresses bactericidal activity against multiple- resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiology Letters, 240 (1), 111-116.

- Matsushigeetal. (1995) Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*
- **pereyer (2011)** staphylococcus laboratoire de bacteriologie CHU.bordeaux.
- **Popova MP, Chinou IB, MarekovIN, Bankova VS (2009).** Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. Phytochemistry; 70: 1262-1271.
- **Pushpavalli G, Kalaiarasi P, Veeramani C, Pugalendi KV(2010).**Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D- galactosamine-induced hepatitis in rats. Eur J Pharmacol; 631:36-41.
- **Ransome, H.M., (1937).** The sacred bee in ancient times and folklore. George Allen and Unwin, London, pp. 308.
- **R. Eguchi, A. Suzuki, S. Miyakaze, K. Kaji, and T. Ohta (2007),** "Hypoxia induces apoptosis of HUVECs in an in vitro capillary model by activating proapoptotic signal p38 through suppression of ERK1/2," Cell Signalling, vol. 19, pp. 1121–1131.
- **Remirez D, González R, Rodriguez S, et al.**Protective effects of propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. Phytomedicine. 1997;4(4):309–314.
- **Rhajaoui, M., Oumzil, H., Faid, M., Lyagoubi, M., Elyachioui, M. (2001).** Antibacerial activity of a Maroccan propolis extracts. Sciences letters. Vol 3 (3) : 201-207
- **Sagar Aryal (2018)Biochemical Test and Identification of E. coli 2018.**
- **Sagar Aryal (2018)** Biochemical Test and Identification of Pseudomonas aeruginosa September 26, 2018 microbiologyinfo.com
- **Savka, M., Dailey, L., Popova, M., Mihaylova, R., Merritt, B., Masek, M., Le, P., Nor, S., Ahmad, M., Hudson, H., Bankova, V., (2015).** Chemical Composition and Disruption of Quorum Sensing Signaling in Geographically Diverse United States Propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2015, Article ID 472593, 10 pages http://dx.doi.org/10.1155/2015/472593.

- **Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V (1992) .** Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substi- tuted cinnamic acids). J Nat Prod 1992; 55: 294-302. (Serkedjieva J, 1992)
- **Sforcin JM (2007) .** Propolis and the immune system: a review. J Ethno-pharmacol 2007; 113: 1-14.
- **Shinmei Y, Yano H, Kagawa Y, et al. (2009)** Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental allergic rhinitis of mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 31: 688–93
- **Siess MH, LeBon AM, Canivenc-lavier MC, Suschetet M. Mecha (2000)** nisms involved in the chemoprevention of flavonoids. Biofactors 2000; 12: 193-198.
- **Silici, S., Kutluca, S., (2005).** Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology, 99, 69-73.
- **Silva V, Genta G, Möller MN, et al (2011).**Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry.59(12):6430–6437.
- **Sorkun K, Ismet Delilolu Gurhan S, Ozdal- Kurt F, Turkoz E, Gencay O, Salih B.** Propolis from Turkey in- duces apoptosis through activating caspases in human breast carci- noma cell lines. Acta Histochem. ; (in press).
- **Stefan Bogdanov and Vassya Bankova . 2016 Propolis: Origin, Production, Compostion.**
- **TATEFUJI, Noboru IZUMI, Tsunetaka OHTA, Shigeyuki ARAI, Masao IKEDA, Masashi KURIMOTO(1996).**Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage Spreading and Mobility Volume 19 Issue 7 Pages 966-970
- **Tossoun, Z., A. Rashed and A.G. Hegazi, 1997.** Honey and propolis as management of chronic skin ulcers. Proceedings of the International Symposium on Apitherapy, 8-9th March, Cairo.
- **Van Acker SA, van Den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF and Bast A (1996)**. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic Biol Med; 20: 331-342.
- **Viel, C., Dore JC., (2003**). History and uses of honey, mead and hive products. Revue d'histoire de la pharmacie, (Paris), 51 (337), 7-20

- **Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, et al. (2008)** Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci 73: R117–R24.
- **Weng MS, Wu CL, Lin JK (2004).** Comparison of radical scav- enging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. Evid Based Complement Alternat Med. 1: 175-185.
- **Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, Park JW, Kwon TK(2005) .**Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA- binding activity. FEBS Lett. 579: 705-711.
- **Willey JM , sherwood LM , woolverton CJ (2010)**.Mmicrobiologie,3éme edition De boeck p 579
- **Ya Bi Foua Achille.R**. **(2006).** Doctorat en pharmacie, Profil antibiotiques des bactéries responsable d'infection urinaire communautaire. Université Bamako, Bamako.
- **Ying-Nong Lee (2006)** Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extractions Separation and Purification Technology 54(1):130-138
- **Yoshifumi Shinmei , Haruna Yano, Yoto Kagawa, Kana Izawa, Masaaki Akagi, Toshio Inoue, Chiaki Kamei(2009)**Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental allergic rhinitis of mice 31(4):688-93.