

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



28/595

570.278

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire des procaryotes

**Thème : Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne
des flavonoïdes de la propolis**

Présenté par : BOUGUERRA Kaouther

DAFRI Selma

Devant le jury composé de :

Président	: M. BENOURETH Djameleddine (Pr.)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Examinatrice	: M ^{me} . Ayad Hayatte (M. A. A)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Examineur	: M. HEMISSI Ahmed (M. A. A)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Encadreur	: M ^{me} . BRAIK Asma (M. A. B)	(Université 8 mai 1945 Guelma)

Juin 2012

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

278



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire des procaryotes

**Thème : Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne
des flavonoïdes de la propolis**

Présenté par : BOUGUERRA Kaouther

DAFRI Selma

Devant le jury composé de :

Président	: M. BENOURETH Djameleddine (Pr.)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Examinatrice	: M ^{me} . Ayad Hayatte (M. A. A)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Examineur	: M. HEMISSI Ahmed (M. A. A)	(Université 8 mai 1945 Guelma)
Encadreur	: M ^{me} . BRAIK Asma (M. A. B)	(Université 8 mai 1945 Guelma)

Juin 2012

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous tenons à remercier Allah le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience.

Tout d'abord, nous remercions sincèrement nos directrices de mémoire, M^{me} BRAIK Asma.

Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout le long de ce travail. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Nous nous adressons nos profondes reconnaissances pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Nos remerciements vont au Pr. BENOUARETH D.E pour avoir accepté de présider notre jury et M^{me} AYAD. H et M HEMISSLA pour avoir examinés notre travail.

Nos remercions également Messieurs CHIAKHA Abdel azzize chef de service de laboratoire d'analyses médicales établissement hospitalier d'Ibn Zohr de Guelma Veuillez trouver ici l'expression de nos gratitude pour nous avoir accueilli au sein de vos laboratoires. Soyez assuré de nos profonds respects et de nos vives reconnaissances pour nous avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles.

Une pensée particulière pour BOUGUERRA Nadia Dr en médecine, vous étiez toujours à nos côtés et vous nous avais toujours apporté le soutien. Pour cela, nous vous remercions chaleureusement.

Nos profonde reconnaissance va à M^{elle} ABBAS Leila, nous n'oublions pas votre soutien moral qui nous avons souvent aidé à remonter la pente dans les moments difficiles.

Nos remerciements vont également aux techniciennes des laboratoires de l'Université pour leur aide précieuse.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, nous tenons à remercier de tout cœur nos familles.

Dédicace

Je dédie ce travail....

A la mémoire de mon père

A ma belle mère

A ma sœur Zeyneb

A mon frère Abdoullah

A ma nièce ALLA

A ma belle Kaouther

*A mes amies Safia, Imane, Mounira, à les deux
Manous et à Selma*

A tous ceux que j'aime

SELMA

Produced with ScanTOPDF

Dédicace

A mes très chers parents

Abde lekrime et Romona

A mes sœurs : Nadiwa et Mira

A mes frères : Zinou et Bouda

A ma nièce Marouma et son père Moussa

A mes belles Selma et Fatma

A tous ceux qui me sont chers

KAOUTHER

Sommaire

Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
<i>Revue bibliographique</i>	
Chapitre I :Le stress oxydatif	01
I. le stress oxydatif	02
I. 1. Définition	02
I. 2. Origine du stress oxydatif	03
II. Les radicaux libres	03
II. 1. Définition	03
II. 2. Caractéristiques des radicaux libres	04
II. 3. Les principaux radicaux libres	04
II. 4. Les sources des radicaux libres	07
II. 4. 1. Sources endogènes	07
II. 4. 2. Sources exogènes	09
II. 5. Intérêts physiologiques des radicaux libres	10
II.5.1.Rôle dans la phagocytose	10
II.5.2.Rôle dans la communication cellulaire	10
II. 6. Les cibles biologiques des radicaux libres	11
III. Les maladies liées aux stress oxydatif	14
VI. Le système de défense antioxydant	15
VI.1. Définition	15
VI. 2. Caractéristiques des antioxydants	15
VI. 3. Classification des systèmes antioxydants	15

VI. 3. 1. Les antioxydants enzymatiques.....	15
VI. 3. 2. Les antioxydants non enzymatiques.....	17
IV.3.2.1. Les antioxydants hydrosolubles.....	17
VI.3.2.2. Les antioxydants Liposolubles.....	18
IV.3. 3. 3. Autres molécules antioxydantes.....	20
Chapitre II : les polyphénols.....	21
I. Généralités.....	22
II. Biosynthèse des composés phénoliques	22
III. Principales classes des composés phénoliques	22
III. 1. Les acides phénoliques et les coumarines.....	24
III. 2. Les flavonoïdes	25
III. 2. 1. Structure chimique.....	25
III. 2. 2. Classification.....	25
III. 2. 3. Distribution.....	28
III. 2. 4. Biosynthèse des flavonoïdes.....	29
III. 2. 5 Activités biologiques des flavonoïdes et des polyphénols.....	30
III. 2. 5. 1. Propriétés antioxydantes et piègeurs de radicaux libres	31
III. 2. 5. 2. Propriétés antibactériennes.....	31
III. 2. 5. 3. Autres propriétés biologiques.....	32
Chapitre III : la Propolis.....	34
III. 1. Définition	35
III .2. Historique de la propolis	35
III. 3. L'origine de la propolis.....	35
III. 4. L'utilisation de la propolis dans la ruche.....	36
III. 5. Récolte de la propolis.....	36
III. 6. Propriétés physique de la propolis.....	37
III. 7. Composition chimique de la propolis.....	37
III. 8. Les propriétés pharmacologiques de la propolis.....	38

Partie expérimental

Chapitre IV : Matériels et méthodes41

Chapitre V : Résultats et discussions.....50

Conclusion et Perspectives

Références bibliographique

Annexes

Résumé

Produced with ScanTOPDF

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AK	Amikacin
AlCl₃	Trichlorure d'Aluminium
ATCC	American Type Culture Collection
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CFI	Concentration Minimale Inhibitrice
CTX	Cefotaxime
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EEP	Extrait éthanolique de propolis
EC₅₀	Concentration efficace qui inhibe 50% du radicale libre
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
ERA	Espèces réactives d'azote.
Fe	Fer
GCMS	gaz chromatography mass spectrophotometre
GR	Glutathion réductase.
GSH	Glutathion réduit.
GSH-Px	Glutathion peroxydase.
GSSG	Glutathion oxydé.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
HDL	High density lipoprotein.
HO·	Radical hydroxyle.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPM	Imipenème
LDL	Low density lipoprotein.
MeOH	Méthanol
MDA	Malonyldialdéhyde
NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucléotide oxydé.
NADPH,H⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.
NO·	Monoxyde d'azote

NOO[•]	Nitroxyde
O₂⁻	Anion superoxyde
^{1/2}O₂	Oxygène singulet
ONOO[•]	Peroxynitrite
PCA	Propolis commerciale algérienne
PCF	Propolis commerciale française
RL	Radical libre
RO[•]	Radical alkoxyde
ROO[•]	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde lipidique
SOD	Superoxyde dismutase
4-HNE	4-hydroxynonanal

Produced with ScanTOPDF

Liste des figures
Revue bibliographique

Chapitre I : Le stress oxydatif

Figure 01 : schéma de la balance anti-oxydante/ pro-oxydante	02
Figure 02 : Les différentes origines du stress oxydatif	03
Figure 03 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde.....	07
Figure 04 : Fuites d'électrons au cours de la respiration cellulaire.....	08
Figure 05 : Lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	12
Figure 06 : Schéma des étapes de la peroxydation lipidique	13
Figure 07 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	14
Figure 08 : Exemple de réaction antioxydante en chaîne mettant en jeu les vitamines E et C.	19

Chapitre II : Les polyphénols

Figure 09 : Structure chimique de quelques coumarines.....	25
Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes	26
Figure 11 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes	30
Figure 12 : Représentation des groupements piègeurs des flavonoïdes Exemples de la quercétine	31
Figure 13 : Effets biologiques des polyphénols	32

Chapitre III : La propolis

Figure 14 : Raclage de propolis par raclage ou en grille.....	37
--	----

Partie expérimental

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Figure 15 : Forme libre et réduite du DPPH44

Chapitre V : Résultats et Discussion

Figure 16 : chromatogramme représentant les spots de migration des flavonoïdes correspondant de gauche à droite à l'EEP, la PCF, la PCA et la quercétine.....51

Figure 17 : Courbe d'étalonnage de la quercétine par l' $AlCl_3$53

Figure 18: variations des pourcentages de réduction du DPPH° par les solutions méthanoliques de la vitamine C, de la quercétine, de l'EEP et de la PCA, à différentes concentrations massiques (mg/ml).....56

Figure 19 : variations des pourcentages de réduction du DPPH° par les solutions méthanoliques de la PCF à différentes concentrations volumiques (ml/ml).....57

Figure 20 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la vitamine C à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH°58

Figure 21 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la quercétine à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH°.....59

Figure 22 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH°.....59

Figure 23: Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la propolis commerciale algérienne à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH°.....60

Figure 24 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la propolis commerciale française à différentes concentrations volumiques vis-à-vis du radical libre DPPH°.....60

Figure 25 : L'effet des échantillons testés sur *Staphylococcus aureus*.....63

Figure 26 : L'effet des échantillons testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.....64

Figure 27 : L'effet des échantillons testés sur <i>Escherichia coli</i>	64
Figure 28 : L'effet des échantillons testés sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
Figure 29 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Figure 30 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Figure 31 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur <i>klebsiella pneumoniae</i>	70
Figure 32 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur <i>E.coli</i>	71

Produced with ScanTOPDF

Liste des tableaux

Revue bibliographique

Chapitre I : Le stress oxydatif

Tableau 01 : Principaux radicaux libres rencontrés en biologie.....	04
Tableau 02: Principales sources endogènes et exogènes des radicaux libres (ERO).....	09
Tableau 03 : Les enzymes anti-oxydantes	17

Chapitre II : Les polyphénols

Tableau 04 : Squelette carbonique de quelques classes des polyphénols.....	23
Tableau 05 : Nomenclature des sous-classes des flavonoïdes	27
Tableau 06 : distribution des principales classes des flavonoïdes.....	28

Partie expérimental

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Tableau 07 : concentration méthanoliques de quercétine de la courbe d'étalonnage.....	44
Tableau 08 : Concentrations des dilutions des extraits Vit C, Q, EEP, PCA (mg/ml).....	45
Tableau 09 : Concentrations des dilutions méthanoliques de l'extrait PCF (V/V).....	45

Chapitre V : résultats et discussion

Tableau 10 : Résultats représentant la teneur des échantillons de la propolis en flavonoïdes exprimées en mg équivalent de quercétine/mg de l'EEP ou de la PCA) et en µg équivalent de quercétine/ml de la PCF	54
Tableau 11: Valeurs des EC ₅₀ de la vitamine C, de la quercétine, de l'EEP et de la PCA.....	58
Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition de la quercétine, de l'EEP, de la PCA, de la PCF et des antibiotiques.....	62
Tableau 13 : Concentrations minimales inhibitrices de la quercétine, de l'EEP, de la PCA, et de la PCF vis-à-vis des quatre souches bactériennes.	66

Tableau 14 : Concentration minimale bactéricide des extraits Concentration minimale inhibitrice des extraits	72
Tableau 15 : Valeurs de rapports CMI/CMB des l'extraits Concentration minimale bactéricide des extraits.....	72

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Produced with ScanTOPDF

Introduction

Le stress oxydant est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à une production endogène ou exogène des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui dépasse leurs capacités antioxydantes.

Cet excès d'ERO non neutralisés est très dommageable pour les macromolécules cellulaires telles que l'ADN, les lipides et les protéines. De ce fait, de nombreuses affections humaines (cancers, maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et oculaires) incluent donc un stress oxydant, local ou général, dans leur pathogenèse.

La complexité de ce nouveau concept et son implication dans de nombreuses maladies explique au moins en partie l'accumulation des recherches portant sur ce phénomène et la recherche de nouvelles substances permettant de mettre fin à ses dégâts pathologiques ou leur prévention.

Aujourd'hui, la majorité des travaux de recherche s'orientent vers l'utilisation des produits de la ruche et des plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances apithérapeutique et phytothérapeutiques ayant de propriétés antioxydantes et piègeuses des ERO.

En effet, de plus en plus pratiquée dans le monde, l'apithérapie ou l'usage médical des produits de la ruche (miel, propolis, gelée royale, pollen ou encore la cire et le venin d'abeilles) semble être une voie thérapeutique prometteuse pour la prévention et même la guérison de plusieurs maladies impliquant ou non un stress oxydatif.

Effectivement, grâce à ses propriétés à larges spectre, la propolis est le produit apicole le plus médicinale de la ruche. Etant riche en flavonoïdes et en acides phénolique, la propolis est pourvue d'une très forte activité antioxydante et antimicrobienne, faisant d'elle le sujet de plusieurs études scientifiques qui restent toutefois encore trop peu nombreuses ou incomplètes.

Dans ce contexte, notre travail expérimental a comme objectif d'étudier les propriétés antioxydante et antibactérienne de quelques échantillons de propolis de différentes origines. Notre étude englobe deux aspects :

Le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur la mise en évidence des flavonoides et leur dosage dans les différents échantillons de propolis.

Le second aspect est consacré à une évaluation du pouvoir piègeur des radicaux libres (*in vitro*) des différentes propolis et à la détermination de son efficacité antibactérienne vis-à-vis de quelques souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumonia* et *Staphylococcus aureus*, pouvant être pathogènes pour l'homme.

Ce mémoire est structuré en deux parties.

La première partie est une synthèse bibliographique qui commence par le chapitre du stress oxydatif, le deuxième chapitre décrit l'ensemble des polyphénols et particulièrement les flavonoides. Quant au troisième, il apporte les détails concernant la propolis, ses caractéristiques ainsi que ses vertus thérapeutiques.

La deuxième partie est conçue en deux autres chapitres, le premier (quatrième chapitre) décrit les méthodes et matériels utilisés pour la réalisation de ce travail. Le deuxième (cinquième chapitre) rassemble tous les résultats de notre étude ainsi que leur interprétation et discussion.

Produced with Wondershare PDFElement

Chapitre I
Le stress oxydatif

Produced with ScanTOPDF

I. Le stress oxydatif

Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années cinquante, **Gerschman. R** puis **Hartman D** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains **Mc Cord** et **Fridovich** isolaient à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant le superoxyde désmutase SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit effectivement des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte a été le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier A. 2003**).

1.1. Définition

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défense antioxydante (**Pincemail J et al.1999**). Lorsque l'un des systèmes protecteurs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme (**Durackova Z. 2008**). (Figure 01). La conséquence des effets nocifs des radicaux libres et des métabolites réactifs de l'oxygène est dite « stress oxydatif ». Selon les points de vue actuels, *le stress oxydant peut être défini comme étant « un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels (Durackova Z. 2008) et à des dégâts cellulaires irréversibles (Abuja P.M et al. 2001, Pincemail J et al.1999) ».*

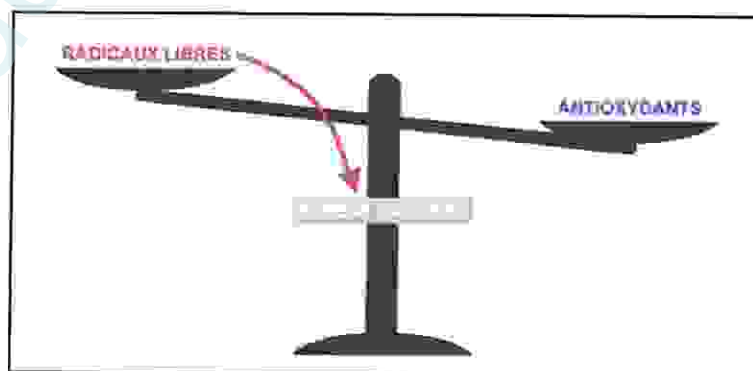


Figure 01 : schéma de la balance anti-oxydante/ pro-oxydante (1)

1.2. Origine du stress oxydatif

La rupture de l'équilibre antioxydant-prooxydant, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. (Favier A. 2003). En effet, le stress oxydatif peut provenir soit :

- ❖ D'une production endogène massive des radicaux libres par activation de macrophages, de polynucléaires, des cellules endothéliales et de la mitochondrie, ou par une exposition à des générateurs environnementaux (soleil, radioactivité, pollution atmosphérique, tabac, alcool, médicaments ...). (figure 02)
- ❖ D'une défaillance du système antioxydant provoquée, d'une part, par un affaiblissement des défenses enzymatiques dû à une carence en cofacteur oligoélément ou à une anomalie génétique ou acquise touchant leurs gènes correspondants. D'une autre part, cette déficience antioxydante peut aussi être causée par une carence en molécules non-enzymatiques antioxydantes surtout celles apportées par la nutrition. (Favier A. 2006).

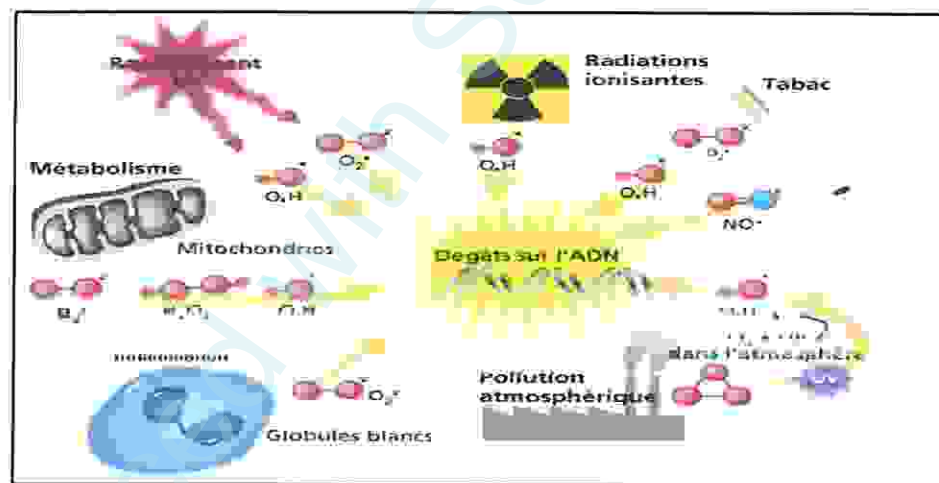


Figure 02 : Les différentes origines du stress oxydatif (2)

II. Les radicaux libres

II. 1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante (Halliwell et Gutteridge, 1989). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèces réactives d'azote ERA). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes

que réductrices. De part leur structure particulière, ils ont tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité (Delattre J 2005).

II. 2. Caractéristiques des radicaux libres

-les radicaux libres sont représentés par $R\cdot$, du fait de leur grande réactivité, ils ont une durée de vie très courte, (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-6} secondes).

-Leur formation est assurée soit par rupture de liaison homolytique soit par transfert d'électron par apport d'énergie.

-La stabilité diffère d'un radical à un autre, les molécules très instables vont vite réagir avec les molécules voisines tandis que les molécules qui ont une instabilité modérée auront tendance à agir loin du site de production et à propager le stress oxydatif. (Ientender J. 2009).

II. 3. Les principaux radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires l'ensemble de composés radicalaires qui dérive de l'oxygène par la réduction à un électron tel que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'hydroxyle (OH^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier A. 2003). Il existe aussi d'autres espèces dérivant de l'oxygène qui ne sont pas des radicaux libres, mais peuvent être des précurseurs de certains radicaux libres tels que l'oxygène singlet $\frac{1}{2} O_2$ le peroxyde d'hydrogène...etc. (Tableau 01) (Delattre J 2005).

Tableau 01 : Principaux radicaux libres rencontrés en biologie (Favier A. 2003).

Espèces dérivé de l'oxygène	Espèces dérivé de l'azote
Anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$	Monoxyde d'azote NO^{\cdot}
Radical hydroxyle OH^{\cdot}	Nitroxyde NOO^{\cdot}
Oxygène singulet $\frac{1}{2} O_2$	Peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	
Radical peroxy ROO^{\cdot}	

II. 3. 1. L'anion superoxyde

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) est relativement stable, peu toxique pour l'organisme. Cette faible réactivité permet d'ailleurs son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Favier A. 2003). Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.



II. 3. 2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule stable, mais diffusable et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production (CordMc.1993). Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries (Nohlet *al.* 2004) par une réaction de dismutation (Ramirez *et al.* 2008).



La dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ spontanée ou catalysée par les superoxydesdismutases est la source majeur de l' H_2O_2 . Ce dernier n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l' H_2O_2 donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO^{\cdot} hautement réactif (Wardman et Candeias .1996).

Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (Halliwell et Gutteridge. 1996).

II. 3. 3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) peut être induit par la réduction de l' H_2O_2 selon la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH^- inoffensif et un radical hydroxyle HO^{\cdot} (Comhair et Erzurum. 2002).



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l' H_2O_2 donne naissance *in vivo* via la réaction de Fenton (représenté en bleu clair dans la figure 03) à un radical hydroxyle HO^{\cdot} hautement réactif (Goldstein *et al.*1994).



Le radical hydroxyle a une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser restreinte, il est capable de réagir très rapidement avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaires. Le radical hydroxyle intervient soit par l'arrachement d'un hydrogène soit par une réaction d'addition. Parmi les ERO le radical hydroxyle est de loin le plus réactif. (Delattre *et al.* 2005).

II. 3. 4. *Le peroxy-nitrite*

Il existe d'autres espèces dites réactives de l'azote qui résultent de la réaction entre le monoxyde NO et l'ion superoxyde l'O₂⁻ comme le peroxy-nitrite (-OONO). (Réaction figure 03) Ceci se fait avec une vitesse réactionnelle cinq fois supérieure à celle de la dismutation de l'ion superoxyde par le superoxyde dismutase. La formation de peroxy-nitrite conduit à la perte de réactivité du NO mais en raison de la très grande réactivité du peroxy-nitrite, ce dernier oxyde de nombreuses molécules dont un des produits les plus stables est la nitrotyrosine.

II. 3.4. *L'acide hypochloreux*

L'H₂O₂ forme l'acide hypochloreux en présence d'ion Cl⁻ cette réaction est catalysée par la myeloperoxydase (MPO) (réaction en vert clair figure 3)

II.3.5. *Oxygène singulet :*

L'oxygène singulet n'est qu'une forme activée de l'oxygène, résultant d'une inversion de spin d'un des électrons de l'orbital externe. Il est responsable de réactions de photosensibilisation. En effet certaines cellules, illuminées à une certaine longueur d'onde, absorbant de l'énergie, passent alors à un état excité, et leur énergie d'activation peut être transférée à des molécules d'oxygène adjacentes (Favier A. 2003).

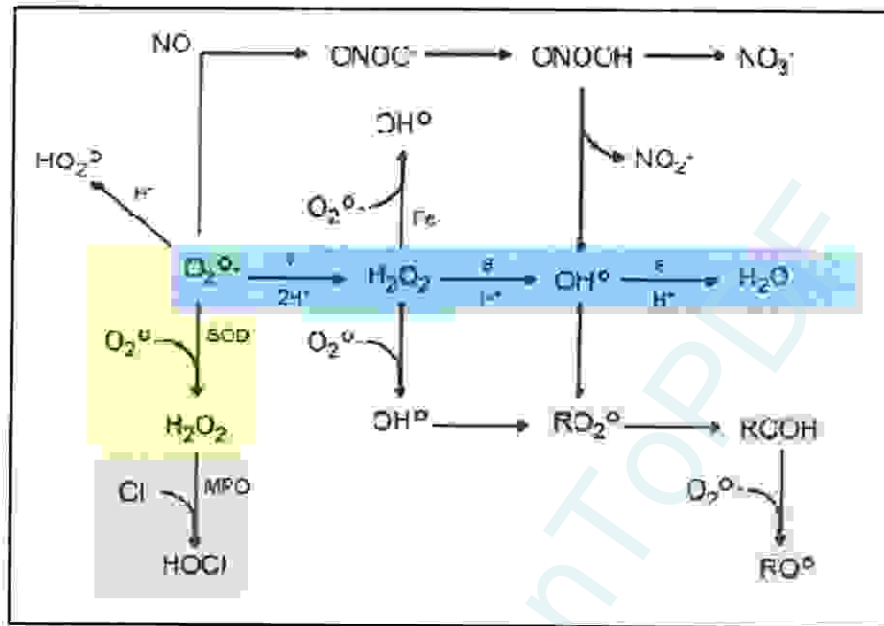


Figure 03 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde. (Koechlin R C. 2006.)

II. 4. Les sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes aussi bien endogènes qu'exogènes.

II.4.1. Sources endogènes

Les systèmes biologiques les plus simples générant des ERO sont les constituants cellulaires capables d'activer l'oxygène moléculaire lors des réactions d'auto-oxydation. Ce groupe comprend, parmi d'autres, des thiols, des hydroquinones, des flavines, des catécholamines, des tetrahydropterines, des hémoprotéines, et des métaux de transition (Maged Y. 1999). Mais la production des ERO dans les cellules mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et découle de plusieurs sources possibles il s'agit principalement de :

➤ La mitochondrie

L'énergie métabolique issue du catabolisme oxydatif est utilisée pour la formation de coenzymes réduits (NADH , H^+) et de flavoprotéines réduites (FADH_2). La chaîne mitochondriale de transport des électrons oxyde ces coenzymes, l'oxydation de ces derniers s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de différents complexes de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'oxygène moléculaire O_2 .

accepteur terminal de la chaîne. La fuite des électrons dans cette chaîne de transport peut intervenir aux niveaux des complexes I et III. (Figure 04)

Cette fuite d'électrons est limitée : moins de 3 % de la production électronique. Mais, compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, la fuite d'électrons d'origine mitochondriale semble être la source majoritaire d'ERO dans la cellule. (Beaudeau J L *et al.* 2006).

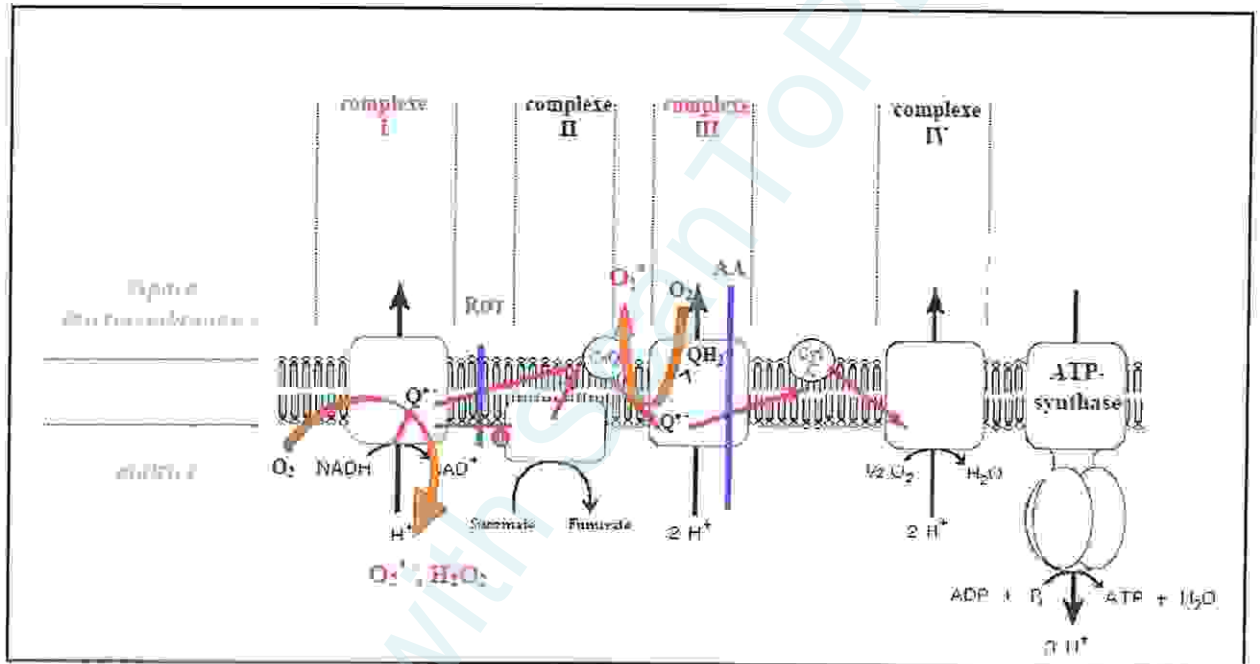


Figure 04 : Fuites d'électrons au cours de la respiration cellulaire (3)

➤ **NAD(P) H oxydase**

NAD(P) H oxydase qui est une enzyme membranaire (Delattre J. 2005) utilisant NAD(P) H comme substrat et génère O₂^{•-} (Salvayre A N *et al.* 2005) selon la réaction suivante :



➤ **La xanthine oxydase/déshydrogénase**

La xanthine oxydase/déshydrogénase peut générer l'O₂^{•-} et le H₂O₂ en utilisant la xanthine ou l'hypoxanthine et NADH comme substrat (Salvayre A N *et al.* 2005)



➤ **Enzymes de la voie de l'acide arachidonique**, les lipoxygénases synthétisant les leucotriènes et les Cyclo-oxygénases synthétisant les prostaglandines et les thromboxanes.

➤ **L'auto oxydation des petites molécules**

Une importante source d'ERO cellulaires est liée à l'auto-oxydation de molécules comme la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'anion superoxyde. L'impact de ces auto-oxydations sur la régulation du stress oxydatif n'est pas encore clairement défini.

➤ **Enzymes des organites cellulaires**

La myéloperoxydase lysosomiale, les cytochromes P450 du réticulum endoplasmique lisse, les cytochromes oxydases et les enzymes des peroxysomes comme la glycolate oxydase et D-aminoacides oxydases...etc. Sont des sources de production de l'anion superoxyde

II. 4. 2. Sources exogènes

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux tels que l'ozone, la pollution diverses, la fumée du tabac, certains médicaments ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (exemple vit C, vit E ;...)(Geronimi 2008). Par ailleurs, les rayonnements sont par différents mécanismes de sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons X ou gamma, ou des rayons ultraviolets (UV) capables de produire l'anion superoxyde ou de l'oxygène singulet (Koechlin, 2006).

Tableau 02: Principales sources endogènes et exogènes des radicaux libres (ERO).

<i>Source endogène</i>	<i>Source exogène</i>
-NADPH oxydase.	-Toxiques environnementaux.
-Chaîne respiratoire mitochondriale.	-Radiations ionisantes.
-Péroxyosomes.	-Radiations UV
-Cytochrome P ₄₅₀ .	-Champs électriques.
-Xanthine oxydase.	-Xénobiotiques prooxydants .
-Cyclo-oxygénases.	-Chimiothérapie.
-Lipo-oxygénases.	-Tabagisme.
-Phagocytose.	- l'alcool.
-Réactions des ions de transition.	-Cytokines pro inflammatoire
-Inflammation	-Ozone.

-Etat d'ischémie-reperfusion. -Atherogénèse. -Hémodialyse. -Exercices intensifs	-Médicaments. -Pollution.
--	------------------------------

II.5. Intérêts physiologiques des radicaux libres

II.5.1. Rôle dans la phagocytose

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'ERO si brutale et intense qu'elle est connue, sous le nom de « Flambée respiratoire », c'est-à-dire explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action des superoxydesdismutases (SOD) et NO synthase (NOS) aboutissent à un mélange très corrosif de H_2O_2 , HO^\bullet , $ONOOH$, avec en plus dans le polynucléaire $HOCl$ et 1O_2 . Ce mélange réactionnel, que l'homme a imité en utilisant comme désinfectant l'eau de javel ou l'eau oxygénée, détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens (Favier A. 2003, Delattre J. 2005).

II.5.2. Rôle dans la communication cellulaire

Les radicaux libres jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. La présence de radicaux libres dans le milieu extracellulaire est à l'origine de l'activation de certains facteurs de transcription par des mécanismes encore mal compris. Il en résulte ensuite l'expression des gènes correspondants (Delattre J. 2005). « Chez *E. coli*, la régulation rédox de la transcription est maintenant bien comprise. Elle passe par deux facteurs de transcription, SoxR (particulièrement sensible à $O_2^{\bullet-}$), et OxyR (particulièrement sensible à H_2O_2) qui ne sont opérationnels que sous leur forme oxydée » « Chez les eucaryotes aucun équivalent simple de ces régulateurs n'a été mis en évidence. Néanmoins, un facteur de transcription murin, activable par H_2O_2 , se lie à la séquence d'ADN reconnue par OxyR. » (Barouki R *et al*).

-Par ailleurs les radicaux libres extracellulaires peuvent interagir avec certains récepteurs membranaires et les activer. Ils sont ensuite à l'origine d'un signal cellulaire. (Delattre J. 2005).

-En outre les radicaux libres peuvent intervenir en tant que second messager intracellulaire. En effet la fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur membranaire est à l'origine d'une succession de réactions conduisant à la genèse d'ERO (Delattre J. 2005).

Cependant, les antioxydants pourraient intervenir dans ces mécanismes et moduler la transmission du signal et l'expression des gènes. Par exemple, en piégeant les radicaux libres, ils coupent court à toute la chaîne de réactions qui conduisait à l'activation de gènes. (Delattre J. 2005).

II.6. Les cibles biologiques des radicaux libres

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de macromolécules biologiques à savoir : l'oxydation de l'ADN, des lipides, des protéines et des glucides.

II.6.1. L'ADN

L'ADN est vulnérable aux dégâts oxydatifs, mais il existe des mécanismes enzymatiques sophistiqués pour réparer les dégâts sur l'ADN. Sans de tels mécanismes, la stabilité génomique serait très faible. La plupart des dégâts oxydatifs sur l'ADN sont ainsi corrigés sans créer de maladies, mais les dégâts sur l'ADN peuvent être utilisés comme marqueurs du stress oxydatif. Ces dégâts peuvent résulter en des cassures de brins, des enchaînements croisés protéines-ADN et des modifications de bases (figure 05). Chacune de ces réactions est potentiellement mutagène et peut bloquer la réplication de l'ADN.

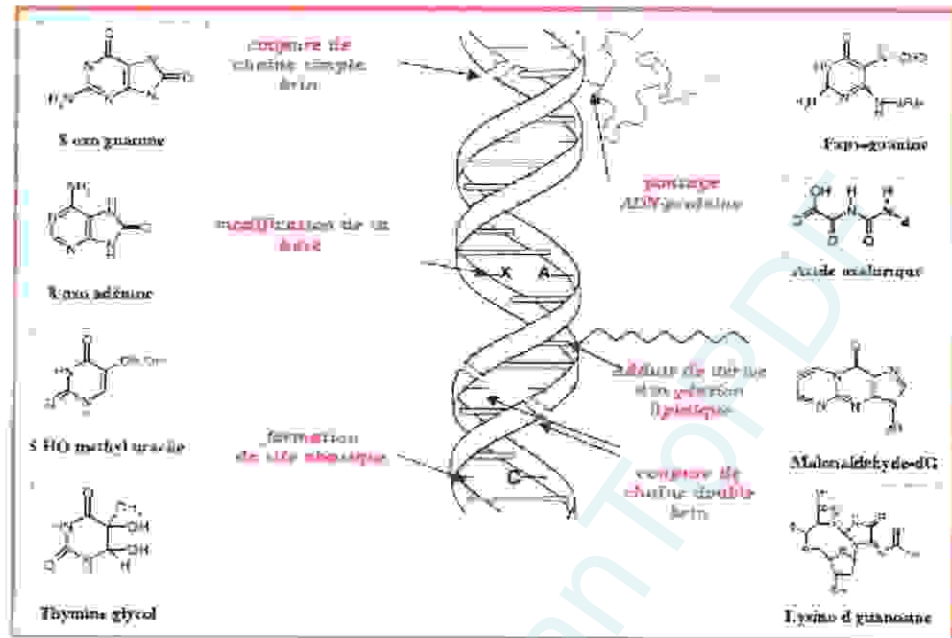


Figure 05 : lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier A, 2003).

II.6.2. Les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle. Cette réaction appelée **peroxydation lipidique** et schématisée dans la **figure 06**, aboutit à des conséquences différentes : l'attaque des lipides circulants aboutissant à la formation de LDL (lipoprotéines de densité légère) oxydées qui, captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux. (Favier A, 2003.).

La peroxydation lipidique représente un enchaînement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : l'initiation, la propagation et la terminaison cet enchaînement donne naissance à un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxyde ($ROO\cdot$) (Esterbauer *et al* 1997). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. Il est généralement admis que chaque radical $R\cdot$ peut être à l'origine d'une centaine de molécules d'hydroperoxyde avant que survienne la phase de terminaison. L'hydroperoxyde

lipidique (ROOH) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE) qui sont considérés comme marqueurs de l'oxydation des lipides.

La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre J. 2005).

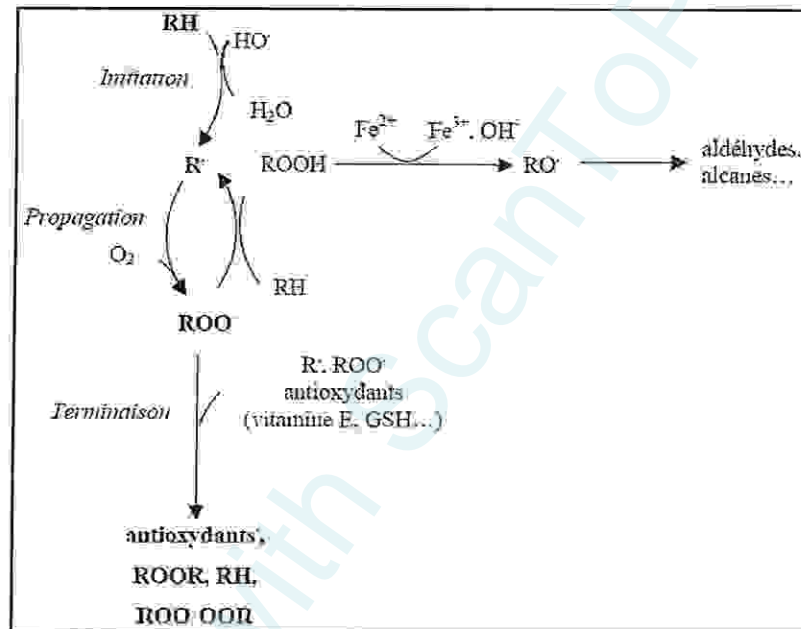


Figure 06 : Schéma des étapes de la peroxydation lipidique (Cillard J. Cillard P. 2006).

II.6.3. Les protéines

La fonction et l'activité des protéines sont profondément affectées par n'importe quelle altération de leur structure complexe – particulièrement l'oxydation. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues particulièrement vulnérables à l'action des protéinases. Dans des conditions d'augmentation du stress oxydatif, les cellules peuvent être incapables d'éliminer l'accumulation des protéines oxydées par protéolyse, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète. (Lean1 M E J, Burns J)

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont :

- La formation de carbonyles protéinés suite à l'attaque, par les ERO, des résidus d'acide aminée histidine, proline, arginine et lysine sont particulièrement prédisposés à cette attaque. (Favier A. 2003)

- La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement. (Favier A. 2003)
 Les carbonyles protéiques et les nitrotyrosines sont tous les deux très stables faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables. (Favier A. 2003)

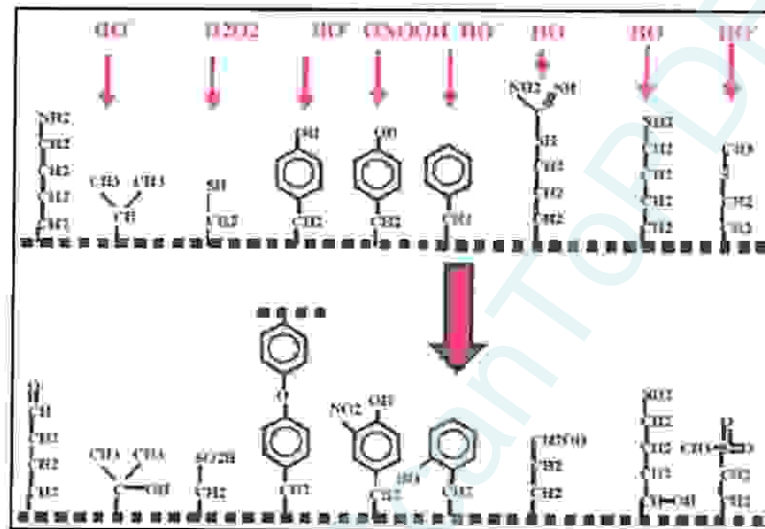


Figure 07 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier A. 2003).

II.6.4. Les glucides

Par auto-oxydation, le glucose produit de grandes quantités d'ERO et de glyoxal. Ce dernier se fixe sur le groupement amine des protéines avec comme conséquence, l'apparition de résidus carboxyméthyl-lysine (protéines âgées) qui ont la capacité de fixer le cuivre et d'induire un processus de peroxydation lipidique, ce qui entraîne une augmentation de la production de glyoxal. Le glucose lui-même peut se combiner à l'hémoglobine pour donner l'hémoglobine glycosylée. Une augmentation de ces marqueurs se trouve bien sur chez des patients souffrant de diabète, pathologie clairement associée à une situation très importante de stress oxydant (kalousova *et al.* 2002).

III. Les maladies liées aux stress oxydatif

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant est le facteur déclenchant originel. C'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), des maladies neurodégénératives (ataxies, SLA, maladie d'Alzheimer). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses

complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (Kalousouva *et al.* 2002).

VI. Le système de défense antioxydant

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des RL. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme «d'antioxydant».

IV.1. Définition

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Abuja P M et Albertini R. 2001), et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire. (Durackova Z. 2008)

IV.2. Caractéristiques des antioxydants

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requiert les propriétés suivantes (Ursini F. 1999, Durackova Z. 2008).

- Il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques.
- Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé.
- L'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante.
- La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

Les antioxydants peuvent jouer leur rôle à différents niveaux du processus oxydatif (Baskin S I *et al.* 1994), en neutralisant les radicaux initiateurs, en liant les ions métallique, en neutralisant les radicaux peroxydes et en éliminant les biomolécules endommagées par oxydation, ainsi que d'autres types de réactions.

IV.3. Classification des systèmes antioxydants

IV.3.1. Les antioxydants enzymatiques (Tableau 03)

IV.3.1.1. Les superoxydesdismutases (SOD)

Les superoxydesdismutases (SOD) (EC : 1.15.1.1) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des anions superoxydes en oxygènes moléculaires et peroxydes d'hydrogènes composés stables et moins toxiques (Comhair et Erzurum, 2001) selon la réaction suivante :



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

IV. 3. 1. 2. La catalase

La catalase (EC : 1.11.1.6) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (pour les cellules qui ne possèdent cette organelle ex ; érythrocytes) (Lindau Sehpard et Shaffer. 1993).

La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :

CAT

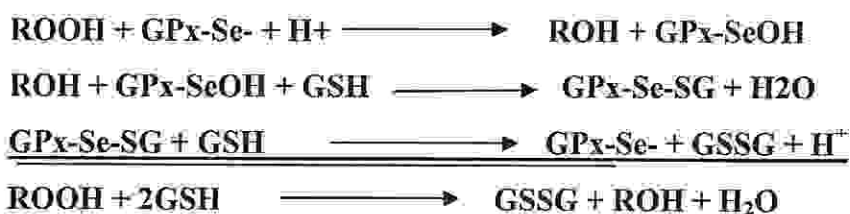


La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de l'enton ne puisse pas s'amplifier (Cantin. 1999).

IV. 3.1.3. Les glutathions peroxydases

Les GPxs constituent une famille d'enzymes possédant un résidu sélénocystéine dans leurs sites actifs et capables de réduire des composés hydroperoxydes en leurs composés hydroxyles correspondants en utilisant du glutathion réduit (GSH) qui sera transformé en glutathion oxydé (GSSG). (Gladyshef *et al.* 1999 , Arthur. 2000).

Jusqu'à présent 5 GPxsélénocystéine ont été identifiées GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 et GPx5 (Comhair et Erzurum. 2001). Toutes ces enzymes fonctionnent selon le même mécanisme catalytique suivant :



L'activité antioxydante de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (Favier A. 2003 , Delattre J *et al.* 2005).

A l'activité séléno-dépendante, il faut ajouter les GSH-S-transférases, protéine sans sélénium, possédant aussi une activité peroxydasique vis-à-vis des peroxydes organiques mais pas vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (Fisher *et al.* 1999).

Tableau 03 : Les enzymes anti-oxydantes (Lee *et al.* 2004).

Enzymes	Fonctions
Superoxydedismutase	Élimination du superoxyde
Catalase	Élimination de l'hydroperoxyde
Glutathion peroxydase	Élimination de l'hydroperoxyde
Glutathion disulfidereductase	Réduction de la glutathione oxydée
Glutathion-S-transferase	Élimination de l'hydroperoxyde lipidique
Méthioninesulfoxydereductase	Réparation des résidus méthionine oxydés
Peroxydase	Décomposition du peroxyde d'hydrogène et du lipide hydroperoxyde

IV.3. 2. Les antioxydants non enzymatiques

IV.3.2.1. Les antioxydants hydrosolubles

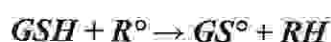
✓ La vitamine C (voir annexes)

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (Delattre *et al.* 2005).

✓ Le glutathion (voir annexes)

Est un constituant intracellulaire ubiquitaire présent à des concentrations millimolaires dans la plupart des cellules et micromolaires dans le plasma (Gerard-Monnier *et*

Chodière, 1996). Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente la très grande majorité du glutathion total (90 à 98%) ; lors d'un stress oxydatif le GSH est oxydé avec la formation de pont disulfure, GSSG, et/ou de pont disulfure mixte, GSSR (R étant fixé à un autre thiol radicalaire) (**Stamler et Slivka, 1996**). Le glutathion agit également comme Co-substrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (**Ravi et al. 2004**).



✓ *L'acide urique (voir annexes)*

L'acide urique constitue le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez les primates. Possédant des propriétés antioxydantes, il peut interagir avec les EOA, et tout particulièrement avec le radical hydroxyle. Il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus efficace en termes de réactivité avec les ERO. (**Durackova Z, 2008**)

✓ *La bilirubine (voir annexes)*

Est capable de piéger des radicaux peroxydes ROO• et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Neuzil et Stocker, 1993**).

VI.3.2.2. Les antioxydants Liposolubles

✓ *La vitamine E (voir annexes)*

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme.

La structure de la vitamine permet de capter les RL :

- dans les zones lipophiles des membranes cellulaires, grâce à sa chaîne phytyle,
- dans les zones hydrophiles, à la surface des membranes plasmiques, grâce à son hydroxyle phénolique. L' α -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation (**Liebler et al. 1986**).

L' α -tocophérol est également un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux. Ainsi transformé, celui-ci ne peut plus réagir avec les fonctions amides des molécules pour donner des nitrosamides.

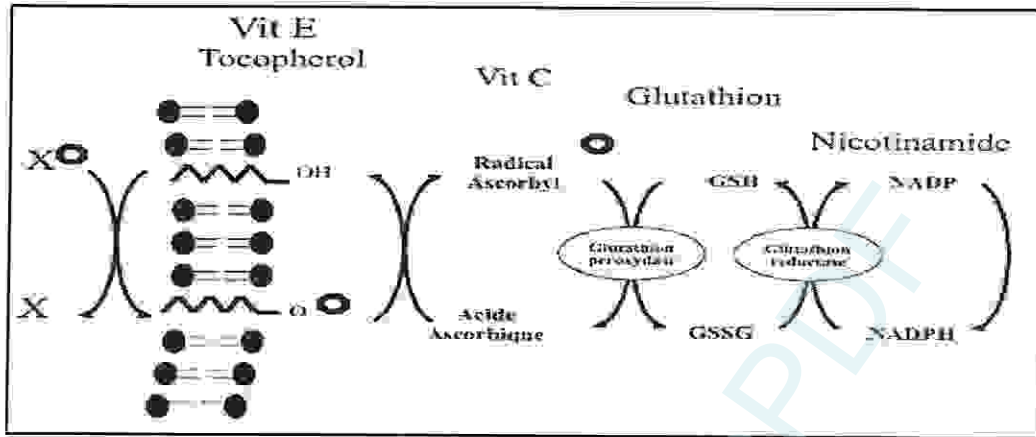


Figure 08 : exemple de réaction antioxydante en chaine mettant en jeu les vitamines E et C(4).

✓ *β -carotène (voir annexes)*

Le β -carotène est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités : il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaine de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Goudable et Favier A. 1997).

✓ *Les acides lipoiques ou thioctiques (voir annexes)*

Ces acides correspondent à une chaine hydrocarbonée (8carbones) dont deux fonctions SH. Comme le glutathion les acides lipoiques sont liés aux protéines. On les trouve dans les extraits de fois, de reins, mais principalement dans la levure. (Delleire J. 2005).

✓ *L'ubiquinone (voir annexes)*

L'ubiquinone ou coenzyme Q_{10} est bien connu pour son rôle vital dans la production d'énergie au niveau de la mitochondrie. Le $Co Q_{10}$, principalement sous sa forme réduite ubiquinol 10 ou $CoQ_{10}H_2$, possède aussi des propriétés anti-oxydantes intéressantes en piégeant des radiauxsuperoxyde et en inhibant l'aperoxydation lipidique (Kehrer J P,1999).

IV.3. 3. 3. Autres molécules antioxydantes

✓ *Les oligo-éléments*

Les oligo-éléments, appelés aussi 'éléments traces' sont des éléments métalliques indispensables à l'organisme, mais en toute petite quantité.

-Le cuivre

Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Toutefois, au même titre que le fer, il joue, en tant que métal dit de transition, un rôle important dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées. Une concentration trop élevée en cuivre pourra donc refléter la présence d'un stress oxydant

-Le sélénium

Le sélénium est nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes telles que les glutathion peroxydases (GPx). On le trouve dans l'eau minérale, dans le lait, les fraises, les tomates, les poissons.

-Le zinc

La prise de zinc conduit a long terme a l'induction de protéines antioxydantes comme les metallothioneines. L'importance du zinc dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. En effet, le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes, précurseurs de la chaîne des radicaux libres, il protège également les groupements thiols des protéines

✓ *Substances bioactives : polyphénols*

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les coumarines, et les phénol. Ce sont des composés que l'on retrouve dans les plantes. Depuis quelques années les polyphénols attirent l'attention des chercheurs à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique et de réduire les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre J. 2005). Dans le chapitre suivant, nous étalerons plus de détail concernant les propriétés antioxydantes des polyphénols.

Chapitre II
Les polyphénols

Produced with ScanTOPDF

I. Généralités

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques issues du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont caractérisés, comme leur nom l'indique, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire (Derbel S et Ghedira K. 2005).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie) et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheix *et al.* 2005).

D'un point de vue appliqué, les polyphénols constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production, ces molécules sont douées de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques expliquant leurs bienfaits sur la santé de l'homme (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Derbel S et Ghedira K. 2005).

II. Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques

- ❖ celle de l'acide shikimique
- ❖ celle issue de l'acétate


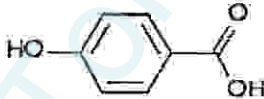
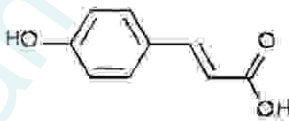
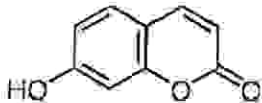
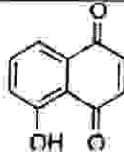
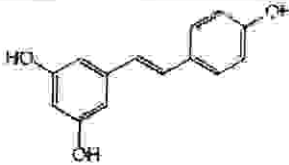
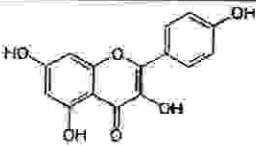
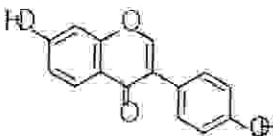
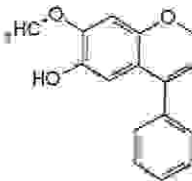
III. Principales classes des composés phénoliques

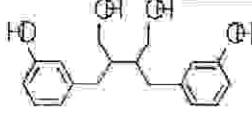

C'est une classe constituée d'environ 8000 composés (Hennebelle *et al.* 2004), divisés en plusieurs catégories qui sont:

- ❖ Les acides et esters phénoliques
- ❖ Les coumarines
- ❖ Les flavonoïdes
- ❖ Les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes
- ❖ Les lignanes qui, avec les iso-flavones, sont nommées phyto- oestrogènes

En se basant sur la structure carbonée de base, Le tableau suivant montre les structures de base de quelques classes des polyphénols.

Tableau 4 : Squelette carbonique de quelques classes des polyphénols (Macheixet *al.* 2006)

COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	<u>Phénols simples</u>	<u>hydroquinone</u>		<u>Busserole</u>
C6-C1	<u>Acides hydroxybenzoïques</u>	<u>acide parahydroxybenzoïque</u>		Epices, fraises
C6-C3	<u>Acides hydroxycinnamiques</u>	<u>acide p-coumarique</u>		Tomates, ail
	<u>Coumarines</u>	<u>Ombelliférone</u>		Carottes, coriandre
C6-C4	<u>Naphtoquinones</u>	<u>Juglon</u>		Noix
C6-C2-C6	<u>Stilbénoides</u>	<u>trans-resvératrol</u>		Raisin
C6-C3-C6	<u>Flavonoïdes</u>	<u>Kaempférol</u>		Fraises
	<u>Isoflavonoïdes</u>	<u>Daidzéine</u>		Graines de soja
	<u>anthocyanes</u>	<u>Dalphinol</u>		<i>Dalbergia sissoo</i>

$(C6-C3)_2$	<u>Lignanes</u>	<u>Entérodiol</u>		Bactéries intestinales
$(C6-C3)_n$	<u>Lignines</u>			Bois, fruits à noyaux
$(C6-C3-C6)_n$	<u>Tanins condensés</u>	<u>Procyanidol</u>		Raisins, kaki

III.1. Les acides phénoliques et les coumarines:

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique (Bruneton J. 1993).

Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces derniers sont des dérivés des molécules non phénoliques qui sont respectivement l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Budic-Leto I *et al.* 2002).

Par ailleurs, les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Ils ont plusieurs activités biologiques parmi lesquelles, l'activité anti-inflammatoire et antivirale. Vue leur toxicité très élevée, les communautés médicales les utilisent avec une grande précaution, c'est pour cela que beaucoup d'études sur les animaux ne peuvent être extrapolées sur les êtres humains, ce qui a limité l'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines (Hoult J R S *et al.* 1996).

Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent, respectivement, aux acides : p-coumarique, caféique et férulique. Signalons, l'umbelliférone et la scopolétine (Bankova V *et al.* 1992) (figure 09).

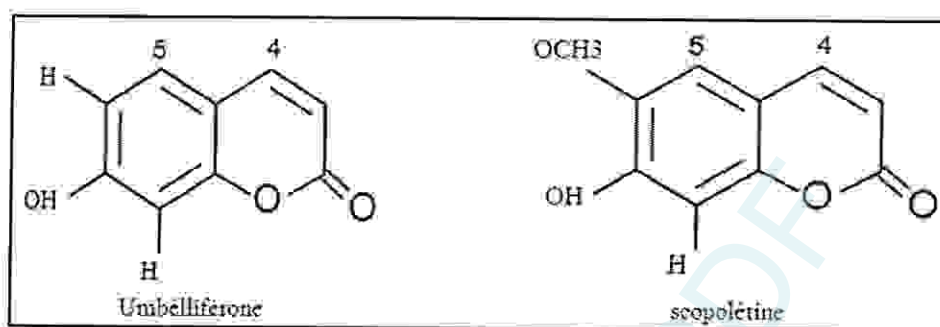


Figure 09 :.Structure chimique de quelques coumarines (5).

III. 2. Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaaliet al. 2004 , Malešev et Kuntić, 2007). L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi en (1938) (Bruneton, 1993).

Par ailleurs, on estime que 2% de l'ensemble du carbone photo-synthétisé par les plantes est transformé en flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

III.2. 1. Structure chimique :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 formant ainsi l'hétérocycle (C) (figure. 10) (Erdman W et al. 2007). L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C.

III.2.2. Classification :

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 (Tableau 05).

De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5' et/ou 6' (**Figure 10**). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés.

Il faut noter aussi que dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme C-ou O-glycosylés. Cependant, les formes libres, sans sucres attachés sont appelés les génines ou flavonoïdes aglycones (**Bruneton, 1999**).

Par ailleurs, les flavonoïdes minoritaires sont représentés par les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les flavanones, les dihydroflavonols et les anthocyanidols (**Harborne, 1993**).

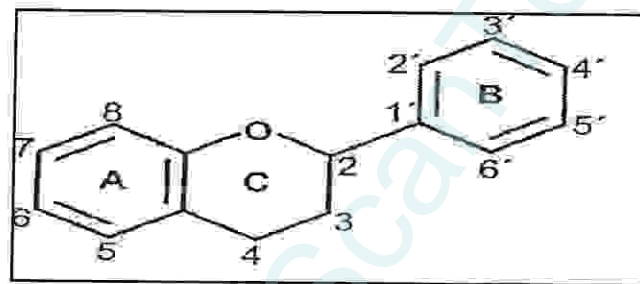


Figure 10 : Structure de base des flavonoïdes (**Dacosta, 2003**).

Tableau 05 : Nomenclature des sous-classes des flavonoïdes (Rajnarayana K *et al.* 2001)

	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Flavonols:							
Kaempferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Morin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Rutin	O-R ^a	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Quercetin	OH ^b	OH	OH	H	OH	OH	H
Quercetrin	O-Rh	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricitrin	O-Rh	OH	OH	H	OH	OH	OH
Spirenoside	OH	OH	OH	H	OH	O-Glu	H
Galangin	OH	OH	OH	H	H	H	H
Robinin	O-R ^c	OH	OH	H	H	OH	H
Kaempferide	OH	OH	OH	H	H	O-Me	H
Fisetin	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Rhamnetin	OH	OH	O-Me	H	OH	OH	H
Flavonones:							
Hesperitin	H	OH	OH	H	OH	O-Me	H
Naringin	H	OH	O-R	H	H	OH	H
Naringenin	H	OH	OH	H	H	OH	H
Eriodictyol	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Hesperidin	H	OH	O-Me	H	OH	O-Me	H
Pinocembrin	H	OH	OH	H	H	H	H
Likvirutin	H	H	OH	H	H	O-Glu	H
Flavones:							
Rpofolin	H	OH	O-R	H	H	OH	H
Apigenin	H	OH	OH	H	H	OH	H
Tangeretin	H	O-Me	O-Me	H	H	O-Me	H
Flavone	H	H	H	H	H	H	H
Baicalin	H	OH	OH	H	H	H	H
Luteolin	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Chrysin	H	OH	OH	H	H	H	H
Techtochrysin	H	OH	O-Me	H	H	H	H
Diosmetin	H	OH	OH	H	OH	O-Me	H
Diosmin	H	OH	O-R ^d	H	OH	O-Me	H
Flavanols:							
Silibinin	OH	OH	OH	H	H	O-L-O-	H
Silymarin	OH	OH	OH	H	H	O-L-O-	H
Taxifolin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Pinobanksin	OH	OH	OH	H	H	H	H
Flavan-3-ols:							
Catechin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Isoflavones:							
Genistein	-	OH	OH	H	H	OH	H
Daidzin	-	H	O-Glu	H	H	OH	H

-O-Me = Methoxy

-O-Glu = Glucosyl

-O-R^a = Alkoxy

-O-L-O- = Serane

III. 2. 3. Distribution :

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les légumes feuilles (salade, chou, épinard, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. La distribution des différentes familles de flavonoïdes chez les végétaux est représentée dans le tableau (tableau 06).

Tableau 06 : Distribution des principales classes des flavonoïdes (Erdman W *et al.* 2007)

Famille	Molécules principales	Distribution
Flavone	apigénine, lutéoline, chrysine	pomme, céleri, grains de céréale, (teneur = 5-100 mg/kg) herbes aromatiques (persil, romarin, thym), propolis, miel, <i>Petroselinumsativum</i> , <i>Apium graveolens</i> ...
Flavanone	hespéritine, naringine, taxifoline et pinocembrin	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) propolis, <i>eucalyptus globulus</i>
Flavonol	quercétine, myricétine, galangin et kaempférol	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir, ... (teneur = 56-250 mg/kg), propolis <i>Sophora japonica</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Vitisvinifera</i>
Isoflavones	genistéine et daïdzéine	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg) <i>Puerarialabata</i> , <i>stellaria</i>

		media
flavan-3-ols	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) Vitisvinifera
Anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

III. 2. 4. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Middleton E. 2000).

Les composés de départ de la biosynthèse des flavonoïdes sont le malonylCoA et les dérivés CoA de l'acide cinnamique, le cinnamoylCoA (Gerhard. 1993). Ces composés sont formés suite à deux voies complémentaires : voie acétate malonate et voie shikimate (Hollman et al. 1999, Middleton E. 2000)

La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C3 qui formera le cycle oxygéné C de la structure de base des flavonoïdes. Les précurseurs de cette voie sont l'érythrose 4-phosphate de la voie des pentoses et le PEP résultant de la glycolyse (Marfak. 2003).

D'autre part, la voie acétate-malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. Ce système aromatique est formé par condensation répétée d'unités d'acétate (Gerhard. 1993).

Ces deux voies sont alors condensées pour engendrer un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone avec la catalyse de la chalcone-synthase (Middleton E. 2000).

Ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes des flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques (figure 11). Des réactions post-biosynthétiques sont enfin effectuées pour donner la structure finale aux flavonoïdes telles que la glycosylation, l'acylation. (Marfak. 2003). Il existe cependant des flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine (figure 11) (Bruneton. 1993, Remesy et al. 1996, Middleton E. 2000).

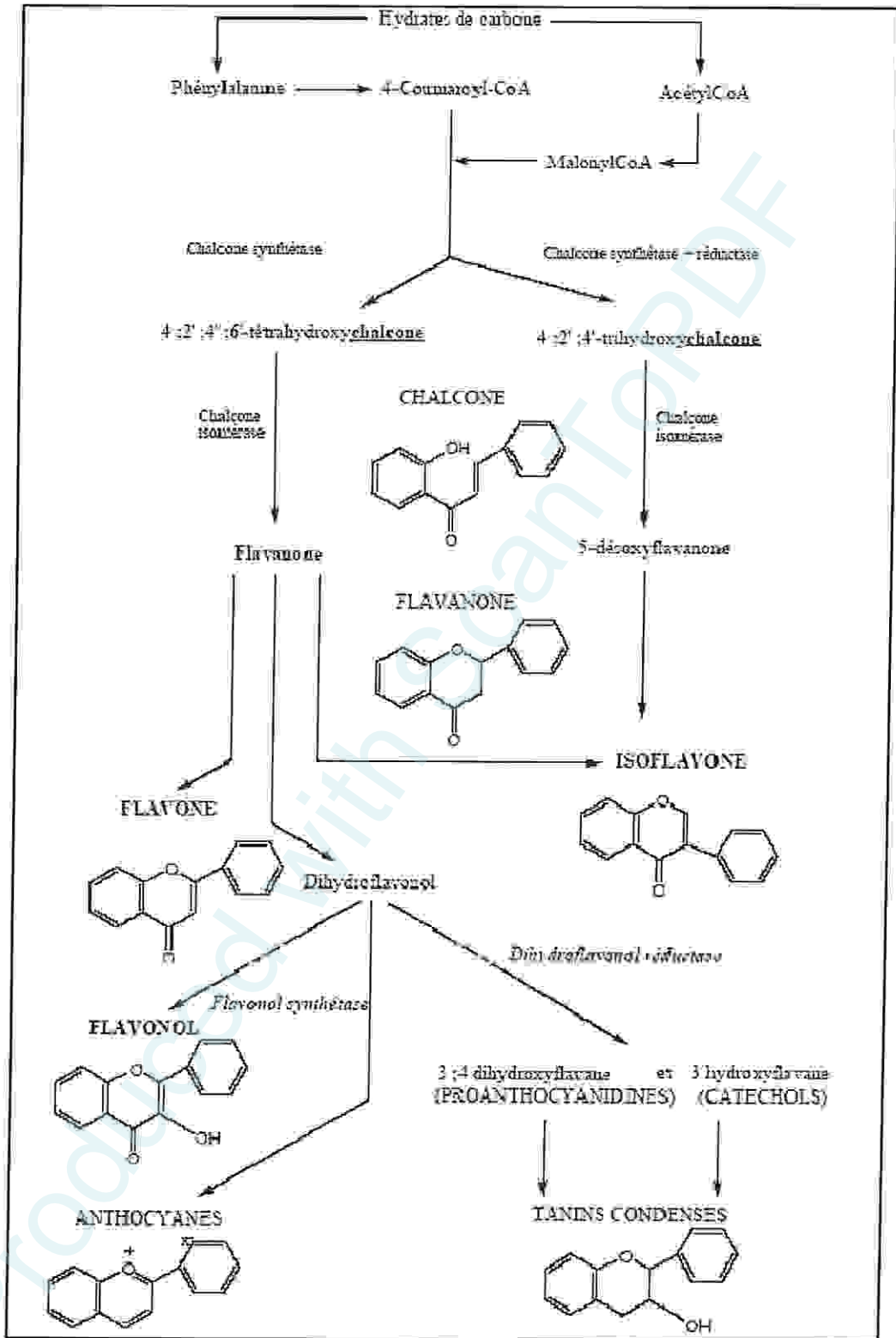


Figure 11 : Voies de biosynthèse des flavonoïdes (Milane, 2004).

III.2.5. Activités biologiques des flavonoïdes et des polyphénols

III.2.5.1. Propriétés antioxydantes et piègeuses de radicaux libres

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres (Ghedira K. 2005): radicaux hydroxyles (OH^\bullet), anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à la présence du cycle B dihydroxylé (Figure 12 en jaune) pouvant céder des électrons aux radicaux libres. On note aussi la présence de la liaison insaturée entre C2 et C3 (en rouge) ainsi que la fonction 4-oxo- sur le cycle C (en vert) et autre groupements fonctionnels (en bleu) capables de chélater les ions métalliques (Cu, Fe) qui peuvent renforcer les effets délétères des radicaux libres(Williams R *et al.* 2004).

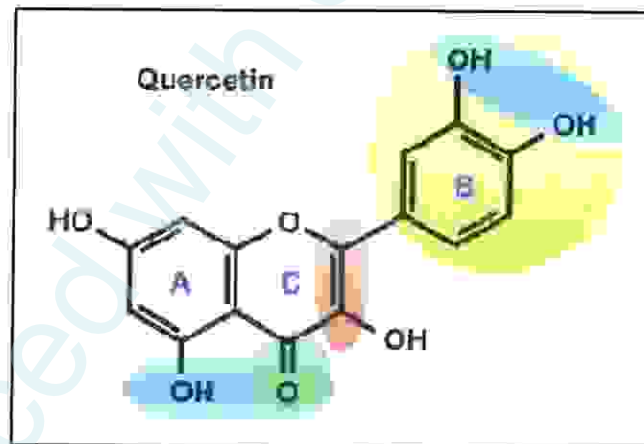


Figure 12 : Représentation des groupements piègeurs des flavonoïdes Exemples de la quercétine(Williams R *et al.* 2004).

III.2.5.2. Propriétés antibactériennes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Les flavonoïdes sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire, cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire(Ghedira K. 2005).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour

inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

III.2.5.3. Autres propriétés biologiques

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Cela peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Ghedira K, 2005).

Les flavonoïdes ainsi que l'ensemble des polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL, d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, d'empêcher l'agrégation plaquettaire, de stabiliser les cellules immunitaires et de promouvoir le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires. Ils ont ainsi été décrits comme étant des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques, des anti-hépatotoxiques, des anti-ulcérogène, des antiviraux et des anti-tumoraux (Narayana K *et al.* 2001, Di Carlo *et al.* 1999) (Figure 13).

Leurs propriétés sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, l'adénylatecyclase, les ATPases, les cyclo-oxygénases (COX), les NOS ou le cytochrome P450 et agir sur différents types cellulaires (les cellules musculaires lisses ou cardiaques, nerveuses ou diverses cellules tumorales) (Ghedira K, 2005).

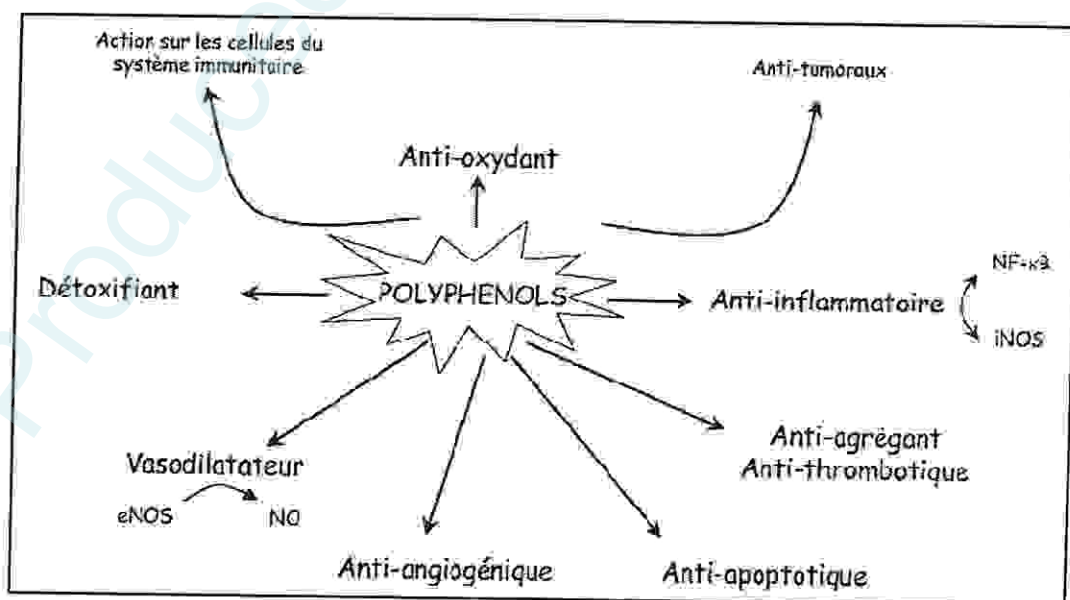


Figure 13 : Effets biologiques des polyphénols (Martin S *et al.* 2002).

De nos jours l'utilisation des substances bioactives d'origine végétale, plus précisément les polyphénols, devient une intéressante alternative de la thérapie médicamenteuse et suscite de plus en plus l'intérêt des chercheurs et des cliniciens vis-à-vis de la prévention ou même du traitement de nombreuses pathologies. À titre d'exemple, la propolis qui représente une composante clé de l'apithérapie (l'usage médical de ces produits de la ruche) est une substance végétale modifiée par l'abeille qui est très riche en flavonoïdes comme la pinocembrine, la chrysin, la quercétine, l'acacétine et la galangine.

Ces flavonoïdes confèrent à la propolis des propriétés antioxydante, antibactérienne, anti-cancéreuse et autres faisant de la propolis l'objet de plusieurs études scientifiques qui restent toutefois encore trop peu nombreuses ou incomplètes (Lahouel ML 2005).

Chapitre III
La Propolis

Produced with Scantopdf

Un important travail de recherche sur la propolis a été fait dans les années 70 par l'apiculteur Lund Aagaard. Après s'être guéri d'une angine avec cette substance, il se lança dans une étude empirique. Suite à 16 000 expériences effectuées à travers la Scandinavie, il constata les effets bénéfiques de la propolis dans le traitement des infections de la bouche, de la gorge, du nez, des sinus et autres malaises affectant la tête après contamination par des virus ou des bactéries. La propolis se révéla alors un remède efficace contre plusieurs infections.

III. 1. Définition

La propolis est un mastic végétal, fabriqué par les abeilles à partir de résines récoltées sur les écorces et les bourgeons de certains arbres et de plantes balsamiques. Les abeilles les apportent à la ruche, les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (Alexandare F .1984, Alin C. 1996).

III. 2. Historique de la propolis

Le mot propolis est d'origine grecque et il signifie : "Pro" - devant et "polis" - cité, en se référant aux observations des apiculteurs qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche "devant la cité» (Jean M P. 1996).

En Égypte, la propolis servait à l'embaumement. Elle était également connue des Grecs anciens puisque Aristote la présentait, dans son *Histoire des animaux*, comme un « remède aux affections de la peau, plaies et suppurations ». Elle connut un regain de popularité au XIX^e siècle lorsque les médecins de l'armée anglaise l'employèrent pour désinfecter les blessures et faciliter leur cicatrisation durant la Guerre des Boers en Afrique du Sud.

Une utilisation non médicale de la propolis est aussi le vernis, dont les violons de Stradivarius ont été induit pour donner un meilleur son et de les protéger contre le ver de bois.

III. 3. L'origine de la propolis

La propolis a deux origines

❖ Origine interne

Selon **Kustenmacher**, la propolis est un résidu issu de la première phase de digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen appelé le gésier à pollen. La propolis serait ensuite régurgitée par l'abeille.

❖ Origine externe

Beaucoup d'arbres fournissent la propolis aux abeilles, celles-ci trouvent quelques ingrédients de cette substance sur les bourgeons principalement. Dans des régions, les arbres suivants sont visités par les abeilles pour y recueillir ces précieuses substances : pin, épicéa, aulne, saule, marronnier d'Inde, bouleau, prunier, frêne, chêne, peuplier, etc.

III. 4. L'utilisation de la propolis dans la ruche

La propolis est un produit multi-usage dans la vie de la ruche :

- ❖ La propolis sert à colmater les petites fissures de la ruche pour la rendre bien homogène et assurer ainsi une meilleure isolation thermique de la ruche.
- ❖ La propolis sert à diminuer le trou de vol (l'entrée de la ruche), notamment en hiver pour que l'air froid ne pénètre pas trop à l'intérieur de la ruche.
- ❖ Pour réparer les alvéoles ou tout ce qui peut se dégrader à l'intérieur de la ruche. La propolis est alors utilisée comme une sorte de mortier.
- ❖ Pour vernir l'intérieur de la ruche. Cela a une double utilité, la propolis va permettre d'éviter les aspérités à l'intérieur de la ruche mais cela va surtout permettre de réaliser une sorte de barrière de désinfection, pour éviter que ne se développent les bactéries à l'intérieur de la ruche.
- ❖ Et l'utilisation la plus surprenante de la propolis par les abeilles est l'embaumement des insectes ou des petits animaux qui sont rentrés dans la ruche. Les abeilles ne peuvent en effet pas les transporter pour les faire sortir. L'embaumement à la propolis et à la cire permet ainsi d'éviter la putréfaction de l'intrus et les dangers microbiens qui y sont liés.

III. 5. Récolte de la propolis

La récolte de la propolis s'effectue d'abord par les abeilles et ensuite par l'homme.

Concernant la récolte effectuée par l'homme, elle se fait de deux manières :

- en raclant et grattant les cadres ou les parois de la ruche, dans ce cas la récolte de propolis a lieu en période froide où la propolis est dure et friable, facilitant son détachement. Mais ce procédé ne permet pas de récolter une propolis de bonne qualité.
- en utilisant une grille moulée en plastique ou en acier inoxydable dont les abeilles bouchent les orifices avec la propolis qui est de meilleure qualité (Debyser E. 1984 F) (figure 14).



Figure 14 : Récolte de la propolis (6).

III. 6. Propriétés physique de la propolis

La propolis est une substance de consistance variable suivant la température, elle est dure et friable à 15°C, molle et malléable à 30°C et collante et gluante entre 30 et 60°C, son point de fusion se situe autour de 70°C (Alin C.1996).

Par ailleurs, quand la propolis est chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties :

- une partie visqueuse qui tombe au fond du récipient.
- une partie liquide appelée cire de propolis qui reste en surface et qui trouve de nombreux usages dans le domaine apicole.

Concernant sa solubilité, la propolis est insoluble dans l'eau mais soluble de façon partielle dans l'alcool, l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloroéthylène, etc. Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Raoul A.1992).

Quant à la couleur de la propolis, elle est très variable suivant sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir en passant par toute la gamme des bruns. Sa saveur est souvent amère et âcre et son odeur variable suivant son origine ; en général son arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Si elle est brûlée, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (Alin C. 1996).

III. 7. Composition chimique de la propolis

Cette composition est très complexe avec presque 150 constituants différents. Toutefois, elle peut fortement varier d'un type de propolis à un autre.

Ainsi, elle contiendrait 50 à 55% de résines et de baumes, 20 à 35% de cires végétales ou de cire d'abeille, 5 à 10% d'huiles essentielles (anéthol et eugénoïl notamment), 5% de pollen et 5% d'autres substances diverses d'origine organique ou minérale (Alphandery R. 2002).

La propolis est constituée aussi de plus de 40 flavonoïdes : flavones (apigénine, chysine, lutéoline), flavonols (la quercétine, le kaempférol, galangine), Les flavanones (naringénine, taxifoline) et les flavanols (catéchine, chalcones), des composés phénoliques (acide coumarique, acide acétylsalicylique), des aldéhydes aromatiques (vanilline, isovanilline), des composés terpéniques, des acides gras aliphatiques (acide oléique et stéarique), des sucres, des acides aminés (arginine, proline), des oligo-éléments (fer, cuivre, manganèse), des vitamines (vitamine A et vitamines du groupe B) (Darrigol J L. 1979).

III. 8. Les propriétés pharmacologiques de la propolis

❖ Propriété antioxydante

Cette propriété est liée aux polyphénols et aux flavonoïdes pour lesquels il a été démontré qu'ils étaient capables de casser les réactions en chaînes sur les lipides, d'inhiber les réactions de chimioluminescences et de piéger les certains ERO. Les nombreux oligoéléments et minéraux de la Propolis favorisent également l'action antioxydante. (Marquele F D et al. 2005).

❖ Activité antimicrobienne

A cause de ses activités antimicrobiennes, la propolis est souvent nommée "antibiotique naturel". En effet, Les composés de la propolis qui démontrent l'activité antibactérienne sont la pinocembrine, galangine, acide caféique, et l'acide férulique. Elle a une action essentiellement par l'inhibition de la division cellulaire ce qui provoque l'arrêt de la croissance et de la progression des germes. D'autres mécanismes entrent en jeu, comme la désorganisation du cytoplasme (Martini M C et Seiller. 2006).

Par ailleurs, l'activité antifongique est démontrée par la présence des substances comme pinocembrine, pinobanksine, l'acide caféique, ester benzylique, sakuranétine, et le ptérosilbène. La propolis empêche le développement des fameux *Candida albicans*, responsables des candidoses.

Concernant l'*activité antivirale* de la propolis, elle est due à la présence de l'acide caféique, du lutéoline, et de la quercétine (Schmidt et Buchman. 1992), la propolis a une action sur certains virus, notamment les virus grippaux

❖ *Propriétés anticancéreuses*

Les propriétés anti-carcinogènes de la propolis ont été démontrées par de nombreuses études sur l'animal. Elles sont dues aux flavonoïdes et a un dérivé de l'acidecaféique identifié comme étant un inhibiteur tumoral.

Elle contient également, des agents cytotoxiques spécifiques des cellules cancéreuses comme l'Artepilline C et le diterpénoïde du Clerodane, ce dernier ayant prouvé son action dans le traitement du cancer de l'utérus, de par son action antivirale, et dans le cancer du foie (Dandiya P. 1991).

❖ *Propriété cardiovasculaire*

Les concentrations importantes de l'extrait de la propolis diminuent la tension sanguine et produisent un effet sédatif en maintenant le niveau du sérum de glucose dans le sang (Kedziaet al. 1986). Les dihydroflavonoïdes, contenus dans la propolis renforcent les capillaires (Roger, 1988) et produisent une activité anti-hyperlipidique (Choi S H. 1991).

❖ *Propriété cicatrisante*

La Propolis entraîne la stimulation des processus de régénération tissulaire et de cicatrisation. La propolis joue un rôle nutritif notable dans l'intégrité cutanée. Cette propriété est en partie, due à la présence d'acides aminés tels l'arginine et la proline, dont on connaît le rôle dans le processus de régénération de la peau. Ils permettent d'augmenter la synthèse du collagène et est ainsi accélérer la réparation de l'épiderme abîmé. (Martini M C et Seiller. 2006)

Propriété anesthésique

La propolis possède une action anesthésiante, ceci grâce à l'activité des huiles volatiles de celle-ci. Cette action n'est pas issue d'un mécanisme central comme la morphine et n'a pas d'effets indésirables comme la cocaïne (collapsus, malaises...) (Banc M. 2010).

❖ *Propriétés immunitaires*

La propolis démontre une très grande activité immunitaire sur certains virus (Manolova et al. 1987). Comme elle active les cellules immunitaires qui commencent à produire les cytokines et elle empêche le développement de cellules tumorales.

❖ *Propriétés anti-inflammatoire*

L'action anti-inflammatoire de la propolis se fait par la stimulation des macrophages, par l'inhibition de l'agrégation des plaquettes ainsi que par l'inhibition de la synthèse des eicosanoïdes (Castaldo *et al.*, 2002).

❖ *Autres propriétés*

Beaucoup d'autres propriétés biologiques et pharmacologiques des propolis ont été décrites par divers auteurs, y compris la régénération des tissus, l'activité hépatoprotective, l'action immuno-modulatrice, etc. (Marcuci M.1995).

Produced with ScanTOPDF

Chapitre IV
Matériels et Méthodes

Notre étude expérimentale a été effectuée en partie, au sein du laboratoire d'analyses médicales, Etablissement Hospitalier d'Ibn Zohr de Guelma. La suite de travail s'est déroulée au niveau des Laboratoires de Biochimie et de Microbiologie, Université 08 mai 1945 de Guelma.

I. Produits et réactifs utilisés

Afin d'étudier l'effet antioxydant et antibactérien des flavonoïdes de la propolis, nous avons utilisé les produits et réactifs suivants :

-Extrait éthanolique de la propolis (EEP) dont le procédé d'extraction est détaillé ci-dessous et qui nous a été fourni gracieusement par le laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Université de Jijel.

-Deux sortes de propolis commerciales, l'une fabriquée en Algérie (PCA) et existe sous forme de poudre. L'autre, étant liquide, est d'origine française (PCF).

-La Quercétine est un flavonoïde de référence (poudre jaune $C_{15}H_{10}O_7$; M : 302.235)

-La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant de référence.

-Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; M : 394.32) est un radical libre stable.

-Autres produits chimiques

Produits chimiques : Le méthanol (MeOH), le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), Acétate d'éthyle, $BaCl_2$ dihydraté, H_2SO_4 , NaCl (0,9 %),

Milieux de culture

Bouillon nutritif, gélose nutritive, gélose de Muller Hinton, gélose de Chapman.

II.Extraction de la propolis

La propolis provient de l'Est Algérien, wilaya de Jijel.

L'extraction des substances bioactives contenues dans la propolis est réalisée dans l'éthanol et le méthanol. Cent grammes de propolis brute sont coupés en petits morceaux puis additionnés de neuf volumes (900 ml) d'éthanol à 95 % puis laissée pour macération pendant 15 jours avec agitation de temps en temps.

Après filtration sur du coton, le filtrat est évaporé à 79 °C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporator E100). Le résidu est repris dans le méthanol à 70 % et laissé à macération pendant une nuit. Après évaporation du solvant à l'évaporateur, l'extrait obtenu est appelé : extrait éthanolique ou extrait brut de la propolis EEP. (Lahouel M *et al.* 2004).

III. Mise en évidence des flavonoïdes

III. 1. Principe

Afin de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans nos échantillons de la propolis, un test simple et rapide a été effectué en réalisant une chromatographie analytique sur couche mince de silice et en la pulvérisant par une solution éthanolique de chlorure d'aluminium AlCl_3 (1%).

III. 2. Mode opératoire

III. 2. 1. Préparation de la phase stationnaire

La chromatographie a été réalisée sur des plaques en aluminium pré-étalées de gel de silice.

III. 2. 2. Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants organiques acétate d'éthyle/méthanol/eau (100/13,5/10).

III. 2. 3. Dépôt des échantillons

Le dépôt de la quercétine et des trois échantillons de propolis en solutions méthanoliques se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique. Plusieurs dépôts successifs du même échantillon peuvent être faits afin de concentrer l'analyte.

III. 2. 4. Développement des plaques

La plaque est déposée en position verticale dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant choisl, les échantillons a etudier seront plus ou moins entraînés par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

III. 2. 5. Révélation

La révélation se fait par une méthode chimique qui consiste à pulvériser le chromatogramme par une solution éthanolique de chlorure d'aluminium (1%) (1g d' AlCl_3 dans 100 ml d'éthanol). Cette dernière va réagir avec les flavonoïdes contenus dans les échantillons donnant un produit coloré en jaune.

IV- Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes de L'EEP, de la PCA et de la PCF ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium. (Bahorun et al. 1996) qui consiste à ajouter 1ml de la solution méthanolique de l'échantillon (à concentration de 1mg/ml pour l'EEP et la PCA et à une dilution de la PCF par le méthanol) à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 2 % (2g dans 100 ml méthanol).

Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance a été lue à 430 nm après 10 minutes d'incubation. (voir annexes).

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) réalisée par la quercétine à différentes concentrations (**tableau 07**) et pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligrammes équivalents de quercétine /mg de poids sec de l'échantillon, pour l'EEP et la PCA et en mg de la quercétine/ml de la PCF.

Tableau 07 : Concentration méthanoliques de la quercétine de la courbe d'étalonnage

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀
Concentrations	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
Quercétine(µg/ml)										

V. Evaluation de l'activité antioxydante de la propolis *in vitro*

V. 1. Principe

La capacité des différents types de propolis à piéger les radicaux libres est déterminée par la méthode colorimétrique de **Koleva et al (2002)**. Ce test, simple et rapide, utilise le radical libre le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) (C₁₈H₁₂N₅O₆[•] ; M : 394.32) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée, cette dernière devient jaune pâle à l'état réduit du radical (**Figure 15**). Ce changement de couleur est traduit par une décroissance de l'absorbance du radical DPPH[•] à 517-520 nm.

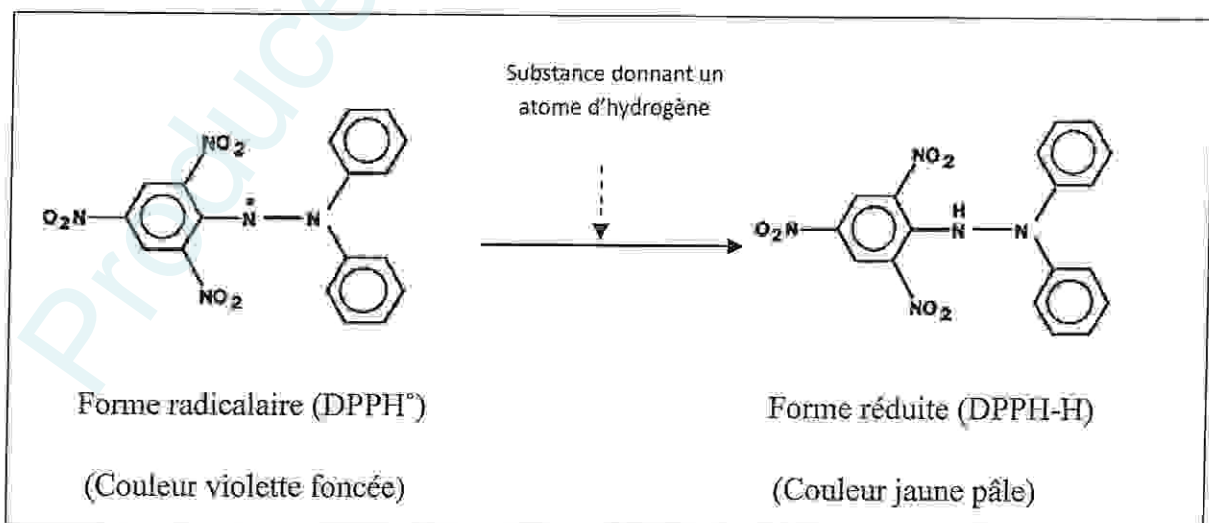


Figure 15 : Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux P.2004).

V. 2. Réalisation de l'essai

Des dilutions des solutions de l'EEP et de la PCA ont été préparées à partir d'une solution méthanolique mère de concentration égale à 5mg/ml ($C_8 = 5 \text{ mg/ml}$). Quant à la PCF qui existe sous forme de liquide, des dilutions par le méthanol ont été réalisées (v/v)

Les deux **tableaux 08 et 09** résument toutes les dilutions faites à partir des trois échantillons de propolis, de la quercétine et de la vitamine C, ces deux derniers sont utilisés comme antioxydant de référence.

Tableau 08 : Concentrations des dilutions de la Vit C, de la Quercétine, de l'EEP et de la PCA (m/v).

	Vit C	Quercétine	(EEP)	(PCA)
Concentration 01	0.1	0.1	0.1	0.1
Concentration 02	0.125	0.125	0.125	0.125
Concentration 03	0.25	0.25	0.25	0.25
Concentration 04	0.5	0.5	0.5	0.5
Concentration 05	0.75	0.75	0.75	0.75
Concentration 06	0.1	0.1	0.1	0.1
Concentration 07	2.5	2.5	2.5	2.5
Concentration 08	5	5	5	5

Tableau 09 : Concentrations des dilutions méthanoliques de la PCF (V/V).

	Propolis Française(PCF) commercial
Concentration 01	1/10 ⁴
Concentration 02	1/10 ³
Concentration 03	1/10 ²
Concentration 04	1/10
Concentration 05	1/8
Concentration 06	1/4
Concentration 07	1/2
Concentration 08	1

A chaque volume de 1.5ml de la solution méthanolique du DPPH°, un volume de 15 µl de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 min, les densités optiques des mélanges réactionnels sont mesurées par le spectrophotomètre (ANADEO 458) à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol. (voir annexes).

L'activité antioxydante est comparée à celle d'un antioxydant standard vitamine C et à celle d'un flavonoïde commercial de référence, la quercétine. (Ahmed G et al. 2001).

V. 3. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH° de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH° et donnés selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100 \text{ (Yen G.C et Duh P.D., 1994)}$$

A_a et A_b sont les valeurs de l'absorbance de l'échantillon et du blanc respectivement à 517 nm. Les résultats sont exprimés par la moyenne de deux mesures \pm écart type.

VI. Evaluation de l'activité antibactérienne de la propolis

VI. 1. Support bactérien testé

Afin d'étudier l'effet antibactérien de la propolis avec ses variétés, quatre souches bactériennes de référence ont été utilisées à savoir :

Trois souches Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603.

Une souche Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

VI. 2. Test de sensibilité des bactéries vis-à-vis de la propolis

Le test de sensibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par (Dulger et Gonuz, 2004, Parekh et Chanda, 2007, Rota et al. 2008). Il a été réalisé selon les étapes suivantes :

VI. 2. 1. Préparation des milieux de culture

La gélose de Mueller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément

dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

VI. 2. 1. Préparation de la solution de Mc Farland

Afin de contrôler l'inoculum utilisé un étalon 0,5 Mc Farland a été préparé en versant 0,5ml d'une solution de Ba Cl₂déshydraté à 1% (10 g/l), dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100 ml avec du H₂SO₄ à 1% (10 ml/l). Ainsi préparé, il doit avoir une D.O. de 0,08 à 0.1 lue à 625 nm.

La solution est aliquotée en volumes de 10ml, dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la de préparation de l'inoculum, les tubes sont ensuite scellés et conservés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le tube étalon doit être homogénéisé avant de le comparer à l'inoculum préparé qui doit avoir la même densité que l'étalon.

VI. 2. 3. Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

VI. 2. 4. Préparation de l'inoculum

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile (0.9%), son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland (DO = 0.08 à 0.1 lue à 625 nm). L'inoculum peut être ajusté en ajoutant ; soit de la culture s'il est trop fort soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop faible.

NB : L'ensemencement doit se faire dans les 15minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

VI. 2. 5. Préparation des disques

Des disques de papier filtre de 5 à 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de 50 µl de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif. Des disques des antibiotiques sont également utilisés comme contrôle positif. (Amikacin 10µg, Cefotaxime 30µg, Imipenème 10µg).

VI. 2. 6. Ensemencement

Des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C.

VI. 3. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide. Il s'agit d'une application des dilutions progressivement géométrique de raison 2. Il s'agit de préparer une gamme allant de 0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16,32 jusqu'à 0.0625 mg/ml (concentrations massiques) pour les extraits EEP,PCA et la quercétine et de 1/32,1/16,1/8,1/4,1/2,1 ml/ml (concentration volumique) de la propolis commerciale française.

Après addition de 50 µl de l'inoculum (0,5Mac. F), et de 100µl de chaque dilutions des échantillons à testés à un volume de 2 ml de boillon nutritif. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 18 heures. Pour une comparaison de turbidité, un tube témoin été préparé contenant l'inoculum seul sans antibactérien.

VI. 4. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB), est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants. Pour sa détermination, le tube témoin a été dilué jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution a représenté 0,01% de survie. Elle est repiquée par strie de 5 cm sur une gélose nutritive puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de germes obtenus sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental ne présentant une croissance bactérienne apparente (les concentrations inhibitrices) également repiqué par strie de 5cm. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de germes présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspondra à la CMB.

Après détermination de la CMB le rapport CMI/CMB a permis de déterminer les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des échantillons testés. Lorsque ce rapport est supérieur à 4 ; l'extrait a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand ce rapport est inférieur ou égal à 4.

Analyse statistique

Les résultats quantitatifs des différentes évaluations réalisées sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Les courbes de régression logarithmique des pourcentages de réduction du DPPH par les différentes substances réductrices sont réalisées par *Microsoft Office Excel*

Les résultats des comparaisons entre les pourcentages d'inhibition du DPPH par les différents échantillons ont été traités statistiquement par l'analyse de la variance ANOVA suivi par test de simultanéité de Dunette pour les comparaisons avec le niveau de contrôle

Le seuil de signification est supérieur à 95% ($p < 0.05$), tel que :

($p > 0.05$) désigne un effet non significatif.

($p \leq 0.05$) désigne un effet significatif.

Ce traitement statistique est réalisé à l'aide du logiciel *GraphPad Prisme* version 5.04.

Chapitre V
Résultats et Discussions

Produced with ScanTOPDF

I. Mise en évidence des flavonoïdes

Avant de tester l'activité antioxydante et antibactérienne des différents échantillons de la propolis (EEP, PCA et PCF), On a commencé par la mise en évidence des flavonoïdes dans ces échantillons.

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gomez-C *et al.*2006).

Pour réaliser cette mise en évidence, on a appliqué aux trois échantillons différents de propolis une chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant la quercétine, une molécule flavonoïque pure de référence, comme témoin.

Le résultat de la mise en évidence des flavonoïdes dans les trois différents échantillons de la propolis est illustré par la **figure 16**.

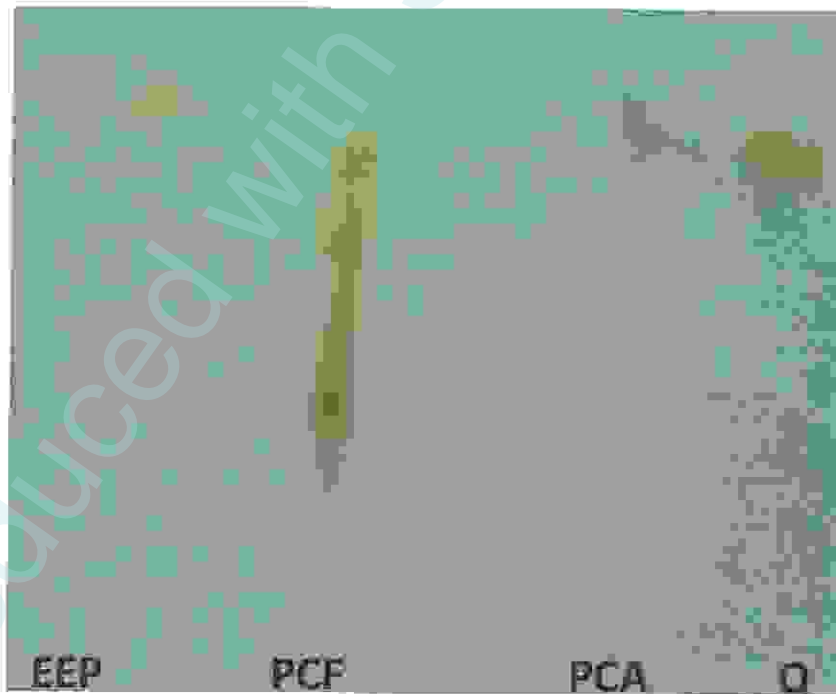


Figure 16 : chromatogramme représentant les spots de migration des flavonoïdes correspondant de gauche à droite à l'EEP, la PCF, la PCA et la quercétine.

Après migration et séchage du chromatogramme, sa pulvérisation par une solution éthanolique d' AlCl_3 (1%), révèle l'apparition des taches (spot) jaunes. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes (Zeghad N. 2009).

En comparant les rapports frontaux des trois échantillons de propolis avec celui de la quercétine, il s'avère que l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) ainsi que la propolis commerciale algérienne (PCA) est composé de flavonoïdes dont on ignore l'identité par contre on sait qu'ils ne contiennent pas de la quercétine.

Concernant la propolis commerciale française, on voit clairement qu'elle est riche en plusieurs flavonoïdes ceci s'explique par l'intensité de la couleur jaune ainsi que l'aspect allongé de la tache jaune qui représente plusieurs spots collés les uns contre les autres et qui correspondent à plusieurs flavonoïdes dont l'identité n'est pas connue. Cependant ce qui est sûr est que cette PCF contient certainement de la quercétine.

Cette évaluation est considérée comme analytique et nous a permis, seulement, d'affirmer l'existence des flavonoïdes dans l'EEP, la PCA et la PCF et non pas d'identifier les flavonoïdes contenus dans ces trois échantillons. En effet, l'utilisation de plusieurs autres molécules flavonoïques témoins comme la galangine, l'acacétine, la chrysrine, l'apigénine, la pinocembrine,...etc. nous permet d'avoir une idée plus complète sur la composition de ces trois propolis en ses différents flavonoïdes. Ceci est réalisable en comparant les rapports frontaux des différents spots de chaque échantillon de propolis avec ceux des témoins flavonoïques.

Ce test de mise en évidence reste une méthode rudimentaire et peu perfectionnée. En effet, des études faites par Athamena S *et al* (2010), Bouzid W *et al* (2010) pour établir la composition de la propolis en flavonoïdes utilisent des méthodes sophistiquées comme l'HPLC, la GCMS qui ont le pouvoir d'identifier toutes les molécules flavonoïques ou autres composant la propolis. En l'occurrence, plusieurs études faites ont montré que différentes propolis de diverses régions du monde sont riches en flavonoïdes à savoir : la pinocembrine, la pinobaksine, la pinostrombine, la quercétine, la galangine, l'acacétine, la chrysrine, la techtochrysrine (Bankova V. 1992, Lahouel M. 2005, Hegazi A G. 2001).

II. Dosage des flavonoïdes

Après s'être assuré de la présence des flavonoïdes dans nos trois échantillons de propolis, on a procédé à leur dosage par la méthode d' AlCl_3 dont le principe ressemble au principe de test de la mise en évidence des flavonoïdes, c'est-à-dire la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes qui se traduit par le fait que l'aluminium (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule flavonoïque agissant comme donneurs d'électrons (Zeghad N. 2009).

Pour interpréter la valeur de l'absorbance spécifique à chaque échantillon, nous avons utilisé une courbe d'étalonnage faite à partir de concentrations différentes de solutions éthanoliques de quercétines ($\mu\text{g/ml}$). Elle est représentée par la **Figure 17**.

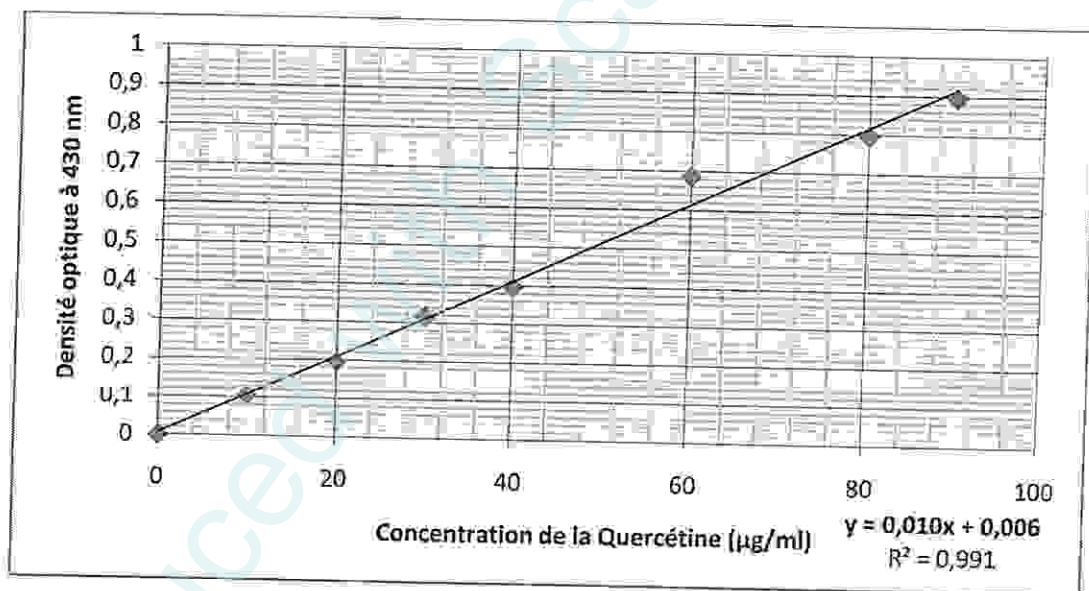


Figure 17: Courbe d'étalonnage de la quercétine par l' AlCl_3 .

D'après l'équation de la droite qui représente la courbe d'étalonnage réalisée par le flavonoïde standard la quercétine, on peut déduire l'équation suivante :

$$y = 0,01 x + 0,006$$

Par ailleurs, on a dosé, par la même méthode, les flavonoïdes dans les trois échantillons de propolis.

En utilisant l'équation présentée ci-dessus, et en prenant en considération le facteur de dilution de la solution éthanolique de la PCF, on a obtenu les résultats représentés dans le tableau suivant:

Tableau 10: Résultats représentant la teneur des échantillons de la propolis en flavonoïdes exprimées en mg équivalent de quercétine/mg de l'EEP ou de la PCA) et en µg équivalent de quercétine/ml de PCF.

Echantillon	Teneur en flavonoïdes
EEP	0,108 ± 0,003 (mg EQ/mg de l'EEP)
PCA	0,033 ± 0,003 (mg EQ/mg de PCA)
PCF	2,555 ± 0,276(mg EQ/ml de PCF)

Ces résultats quantitatifs révèlent que les trois échantillons de propolis ont des teneurs différentes en flavonoïdes. Ceci peut être expliqué par la différence de provenance de la propolis en termes de climat et d'emplacement géographique, d'espèce végétale à partir de laquelle l'abeille récolte les flavonoïdes (degré de maturation de la plante) et de saison durant laquelle se fait cette récolte (Bouziid W *et al.* 2010, Aganga A A. 2001, Pedneault *et al.* 2001).

Ainsi la différence entre les espèces des abeilles (abeille noires ou autres) d'un pays à l'autre et d'une région à une autre peuvent influencer le contenu des propolis en polyphénols y compris les flavonoïdes.

On peut dire que la détermination de la teneur de flavonoïde peut être utilisée comme indice de provenance de la propolis (Ferhoum F. 2010).

Par ailleurs, on constate d'après les résultats que la teneur la plus élevée en flavonoïdes est repérée chez la propolis commerciale française (2,555 ± 0,276mg EQ/ml de PCF). Vient ensuite l'extrait éthanolique de propolis avec une teneur 20 fois inférieure à celle de la PCF. La propolis commerciale algérienne possède la teneur la plus faible en flavonoïdes de l'ordre de 0,033mg EQ/mg de PCA.

Des études réalisées sur différentes propolis montrent une différence de composition en flavonoïdes d'un extrait à un autre. Ainsi, le travail réalisé sur un échantillon de propolis

provenant du Brésil indique une teneur en flavonoïdes de l'ordre de $43 \pm 0,1$ (Alencar S M *et al.* 2007).

Un autre exemple de propolis récolté de différentes régions de chine montre une teneur en flavonoïdes totale variant de $8,3 \pm 3,7$ à $188 \pm 6,6$ mg EQ/g de propolis brute (Ahn M R *et al.* 2007).

L'étude réalisée sur la propolis de Kerriemontre que la teneur en flavonoïdes totale va de 16 à 136 mg EQ /g de propolis (Katalinic V *et al.* 2006).

L'étude réalisée par Kamazawa S *et al.* (2004) confirme que la quantification des flavonoïdes peut être très utile pour différencier entre les échantillons de la propolis.

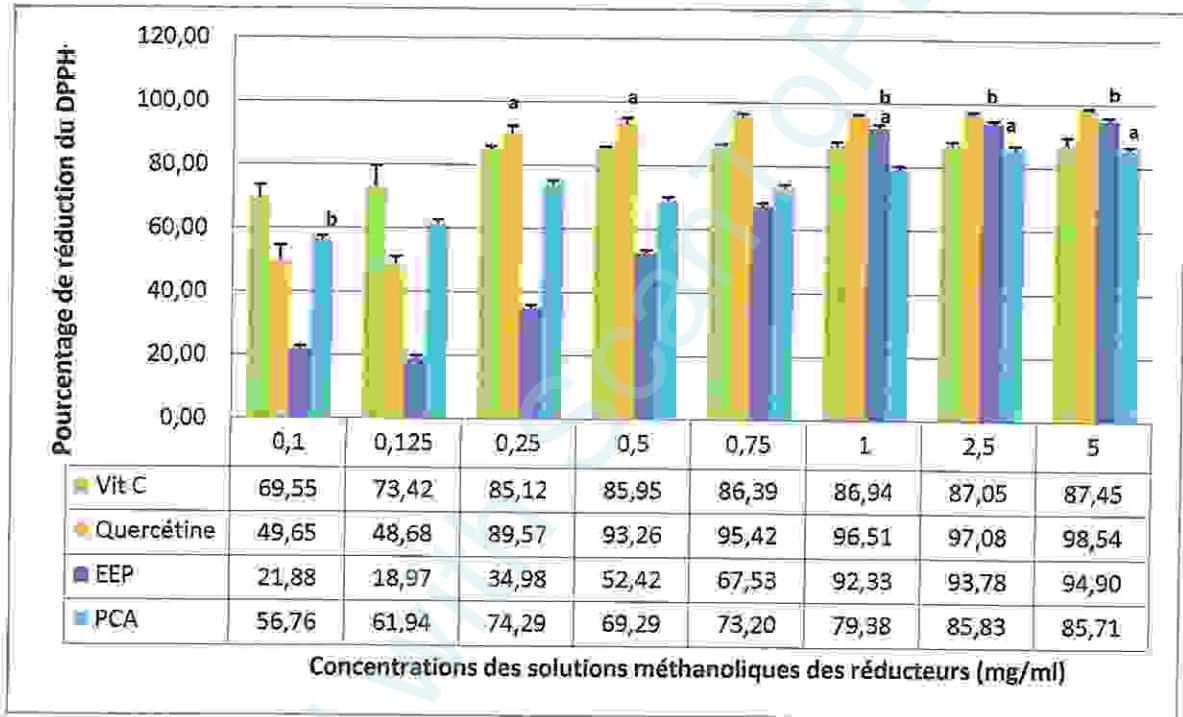
Une étude réalisée par Bancova V *et al.* (2000) montre qu'en Europe, la propolis récoltées par les abeilles provient principalement de les exsudats de bourgeons de *Populus* qui est une espèce végétale très riche en flavonoïdes. Ce qui explique sa très haute teneur en flavonoïdes qui est d'une moyenne de $41,03 \pm 11,23\%$ de propolis.

III. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* vis-à-vis du radical libre DPPH

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer l'activité antioxydante. Certaines d'entre elles reposent sur la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant à titre d'exemple l'estimation du pouvoir réducteur, qui mesure la capacité des extraits à réduire les ions métalliques (fer ferrique en fer ferreux).

Dans la présente étude, l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de propolis et des deux propolis commerciales algérienne et française a été déterminée en utilisant la méthode d'évaluation du pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon par la mesure du pourcentage de neutralisation ou de réduction du radical DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) par les antioxydants flavonoïques ou autres présents dans les extraits de propolis étudiées. Cette réduction du radical libre DPPH est observée par son changement de couleur du violet au jaune en absorbant à 517nm. Cette méthode s'effectue à température ambiante, permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique de molécules testées (Molyneux P.2004).

Les résultats des variations des pourcentages de réduction du DPPH[•] par les solutions méthanoliques de la vitamine C (antioxydant de référence), de la quercétine (flavonoïde de référence), de l'EEP et de la PCA, à différentes concentrations massiques (mg/ml) sont exprimés en moyenne \pm écartype et sont illustrés dans la **figure 18**.



Test ANOVA : (a) comparaison avec la vitamine C (contrôle) ; différence non significative ($P > 0.05$).

(b) comparaison avec la quercétine (contrôle) ; différence non significative ($P > 0.05$).

Figure 18: variations des pourcentages de réduction du DPPH[•] par les solutions méthanoliques de la vitamine C, de la quercétine, de l'EEP et de la PCA, à différentes concentrations massiques (mg/ml).

Quant aux variations des pourcentages de réduction du DPPH[•] par les solutions méthanoliques de la PCF à différentes concentrations volumiques (ml/ml) sont également exprimés en moyenne \pm écartype et sont illustrés dans la **figure 19**.

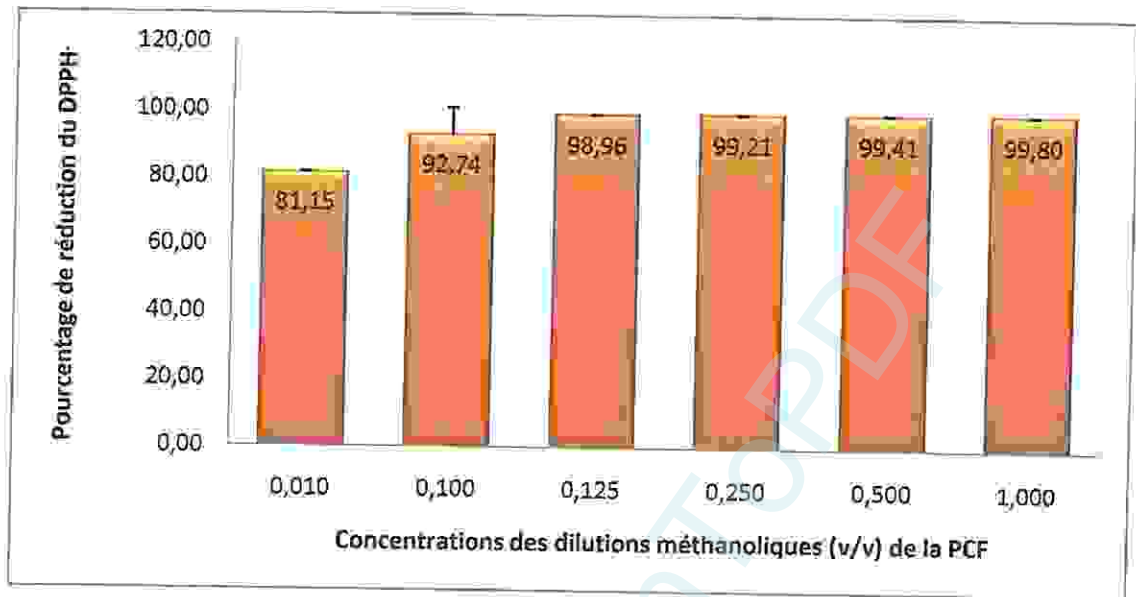


Figure 19 : variations des pourcentages de réduction du DPPH par les solutions méthanoliques de la PCF à différentes concentrations volumiques (ml/ml).

Comparés avec la vitamine C considérée comme antioxydant de référence (contrôle) et atteignant un effet réducteur maximal à 0,25mg/ml, la quercétine révèle une différence significative aux concentrations 0,1 et 0,125 mg/ml ; au delà de ces concentrations, la différence devient statistiquement non significative ($p > 0.05$) c'est-à-dire que la vitamine C et la quercétine ont le même pouvoir réducteur à concentration supérieure à 0,125 mg/ml. D'une autre part l'EEP et la PCA (effet réducteur maximal à 1mg/ml et à 2.5mg/ml respectivement) montrent à leur tour une différence de signification par rapport à la vitamine C aux concentrations allant de 0.1mg/ml jusqu'à 0.75mg/ml pour l'EEP et de 0.1mg/ml jusqu'à 1mg/ml pour la PCA. Cette différence ne devient plus significative à partir des concentrations 1mg/ml et 2.5 mg/ml pour l'EEP et la PCA respectivement.

Dans une deuxième comparaison avec la quercétine considérée comme flavonoïde pur de référence (contrôle) et atteignant un effet réducteur maximal à 0,25 et 0,5mg/ml, l'EEP ne montre plus une différence significative ($P > 0.05$) à partir de la concentration de 1mg/ml quercétine. Tandis que la PCA a montré une différence non significative à une concentration de 0.1mg/ml.

N'oublions pas la PCF qui a présenté le pourcentage d'inhibition du DPPH le plus élevé 99.80% et ce à partir d'une dilution de 1/8 de la solution mère de la PCF.

Par ailleurs, il est utile de déterminer l'EC₅₀ des échantillons de propolis et la comparer avec celle de la vitamine C et celle de la quercétine. Elle représente la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%. Ce paramètre a été introduit par Brand-W *et al.* (1997) et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs Lebeau J *et al.* (2000), Koleva *et al.* (2007), Markowicz B *et al.* (2007) pour présenter leurs résultats.

Les valeurs des EC₅₀ sont présentées dans le tableau 11 et sont calculées à partir des équations issues des courbes de régression logarithmique correspondant aux résultats.

Tableau 11: Valeurs des EC₅₀ de la vitamine C, de la quercétine, de l'EEP, de la PCA et de la PCF.

Echantillons	Vit C (mg/ml)	Quercétine(mg/ml)	EEP(mg/ml)	PCA(mg/ml)	PCF(ml/ml)
EC ₅₀	2,42. 10 ⁻⁴	0,041	0,38	2,05. 10 ⁻⁴	3,5.10 ⁻⁶

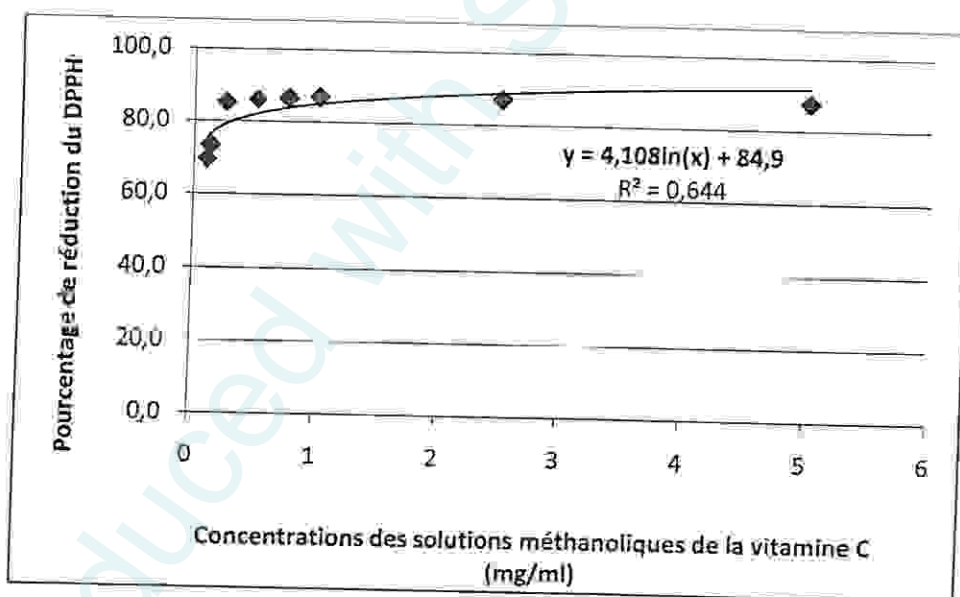


Figure 20 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la vitamine C à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH.

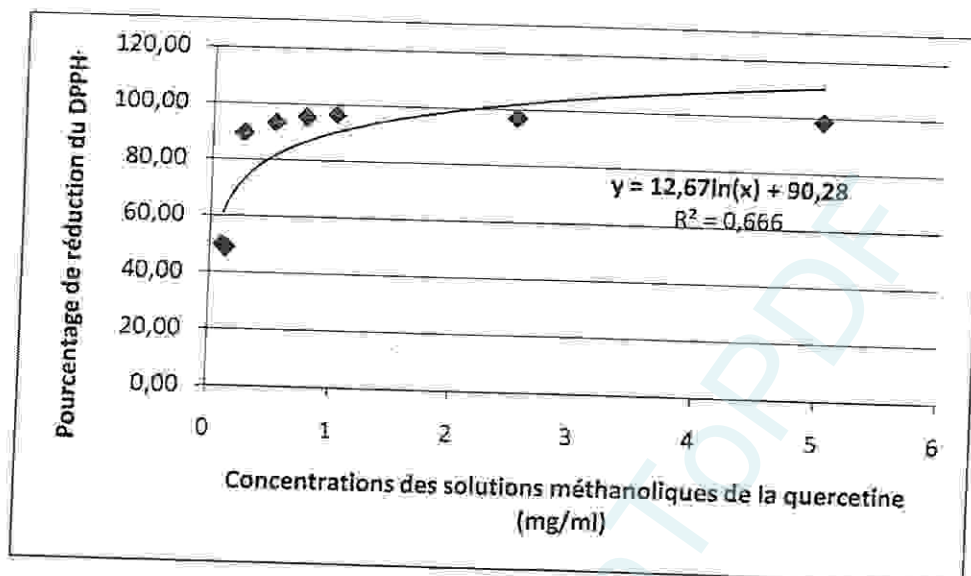


Figure 21 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la quercétine à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH.

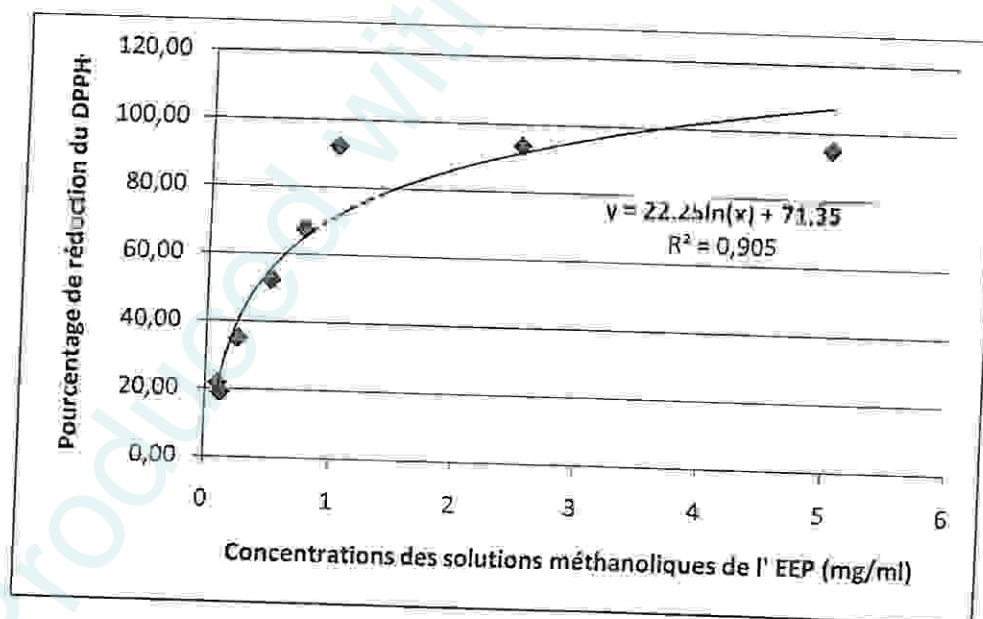


Figure 22 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH.

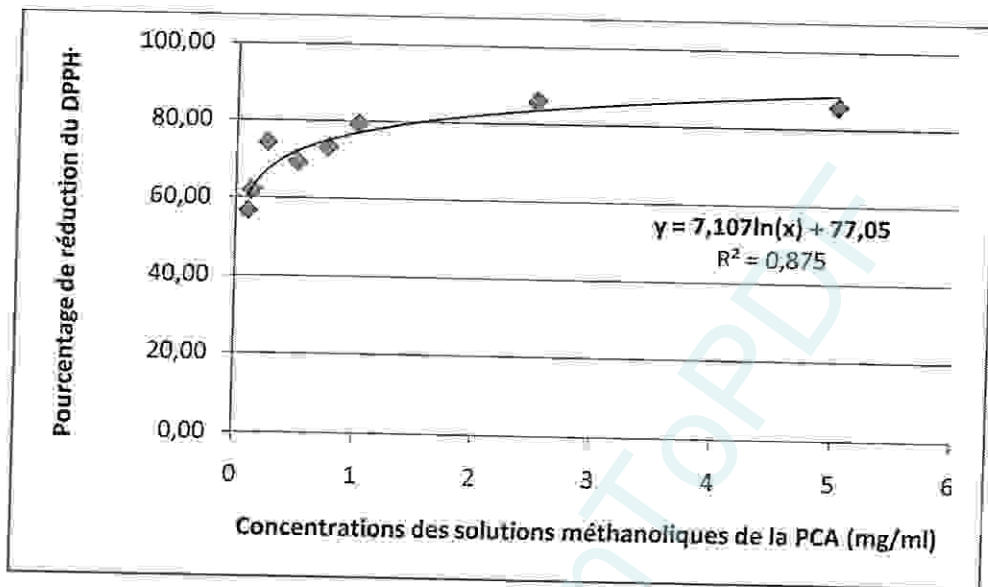


Figure 23: Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la propolis commerciale algérienne à différentes concentrations massiques vis-à-vis du radical libre DPPH.

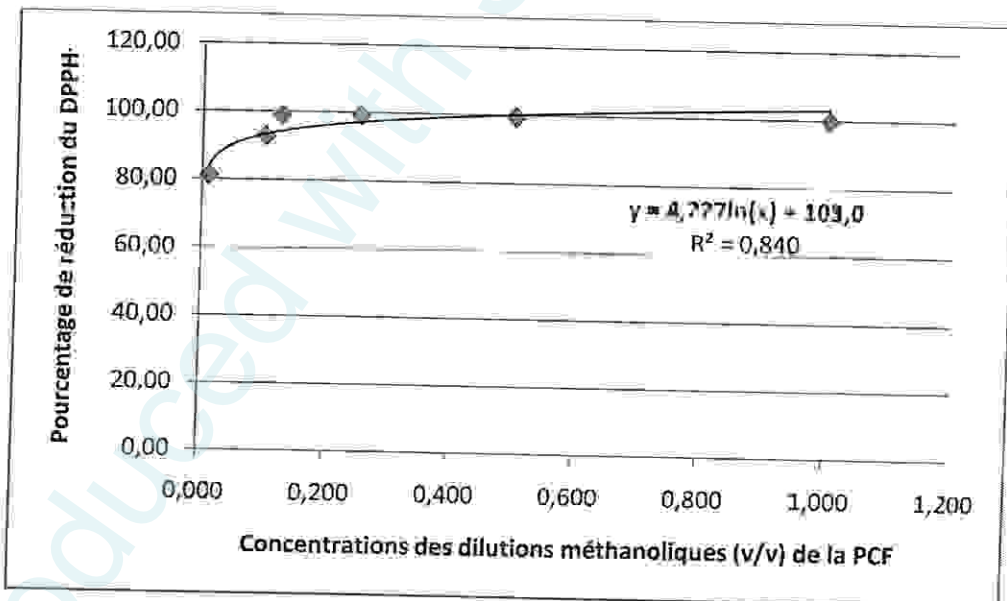


Figure 24 : Courbe de régression logarithmique des variations de l'effet *scavenger* de la propolis commerciale française à différentes concentrations volumiques vis-à-vis du radical libre DPPH.

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure. 18 et 19), révèlent que tous les échantillons de propolis testés ainsi que la vitamine C et la quercétine considérés comme contrôles sont des anti-radicalaires. On remarque également

que le pouvoir anti-radicalaire augmente en fonction de la concentration des substances réductrices. Ceci vient confirmer les résultats faits par d'autres chercheurs concernant l'effet antioxydant de la vitamine C, des flavonoïdes et l'effet antiradicalaire de la propolis (Ahn M R *et al.* 2007, Ferhoum F. 2010, Hegazi *et al.* 2001 et Russo *et al.* 2002).

D'une autre part et d'après les résultats du **tableau 11**, nos échantillons de propolis possèdent des capacités plus ou moins puissante de neutralisation du radical libre DPPH. Cependant, en comparant les valeurs des EC_{50} de l'EEP et de la PCA avec celles de la vitamine C et de la quercétine, il s'avère que ces deux échantillons de propolis ont un effet antioxydant moindre que celui des deux molécules de référence.

On peut dire que selon les valeurs des EC_{50} des échantillons on peut les classer dans un ordre croissant d'efficacité comme suit : EEP, Quercétine, PCA et vitamine C.

Par ailleurs, la PCF possède un excellent effet inhibiteur des radicaux libre et ce, en se basant sur la très petite concentration ayant réduit 50% du DPPH.

Nous pouvons conclure que comme la vitamine C, la quercétine et les échantillons de propolis ont un très bon pouvoir antioxydant.

Une étude a été réalisée par Ferhoum F. (2010) sur une propolis algérienne (selon les étages bioclimatique) montre que la propolis saharienne présente le meilleur pouvoir anti-radicalaire $EC_{50} = 0.20$ mg/ml et la propolis du groupe plaine présente une EC_{50} de l'ordre 0.22mg/ml, 0.30mg/ml et 0.35mg/ml respectivement pour Mitidja, Chabbet et Isser. Nos résultats sur l'EEP de Jijel ($EC_{50} = 0.38$ mg/ml) vont dans le même sens que les résultats cités auparavant.

L'étude réalisée sur les extraits éthanolique de la propolis provenant du Portugal a montré que les valeurs obtenues d' EC_{50} sont de l'ordre de 0.006mg/ml et 0.025mg/ml pour la propolis de *Bornes* et *Funddao* respectivement. Résultats, de loin, inférieurs à ceux trouvés dans notre étude, donc la propolis du Portugal a un pouvoir antiradicalaire plus important que nos échantillons analysés. (Leandro M *et al.* 2008).

IV. Evaluation de l'activité antibactérienne

Après avoir testé l'activité antioxydante *in vitro* de la quercétine et des différents échantillons de propolis, on a voulu travailler sur un support bactérien, formé de quarte souches pathogènes, et tester leurs activités antibactériennes par la mesure des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides.

IV. 1. Test de sensibilité des bactéries vis-à-vis de la propolis

On a commencé notre évaluation antibactérienne par un test de sensibilité des bactéries vis-à-vis de la quercétine, de l'EEP, de la PCA (à 1mg/ml et à 5mg/ml) et de la PCF (dilué à 1/4 et à 1/10 ml/ml) en utilisant le méthanol, solvant dans lequel on a dilué nos échantillons, comme contrôle négatif et trois antibiotiques différents (Amikacin AK 10µg, Cefotaxime CTX 30µg, Imipénème IPM 10µg) comme contrôles positifs.

Ce test a été déterminé par la méthode de diffusion en milieu gélosé citée par Celiktas O Y *et al.* (2007) et Sacchetti G *et al.* (2005). Il a été effectué sur une souche bactérienne Gram positif *Staphylococcus aureus* et trois souches bactériennes Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

La zone d'inhibition propre à chaque échantillon testé est mesurée à l'aide d'une règle. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition par quercétine, l'EEP, PCA, la PCF et les antibiotiques.

Souches /extraits	Méthanol	ATB	EEP (1mg/ml)	PCA (1mg/ml)	PCF (1/10ml/ml)	Quercétine (1mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,33±0,58	22±1,00	13,33±0,58	12±1	14,33±0,58	13,67±0,58
<i>Pseudomonas Aëroginosa</i>	5±0,00	28,67±3,21	13,67±1,52	11,67±0,58	13±1,00	11,67±0,58
<i>Escherichia coli</i>	6±1,00	41,66±3,21	13±1,00	11±0,00	12,33±1,15	11,67±0,58
<i>Klebsiella pnoumonia</i>	5,33±0,58	22,33±2,08	12,33±0,58	11,67±0,58	12,67±1,53	12,67±0,58

Souches /extraits	Méthanol	ATB	EEP (5mg/ml)	PCA (5mg/ml)	PCF (1/4) (1/4ml/ml)	Qercétine (5mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6±1,00	22±1,00	17,33±0,58	14	15,67±1,53	15,33±0,58
<i>Pseudomonas Aëroginosa</i>	6±0,00	28,67±3,21	16,67±0,58	14±1,00	15,33±0,58	14,33±1,53
<i>Escherichia coli</i>	7±1,00	41,66±3,21	15,33±1,53	13,33±0,58	13,33±0,58	13,67±0,58
<i>Klebsiella pnoumonia</i>	6±0,00	22,33±2,08	15,67±1,53	14,33±0,58	15±1,00	15±1,00

NB :* L'Antibiotique utilisé pour chaque bactérie est : *Staphylococcus aureus* AK 10µg.

Pseudomonas Aëroginosa IPM 10µg.

E.Coli, *Klebsiella pnoumonia* CTX 30µg.

Les zones d'inhibition des souches bactériennes par les différents échantillons sont illustrées par les figures suivantes :

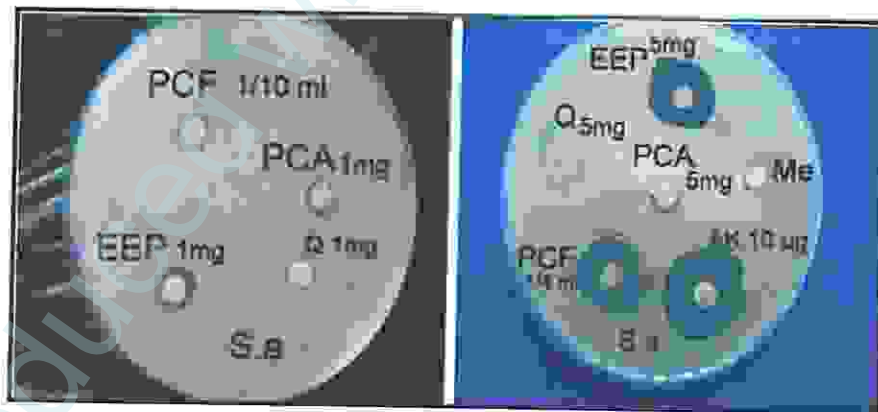


Figure 25 :L'effet des échantillons testés sur *Staphylococcus aureus*.

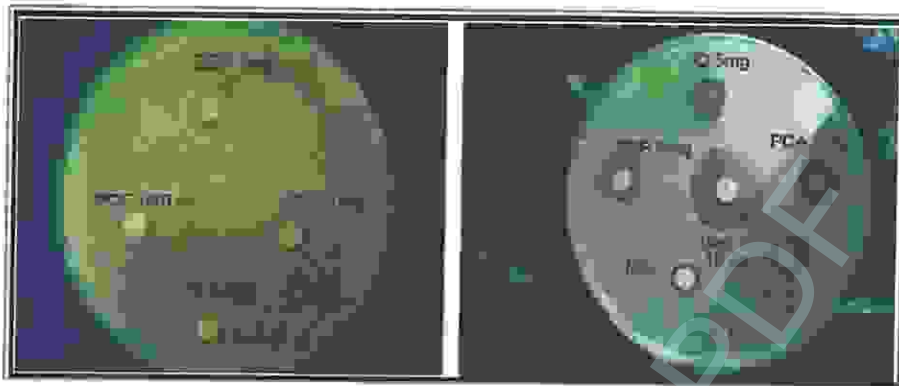


Figure 26 :L'effet des échantillons testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

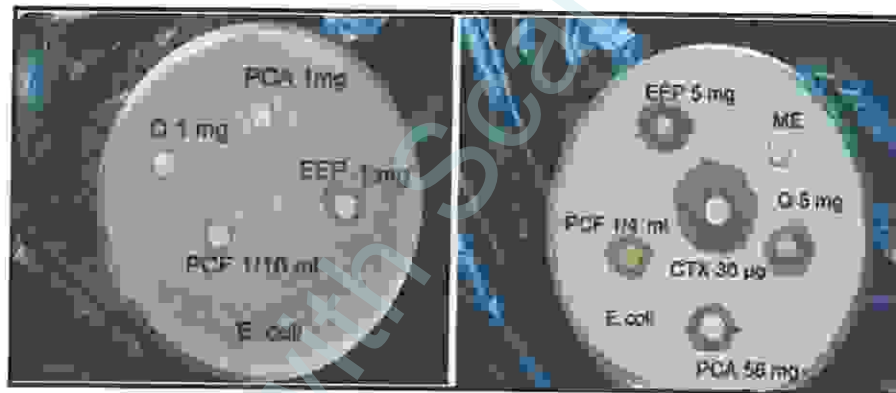


Figure 27 :L'effet des échantillons testés sur *Escherichia coli*.

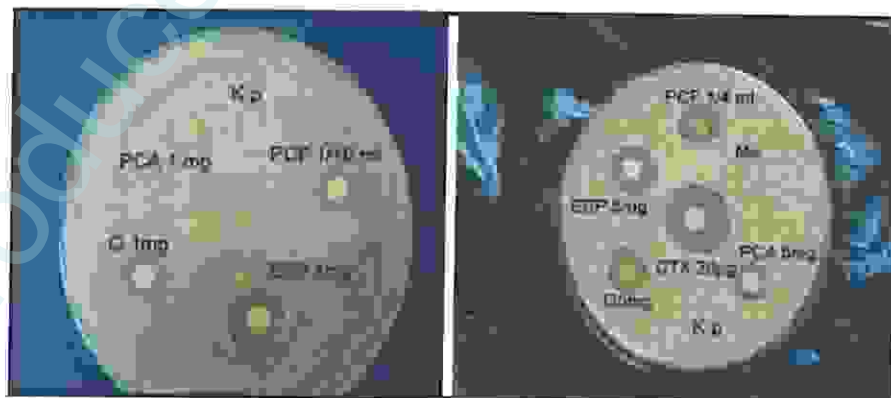


Figure28 :L'effet des échantillons testés sur *Klebsiella pneumoniae*.

Au regard de ces résultats, on a observé que la quercétine ainsi que les trois échantillons de propolis (EEP, PCA et PCF) ont inhibé la croissance de toutes les souches bactériennes utilisées. On remarque aussi qu'ils exercent une activité antibactérienne dose dépendante vue l'augmentation des diamètres des zones d'inhibition en passant d'une concentration de 1mg/ml à 5mg/ml des échantillons quercétine, EEP et PCA et en allant d'une dilution de 1/10 à 1/4 de la PCF. Ces résultats sont plus ou moins similaires à d'autres résultats reportés par **Hegazi A et al. (2002)** et **Nilesh K et al. (2008)**.

Les antibiotiques de référence : Amikacin, Céfotaxime, Imipénème donnent des diamètres d'inhibition très élevés. Ces diamètres sont largement supérieurs à ceux de tous les échantillons testés

Par ailleurs et en terme de résistance bactérienne, les souches *Escherichia coli*, *Klebseila pneumoniae* et *Pseudomonas aeroginosa* possèdent un potentiel de résistance moyen contre l'action antibactérienne de la quercétine et des trois échantillons de propolis avec un diamètre de zone d'inhibition situé entre 11mm 14mm à la concentration 1 mg/ml.

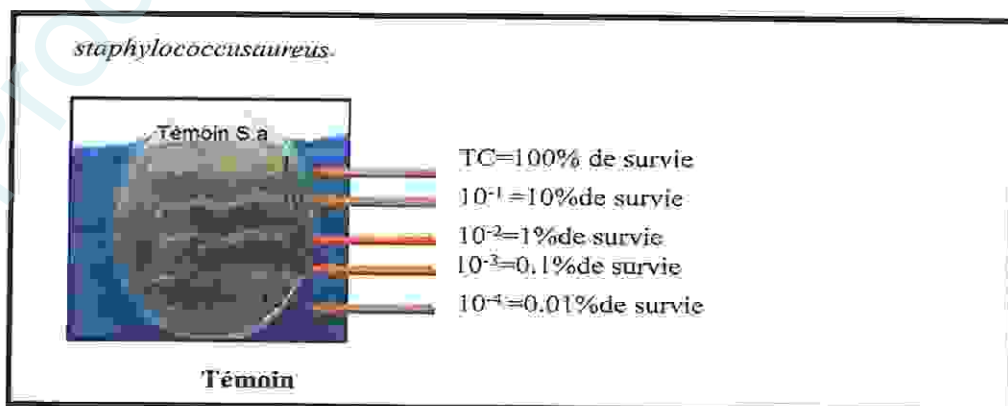
Etant la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures, la CMI de chaque échantillon flavonoïque vis-à-vis de chaque souche bactérienne a été déterminée sur une gamme de dilutions des échantillons allant de 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/ml (concentrations massiques) pour la quercétine, l'EEP et la PCA et allant de 1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 et 1 ml/ml (concentration volumique) de la PCF. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 13: Concentrations minimales inhibitrices de la quercétine, de l'EEP, de la PCA, et de la PCF vis-à-vis des quatre souches bactériennes.

	CMI _{Quercétine} (mg/ml)	CMI _{EEP} (mg/ml)	CMI _{PCA} (mg/ml)	CMI _{PCF} (ml/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	2	16	1/8
<i>Pseudomonas aëroginosa</i>	1	2	2	1/32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	4	4	1/16
<i>Escherichia coli</i>	8	8	4	1/8

En plus de la détermination des CMI spécifiques des quatre échantillons, la détermination de leurs CMBs respectives se fait par repiquage des concentrations inhibitrices de chaque échantillon testé avec les quatre souches bactériennes par des stries sur une gélose nutritive neuve. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les résultats sont comparés avec des témoins représentant 0.01% de germes survivants de chaque souche bactérienne. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0,01% de survivants.

Les figures suivantes montrent le résultat des repiquages des tubes témoins et ceux des quatre échantillons flavonoïques testés



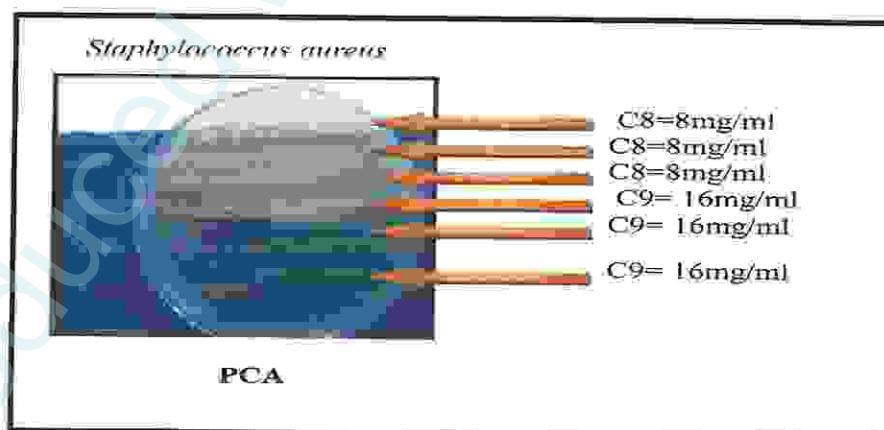
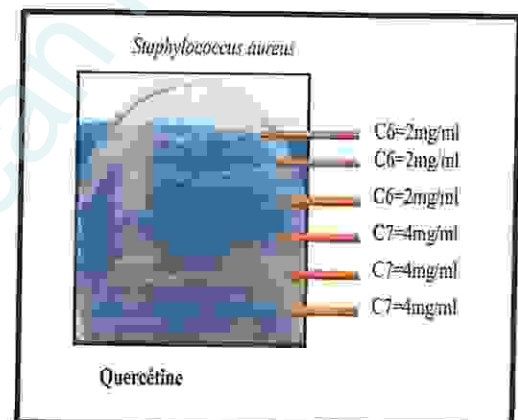
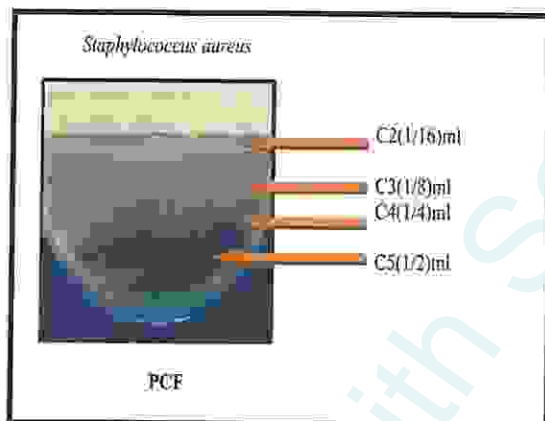
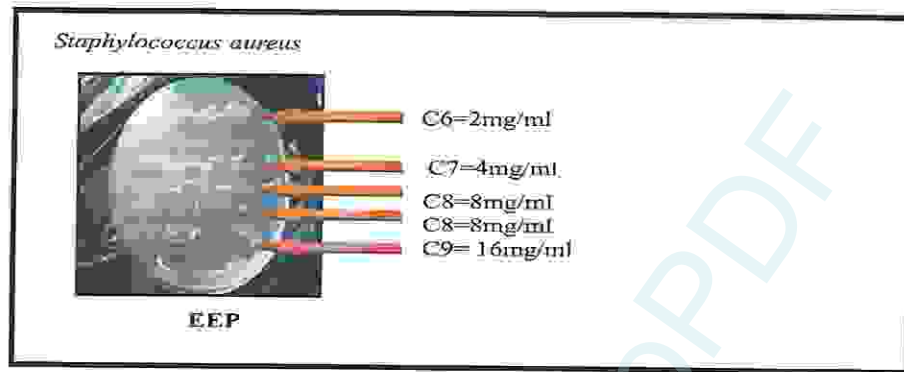


Figure 29: Détermination de la CMB des échantillons testés sur *Staphylococcus aureus*

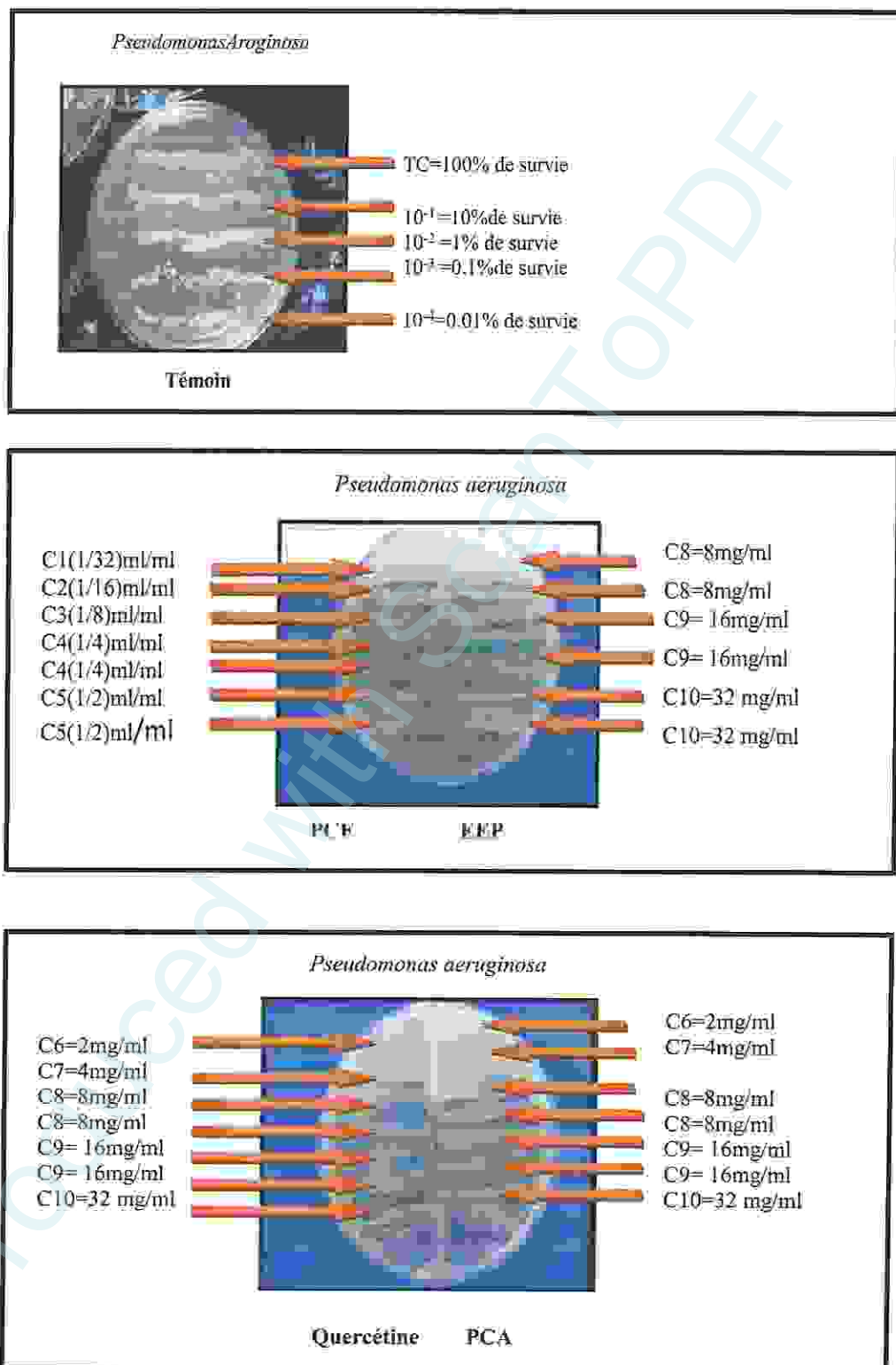
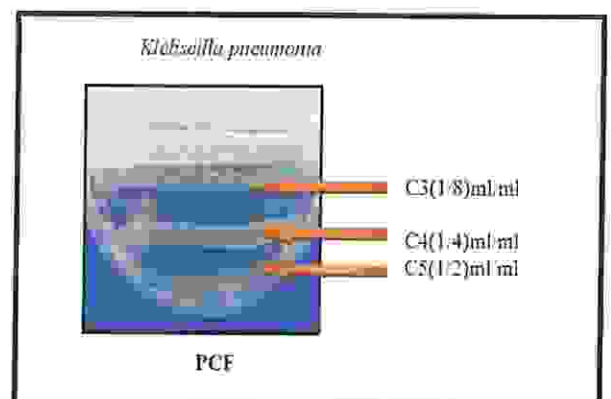
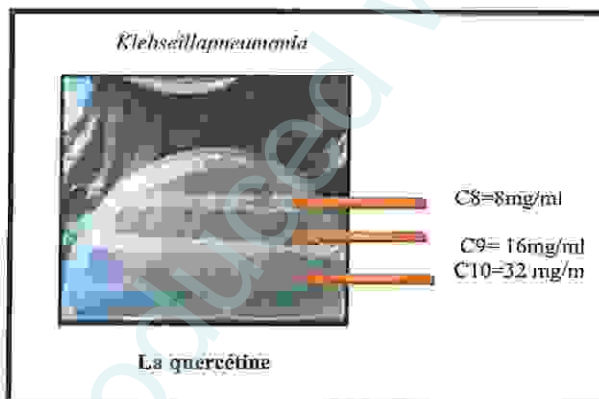
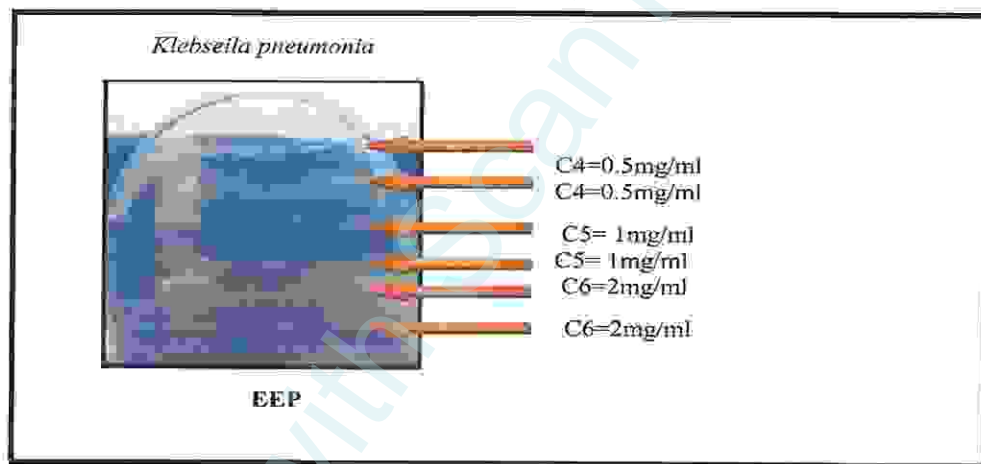
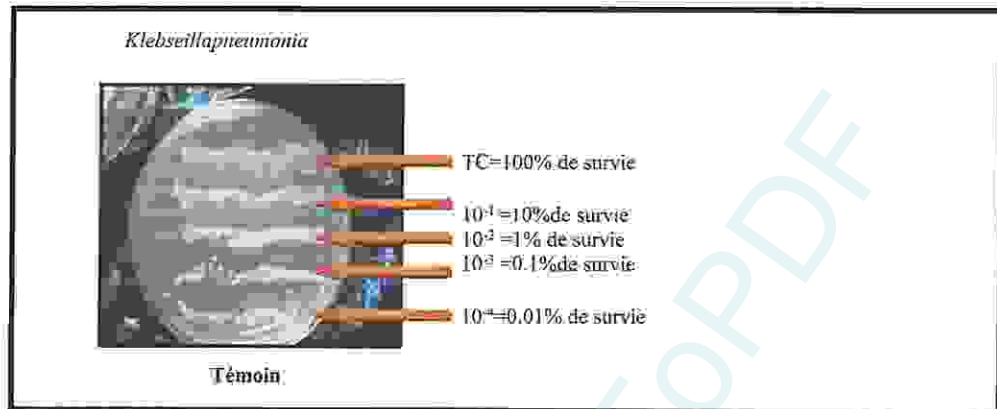


Figure 30 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.



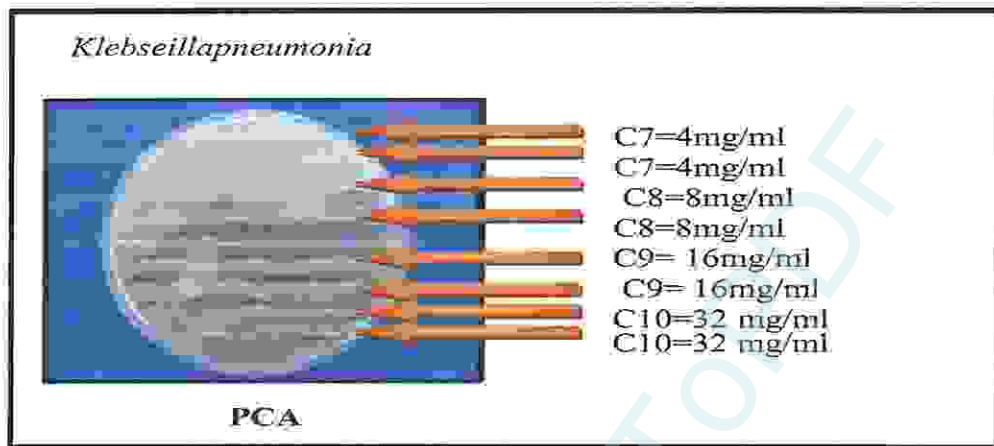
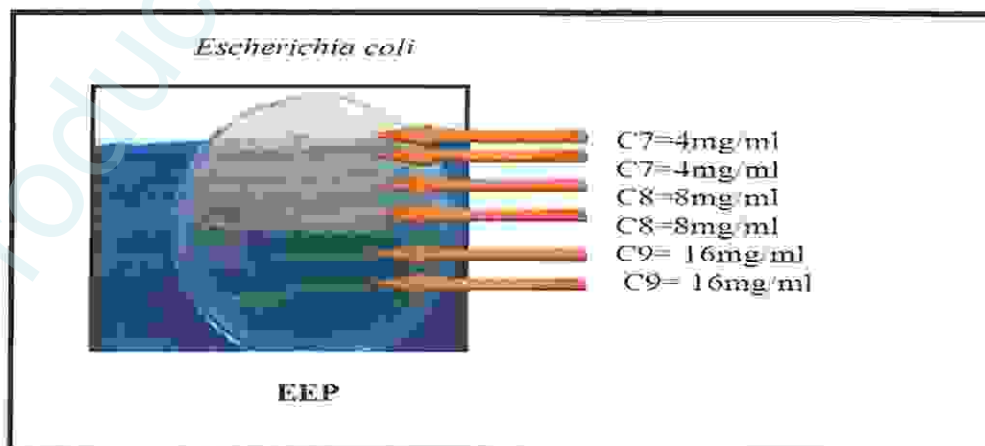
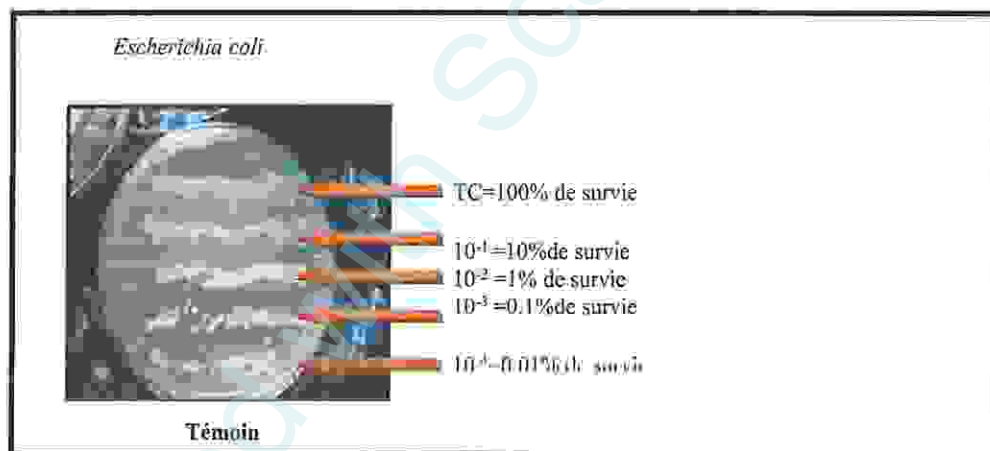


Figure 31 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur *Klebsiella pneumoniae*.



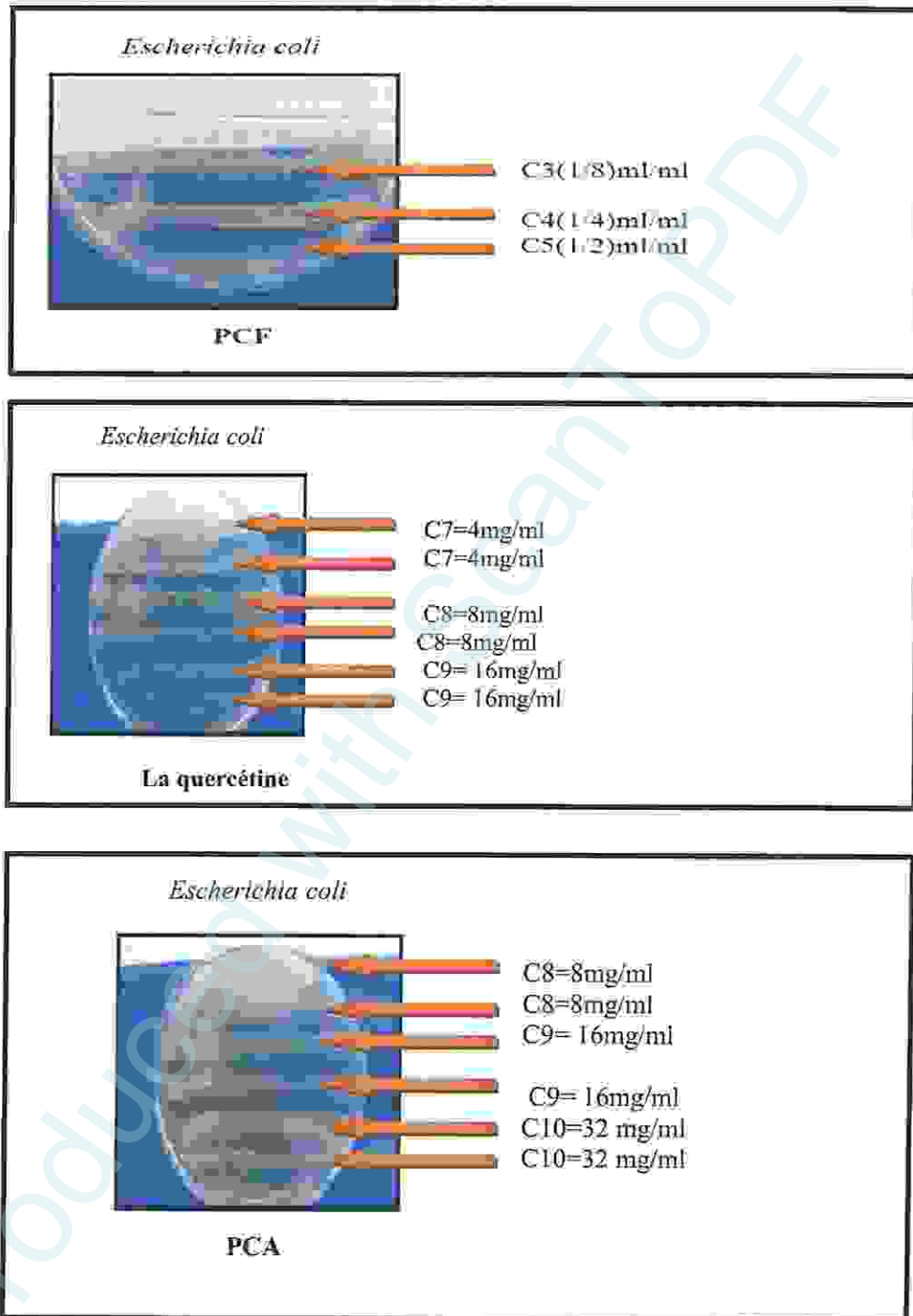


Figure 32 : Détermination de la CMB des échantillons testés sur *E. coli*.

D'après les figures représentées ci-dessus, on peut déduire les résultats résumés dans le tableau suivant

Tableau 14 : Concentration minimale bactéricide des extraits.

	CMB _{Quercétine} mg/ml	CMB _{EEP} (mg/ml)	CMB _{PCA} (mg/ml)	CMB _{PCF} (ml/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8	16	1/2
<i>Pseudomonas aérogénosa</i>	8	16	8	1/2
<i>Klebsiella pnoumonia</i>	32	4	32	1/2
<i>Escherichia coli</i>	16	16	32	1/2

Après détermination des CMI et des CMBs des différents échantillons testés vis-à-vis des quatorze souches bactériennes, le calcul du rapport CMI/CMB effectué pour connaître la nature de l'effet antibactérien. En effet, selon Marmonier (1990), lorsque le rapport d'activité CMI/CMB d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide et si le rapport CMI/CMB est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique.

Tableau 15 : Valeurs de rapports CMI/CMB des l'extraits.

	CMI/CMB Quercétine	CMI/CMB _{EEP}	CMI/CMB _{PCA}	CMI/CMB _{PCF}
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,25	1	0,25
<i>Pseudomonas aerogénosa</i>	0,125	0,125	0,25	0,125
<i>Klebsiella pnoumonia</i>	0,0625	1	0,125	0,125
<i>Escherichia coli</i>	0,5	0,25	0,125	0,25

Au regard des résultats concernant l'évaluation de l'activité antibactérienne on peut déduire les conclusions suivantes :

Pour la quercétine, molécule flavonoïque pure, on a remarqué des valeurs de CMI différente en fonction de la souche utilisée, ainsi la plus petite CMI = 1mg/ml est celle de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus grande CMI = 08mg/ml est celle de *E. coli*.

Par contre la plus petite CMB (4 mg/ml) de la quercétine est celle de *Staphylococcus aureus* et la plus grande (32 mg/ml) est celle avec *Klebsiella pneumoniae*.

La quercétine a donc une action bactéricide pour toutes les souches bactériennes (CMI/CMB \leq 4)

Concernant l'EEP, il présente aussi des valeurs de CMI différente en fonction de la souche utilisée, ainsi la plus petite CMI = 02 mg/ml est celle de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus grande CMI = 08 mg/ml est celle de *E. coli* Par contre la plus petite CMB (4 mg/ml) de l'EEP est celle de *Klebsiella pneumoniae* et la plus grande (16 mg/ml) est celle avec *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*.

L'EEP a donc une action bactéricide pour toutes les souches bactériennes (CMI/CMB \leq 4).

Quant à la PCA, elle présente aussi des valeurs de CMI différente en fonction de la souche utilisée, ainsi la plus petite CMI = 02 mg/ml est celle de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus grande CMI = 16 mg/ml est celle de *Pseudomonas aeruginosa* .Par contre la plus petite CMB (8 mg/ml) de la PCA est celle de et la plus grande (32 mg/ml) est celle avec *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*.

La PCA a donc une action bactéricide pour toutes les souches bactériennes (CMI/CMB \leq 4)

Enfin pour la PCF, elle présente aussi des valeurs de CMI différente en fonction de la souche utilisée, ainsi la plus petite CMI = 1/32 ml/ml est celle de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus grande CMI = 1/8ml/ml est celle de *Staphylococcus aureus* et de l'*Escherichia coli*. Par contre la CMB = 1/2mg/ml pour tout les souches,

La PCF a donc une action bactéricide pour toutes les souches bactériennes (CMI/CMB \leq 4)

En termes de sensibilité des souches bactériennes on peut dire que *Klebsiella pneumoniae* est la plus sensible à l'action de la quercétine, *Escherichia coli* est la plus résistante à l'effet de l'EEP et de la quercétine. *Pseudomonas aeruginosa* est la plus

sensible à l'action de la quercétine et que *Staphylococcus aureus* est la plus résistante à la PCA.

Par ailleurs, l'analyse des données expérimentales illustrées par les images des figures 29, 30, 31, 32 montre que comparativement aux témoins de contrôle de croissance bactérienne, il y a une diminution du nombre de colonies de ces germes dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration de l'échantillon a testé augmente.

On peut dire que nos échantillons flavonoïques possèdent une activité bactéricide contre toutes les souches testées. Plusieurs études concernant l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques de propolis ont montré une corrélation positive entre la teneur en flavonoïdes et des propriétés antibactériennes de la propolis (Gonsales *et al.* 2006). Cependant, il a été remarqué que la sensibilité de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de nos échantillons flavonoïques a été reportée par des résultats similaires (Liviú A *et al.* 2002) sur la propolis de Transylvanie (Roumanie). Elle peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, la présence des extraits naturels (Balentine *et al.* 2006). Plusieurs autres travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif (Fallch *et al.* 2008, Hayouni *et al.* 2007, Turkmen *et al.* 2007, Shan *et al.* 2007, Koné *et al.* 2004). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram négatif et Gram positif. Les bactéries Gram négatif, indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram négatif(-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et concentrations accrues en NaCl (Georgantelis *et al.* 2007).

L'activité antibactérienne des échantillons testés pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants, notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines. L'EEP renferme une quantité appréciable de polyphénols mais il n'a montré qu'une faible activité inhibitrice sur la souche *Escherichia coli*. Il se peut que son activité soit masquée par la présence d'autres composants antagonistes (Scalbert, 1991, Bruneton, 1993, Elegamiet *et al.* 2002, Hatano *et al.* 2005, Sanogo, 2006, Surveswaran *et al.* 2007).

Les différences trouvées entre les différents échantillons de propolis peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction (Moreira *et al.* 2005, Sagdic et Ozcan 2003, Celiktas *et al.* 2007, Turkmen *et al.* 2007), préparation de l'extrait, solvant utilisé, et finalement l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al.* 2005).

Nombreux chercheurs ont signalé que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les esters phénoliques sont les principaux composés biologiquement actifs de la propolis (Bankova V *et al.* 2002, Kartal *et al.* 2003, Kujungie V *et al.* 1993, Marcucci *et al.* 2001, Cha H. C. 2003).

En effet, l'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien et la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karouet *et al.* 2005).

Dans plusieurs travaux, la propolis a été peu active contre les bactéries Gram négatif. Cependant nos échantillons ont prouvé le contraire, ceci peut être les résultats d'une synergie entre les flavonoïdes, l'apigénine, crysin, et / ou d'autres composants dans des échantillons de propolis.

Ces résultats ont également été corrélée avec l'étude réalisée par le chercheur Hikmet katircio *et al.* (2006) sur la propolis turque et par Liviu A *et al.* (2010) sur la propolis Transylvanie (Roumanie) et par Fernandes A *et al.* (2001) sur la propolis du Brésil.

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires (Kil *et al.*2009), de l'emplacement et le nombre des groupes d'hydroxyles (Falleh *et al.*2008).

Produced with ScanTOPDF

Conclusion et perspectives

Produced with ScanTOPDF

Conclusion et perspectives

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutiques. En effet, la propolis d'abeille constitue de véritable usine chimique dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien être de la population.

Notre travail comportant sur l'étude des activités biologiques et des caractéristiques biochimiques de la propolis, nous a permis de comprendre que le domaine des produits de la ruche demeure encore un terrain valable de recherches scientifiques nécessitant un approfondissement.

La présente étude a permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans nos échantillons de propolis mais qui restent non identifiés. Après leur dosage on a pu conclure que les différents échantillons de propolis contiennent des quantités variables en flavonoïdes.

L'étude de l'activité antioxydante des échantillons de la propolis par l'évaluation de leurs pouvoirs antiradicalaires et la quantification de leurs composés flavonoïdiques a confirmé les propriétés puissantes, que possèdent les échantillons de propolis étudiés à piéger les radicaux libres. Nos résultats nous ont permis aussi de montrer que les composés flavonoïques des extraits de la propolis possèdent une bonne activité antiradicalaire, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien vis-à-vis de quelques germes pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que les composants de la propolis agissent différemment sur les espèces bactériennes testées surtout l'extrait éthanolique de la propolis qu'a un très bon pouvoir antibactérien.

En conclusion, la différence de l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des extraits semble être directement liée à la diversité quantitative et/ou qualitative des composés bioactives qui sont présents dans nos échantillons testés.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne consiste qu'une première étape dans la recherche de substances de sources naturelles biologiquement active. Des essais

complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. En effet, il servait nécessaire de :

- De réussir à identifier les composés bioactifs de la propolis en utilisant des techniques plus performantes (HPLC, GCMS).
- De tester des molécules flavonoïques isolées et pures sur un support microbien ainsi que sur des animaux présentant un trouble ou une maladie fortement liée au stress oxydatif (maladies neurodégénérative, maladies cardiovasculaires)
- D'explorer l'effet antioxydant de la propolis à l'échelle moléculaire : au niveau mitochondrial.

Produced with ScanTopdf

Annexes

Produced with ScanTOPDF

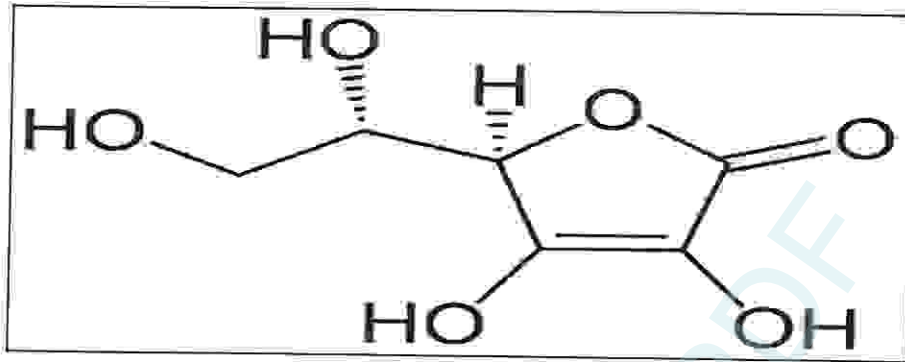


Schéma représente la structure chimique de la vitamine C.

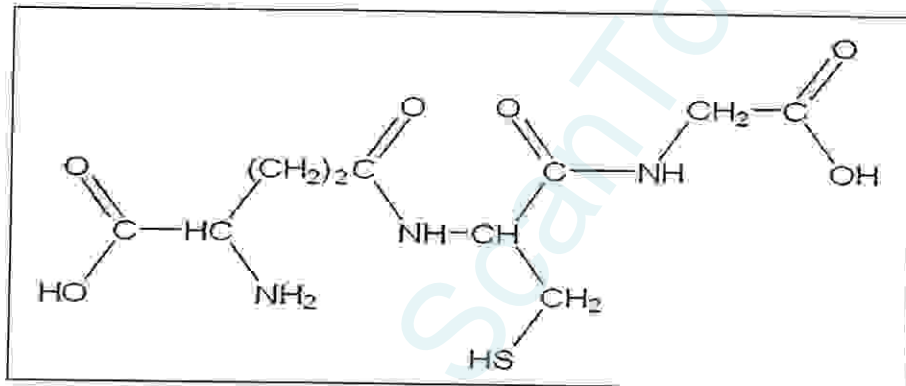


Schéma représente la structure chimique du glutathion

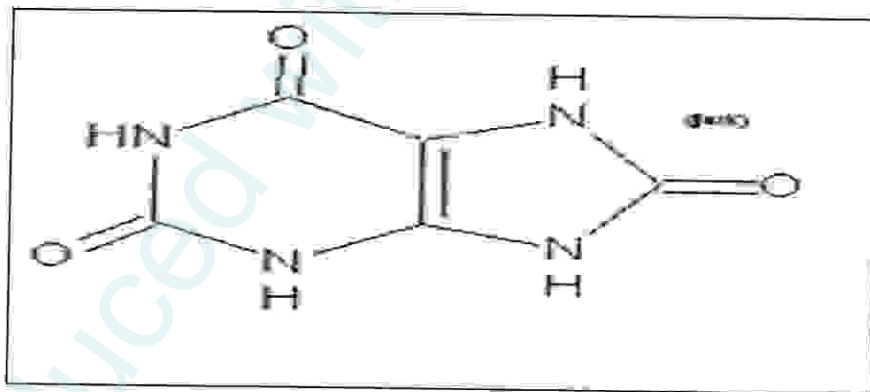


Schéma représente la structure chimique de L'acide urique.

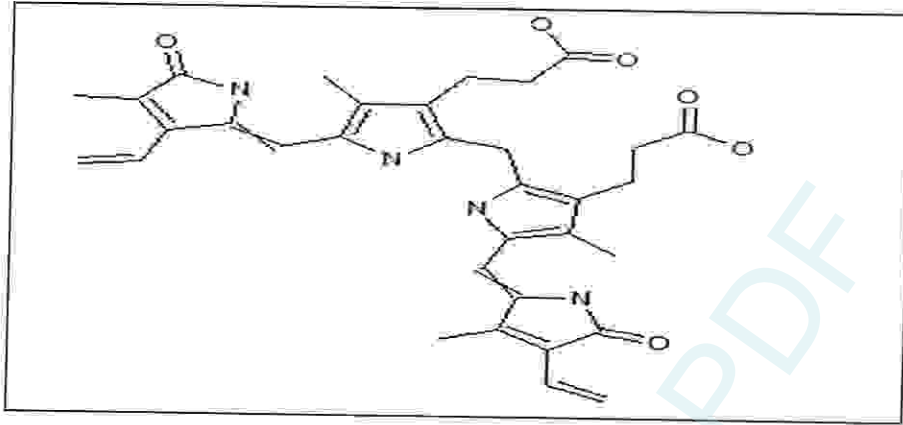


Schéma représente la structure chimique de la bilirubine.

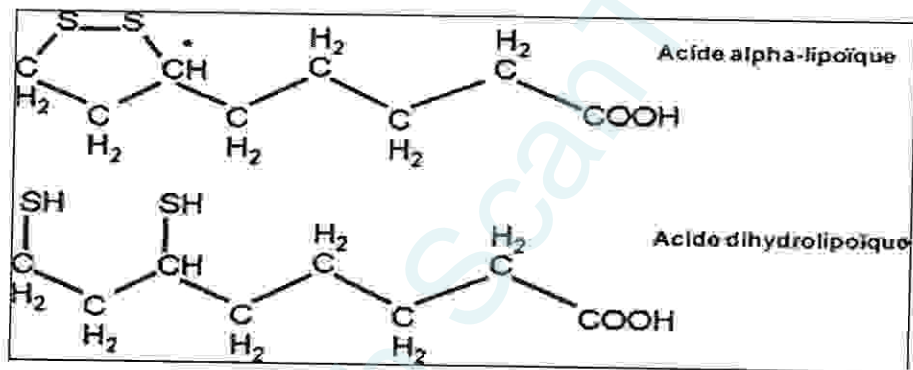


Schéma représente la structure chimique de l'acide lipoïque ou thiocétique.

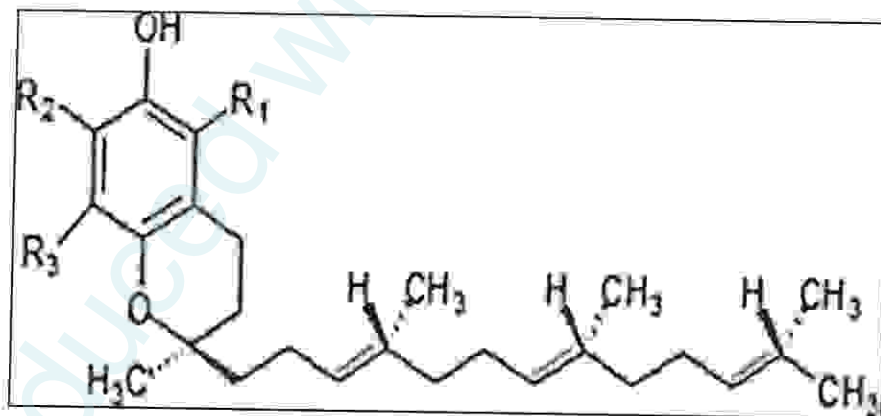


Schéma représente la structure chimique de la vitamine E.

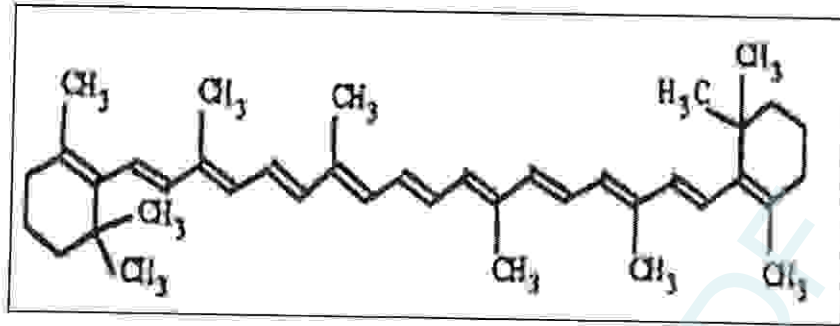
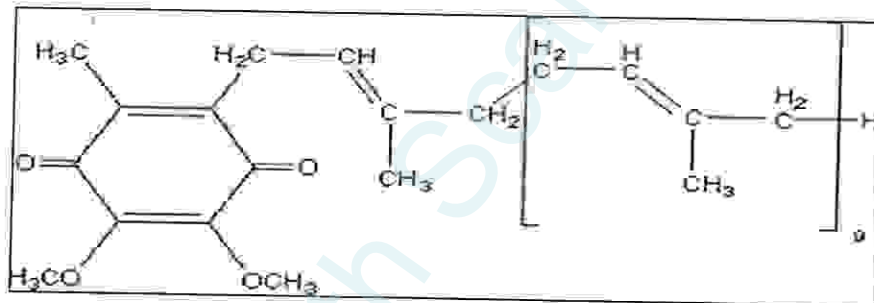
Schéma représente la structure chimique du β . Carotène

Schéma représente la structure chimique de l'ubiquinone.

Les milieux de culture

Gélose Chapman

Tableau représente la composition du milieu Chapman

Peptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	6
Lactose	20
Tergitol 7	0.01
TTC	0.025
Bleu de bromothymol	0.05
Agar	13
Eau distillée	1L

Gélose Muller Hinton

Tableau représente la composition du Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf	300,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17,0
Eau distillée	1L

Gélose nutritive

Tableau représente la composition de la gélose nutritive.

Peptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	6
Lactose	20
Tergitol 7	0.01
TTC	0.025
Bleu de bromothymol	0.05
Agar	13
Eau distillée	1L

Boillon nutritif PH=7.46**Tableau représente la composition de Boillon nutritif**

Pepton	5g
Extrait de viande	2g
Extrait de levure	1g
Chlorure de sodium Na Cl	5g
Eau distillée	1L

Produced with ScanTOPDF

Tableau représente la densité optique de réduction du DPPH[•] par les solutions méthanoliques de la *vitamine C*, à différentes concentrations massiques (mg/ml).

	Blanc 1	Blanc2				
DO	0,943	0,9				
Concentration (mg/ml)	DO1	DO2	inhibition 1	inhibition 2	moyenne	écartype
0,1	0,26	0,3	72,43	66,67	69,55	4,1
0,125	0,208	0,28	77,94	68,89	73,42	6,4
0,25	0,134	0,14	85,79	84,44	85,12	1,0
0,5	0,133	0,126	85,90	86,00	85,95	0,1
0,75	0,131	0,12	86,11	86,67	86,39	0,4
1	0,129	0,112	86,32	87,56	86,94	0,9
2,5	0,129	0,11	86,32	87,78	87,05	1,0
5	0,133	0,099	85,90	89,00	87,45	2,2

Tableau représente la densité optique de réduction du DPPH[•] par les solutions méthanoliques de la *quercétine*, à différentes concentrations massiques (mg/ml).

	Blanc 1	Blanc2				
DO	0,78	0,796				
Concentration (mg/ml)	DO1	DO2	inhibition 1	inhibition 2	moyenne	écartype
0,1	0,42	0,373	46,15	53,14	49,65	4,9
0,125	0,387	0,422	50,38	46,98	48,68	2,4
0,25	0,097	0,067	87,56	91,58	89,57	2,8
0,5	0,063	0,043	91,92	94,60	93,26	1,9
0,75	0,042	0,03	94,62	96,23	95,42	1,1
1	0,028	0,027	96,41	96,61	96,51	0,1
2,5	0,025	0,021	96,79	97,36	97,08	0,4
5	0,013	0,01	98,33	98,74	98,54	0,3

Tableau représente la densité optique de réduction du DPPH par les solutions méthanoliques de l'EEP à différentes concentrations massiques (mg/ml).

	Blanc 1	Blanc 2				
DO	0,632	0,727				
Concentration (mg/ml)	DO1	DO2	inhibition 1	inhibition 2	moyenne	écartype
0,1	0,525	0,532	16,93	26,82	21,88	7,0
0,125	0,533	0,565	15,66	22,28	18,97	4,7
0,25	0,415	0,468	34,34	35,63	34,98	0,9
0,5	0,265	0,387	58,07	46,77	52,42	8,0
0,75	0,2	0,242	68,35	66,71	67,53	1,2
1	0,023	0,085	96,36	88,31	92,33	5,7
2,5	0,023	0,064	96,36	91,20	93,78	3,7
5	0,021	0,05	96,68	93,12	94,90	2,5

Tableau représente la densité optique de réduction du DPPH par les solutions méthanoliques de la PCA à différentes concentrations massiques (mg/ml).

	Blanc 1	Blanc 2				
DO	0,896	0,94				
Concentration (mg/ml)	DO1	DO2	inhibition 1	inhibition 2	moyenne	écartype
0,1	0,346	0,45	61,38	52,13	56,76	6,5
0,125	0,318	0,387	64,51	59,36	61,94	3,6
0,25	0,192	0,282	78,57	70,00	74,29	6,1
0,5	0,293	0,27	67,30	71,28	69,29	2,8
0,75	0,28	0,21	68,75	77,66	73,20	6,3
1	0,196	0,182	78,13	80,64	79,38	1,8
2,5	0,131	0,129	85,38	86,28	85,83	0,6
5	0,136	0,126	84,82	86,60	85,71	1,3

Tableau représente la densité optique de réduction du DPPH par les solutions méthanoliques de *la PCF* à différentes concentrations volumique (ml/ml)

	Blanc 1	Blanc 2				
DO	0,896	0,94				
Concentration (mg/ml)	DO1	DO2	inhibition 1	inhibition 2	moyenne	écartype
0,1	0,346	0,45	61,38	52,13	56,76	6,5
0,125	0,318	0,382	64,51	59,36	61,94	3,6
0,25	0,192	0,282	78,57	70	74,29	6,1
0,5	0,293	0,27	67,3	71,28	69,29	2,8
0,75	0,28	0,21	68,75	77,66	73,2	6,3
1	0,196	0,182	78,13	80,64	79,38	1,8

Produced with ScanPDF

Les references

A

Abuja P M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress: lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, 2001, 306,1-17.

Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F et Nakayama T. L'activité antioxydante. Et constituants de la propolis recueillie dans divers domaines de la Chine. *Food Chem*, 2007, 101,1383-1392.

Alencar S M, T L C. Olodoni, M L. Castro, I S R. Cabral, C M. Costa_Neta, J A. Cury P L Rosalen, M . Ilkgaki. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis : red propolis. *Journal of ethnopharmacology*, 2007, 13. 278 _ 283.

Alexandare F. *Apiculture Aujourd'hui* ,Eds. Rustica, Paris (1984).

Alin C. Le rucher de rapport et les produits de la ruche. Eds. La renaissance, France (1996).

Alphandery r. La route du miel – Le Grand Livre des Abeilles et del'Apiculture, Paris, Nathan, 2002, 288p.

Aganga, A.A, Mosase, K.W. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of Lonchocarpus capussa, Ziziphus mucropata, Sclerocarya birrea, Kirkia acuminata and Rhus lancea seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, 91, 107-113.

Athamena S, I Chalghem, A. Kassah_ Laowar, S. L Laroui et S. Khebri. Activité Antioxydante et antibicrobienne d'extrait de cuminum cyminu L, 2010, 11, 1, 69_82.

A. Fernandes J R, Leoul L, Sforin I M. l'activité antibactérienne de la propolis, 2001, 72.

B

Babar Ali, M, Hahn, E.J, Paek, K.Y. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor RootSuspension Cultures.*Molecules*, 2007, 12, 607-621.

Bamforth. Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1999, 57, 81 90

Bankova V, G. Christov, G. Stoev, S.S .Popov, J Chromatography,1992, 607,150-153.

Bankova V, Mareucci mc, Castro sl. Propolis : Les progrès récents de la chimie et origine végétale *Apidologie*, 2000, 31, 3-15.

Barouki R et Y. MOREL. Cibles biologiques du stress oxydant. Potentiel rédox intracellulaire et stress oxydant. In: *InsERM U490, Centre Universitaire des Saints-Pères, Université René-Descartes, 75270 Paris cedex 06.*

Baskin S I, Salem H. Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. *Academic press Inc*, 1994, 363 (25-62).

Beaudeau J L , Dominique B R. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edition médicales. Internationales, 2005, p 550.

Besle J. M, Lamaison J. L, Pradel P, Fraisse D, Viala D. et Martin B. Les flavonoïdes des fourrages au lait. *Rencontres Recherches Ruminants*, 2004, 11, 67-70.

Blanc Michaël. Propriétés et usages médicaux des produits de la ruche. Diplôme de Docteur en pharmacie, 2010, 144.

Bondet V, Brand-Williams W, Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. *Food Science and Technology*, 1997, 30, 609-615.

Bouakaz, I. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna, 2006.

Boudiaf, K. Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister. Setif, 2006.

Bouzid W, Yahya M, Abdeddaim M, Aberkane M C et Ayachi A. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de l'Aubépine *Monogyna*, 2011, 12, 1, 449_70

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. La Voisier TEC et DOC, Paris, 2^{ème} édition, 1993, p. 268-277.

Budic-Leto. I, T. Lovric, J. *Food Technol and Biotechnol*, 2002, 40 (3), 221-225.

C

Cantin PA. Oxidant and antioxidants in lung injury. In: *Lung and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation*, Moss J. New York: Dekker, 1999, 519.

Castaldo et Francesco Capasso Stefano. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002, Volume 73, Supplement 1, Pages S1-S6.

Celiktas , O Y, Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, , Ozek, T., Baser, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 2007, 100, 553-559.

CHOI SH, CHO SK, KANG SS, BAE CS, BAJ YH, LEE SH, PAK SC. Effect of apitherapy in piglets with preweaning diarrhea, College of Veterinary Medicine and Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, Korea, 2003.

Cillard J, Cillard P. Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL*, 2006 ,13, 24-29.

Comhair S A A, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283, 246 - 255.

Cowan M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12 (4) : 564-570.

D

Dacosta, E. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 2003, 317p.

Dandiya p.-c, Dobrowolski j.-w, Naqui , Sharma k, Shaukat a.s, Vohora s.b. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products, *Journal of Ethnopharmacology* 35, Elsevier Scientific Publishers, Ireland.,1991.

Darrigol j.-l. Le miel pour votre santé, Saint Jean De Braye, Editions Dangles , 1979, 140p.

Delattre J. Radicaux libres et stress oxidant ed: TECDOC-Paris-New York. 2005, 620p.

Derbel S ,Ghedira. Les phytonutriments et leur impact sur la santé,2004. phytothérapie :28 ,34.

Di Carlo, G. Mascolo, N. Izzo, A. A. Capasso, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 1999, 65, 4, 337-353.

Dulger B et Gonuz A. Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences*, 2004, 7 (9), 1559-1562.

Durackova Z, Djrolo F, Houngbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M. Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozđjakova A (ed), 2008, P 19-43.

E

Elegami, A.A, Elnino, E.I, Eltohami, M.S, Muddathist, K. Antibacterial activity of some species of family Combretaceae. *Phytotherapy Research*, 2002, 16: 555-561.

Emerenciano V. P, Barbosa K. O, Scotti M. T et Ferriro M. J. P. Selforganising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society*, 2007, 18 (5), 891-899.

Erdman WJ, Balentine J. D, Arab L, Beecher G, Dwyer J. T, Folts J, Harnly., Hollman J. P., L-Keen C, Mazza , Messina M, Scalbert A., Vita J, Williamson G. et Burrowes J., Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 2007 , 137 (3 suppl), 718 s-737 s.

Eric debuyser. La propolis , thèse pour le diploma d'état de docteur en pharmacie. Université de nature , faculté de pharmacie, 1984.

F

Falleh H, Ksouri, R Chaieb, K Karray-Bouraoui, N Trabelsi, N Boulaaba, M Abdely, Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 2008, 331, 372-379.

Fargeix D. Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon, 2000.

Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 2003, 103-109.

Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr.*, 2006, 64, 390-396.

Ferhoum fatiha. Analyse physico chimique de la propolis locale selon les étages bioclimatique et les deux races d'abeilles locale. thèse de magister, Technologie Alimentaire. Algérie, 2010, 174.

F.Gert, S. Martens J. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 , 155-160.

Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI. Phospholipid Hydroperoxides Are Substrates for Non-selenium Glutathione Peroxidase. *The journal of biological chemistry*,1999, 274 , 21329 - 21334.

G

Gamet-Payraastre, L Manenti, S Gratacap, M.Pn Tulliez, J Chap, H Payraastre, B Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*, 1999, 32: 279-286.

Georgantelis D, Ambrosiadis, I Katikou, P Blekas, G Georgakis, S A. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxi

Gérard-Monnier D, Chaudière J. Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Path Biol*, 1996, 44, 77 - 85.

Ghedira K . Effets bénéfiques des métabolites secondaires (alcool et polyphénols) du vin rouge. *Phytothérapie*, 2003, 2, 37-41.

Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, 4, 162-169.

Gomez-Caravaca, A.M Gomez-Romero, M Arraez-Roman, D Segura-Carretero, A.,Fernandez-Gutierrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,2006, 41, 1220-1234.

Goudable J, Favier A .Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 1997, 11:115 - 120.
oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*,1997, 76,172-181.

H

Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*,1989, 70, 737 - 757.

Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*,1996, 44, 6-13.

Harborne, J. B. The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman & Hall/CRC, London, 1993.

Hatano T, Kusuda M, Inada, K Ogawa, T.O Shiota, S Tsuchiya, T Yoshida, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*,2005, 66, 2047-2055.

Hayouni, E, A Abedrabba, M Bouix, M Hamdi, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*,2007 (in press).

Heller, W Forkmann, G. The flavonoids. Harborne J.B, ed. London,1993, p 499.

Hollman, P. C. H.; Katan, M. B., Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*,1999, 37, (9-10): 937-942.

Hennbella, S, T,S . Sahabaz,F.Bailleul. polyphénols végétaux , sources , utilization et potentiel dans la lutte contre les stress oxydatif. *Phytothérapie*,2004, 1 , 3_6.

Hegazia A G, and Faten K, Abd El Hady. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. *Z. Naturforsch*,2001, 57c, 395- 402.

Houl J. R. S t, M. Paya ,J. *Gen. Pharmacol*,1996, 27, 713-722.

J

Jean M. P. Le guide pratique d'apiculture, Eds. Edisud. France, 1999.

K

Kalousouva M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res*,2002, 51,597-604.

Kamazawa S, Tanguchi M, Suzuki Y, Shumira M, Kwon M S et Nakayama T. antioxidant activity to polyphénols in carbo pods. *Journal of Agriculture and Food chemistry*,2002, 50,373_377.

Karaali A, Boyacioğlu D, Güneş G et Özçelik B. Flavonoids in fruit andvegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. Europeancommision's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey, 2004.

Kartal N, Sokmen, M Tepe, B Daferera, D Polissiou, M Sokmen, A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem*, 2007, 100, 584-589.

Karou D, Dicko M. H, Simporé J, Yameogo S, Sanon S. et Traoré A. S. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire, 2005, 8-11 novembre. Ouagadougou.

Katalinic V, Milos M. Kulisic T et Jakic M. Screening of 70 medicinal plant extract for antioxidant capacity and total phenol. *Food Chem*, 2006, 94, 550-557.

Keen C, Mazza G, Messina M, Scalbert A, Vita J, Williamson G et Burrowes J. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, 2007, 137 (3 suppl), 718 s-737 s.

Kedzia B, Holderna E. Investigations upon the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. *Herba Polonica*, 1986, 32: 187-195.

Kherd P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease critical. *Review in toxicology*, 1993, 23, 1, 21-48.

Kening Y, Vincenzo D. L et Normand B. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell*, 1995, 7, 1787-1799.

Kil, H.Y, Seong, E.S, Ghimire, B.K., Chung, I.M, Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D., Lee, D., Yu, C.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem*, 2009, 115, 1234-1239.

Koechlin R. C.Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2006, 20, 165-177.

Koleva I, van Beek T A, Linssen J. P. H , De Groot A. Evstatieva L. N. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Anal*, 2002, 13: 8-17.

Koné, W.M, Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., Dosso, M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93, 43-49.

Kumazawa S, T Hamasaka, Nakayama . L'activité antioxydante de la propolis d'origines variousegeographic. *Food Chem*,2004, 84:329-339.

L

Lahouel M, S Boulkour, N Segueni, J,P Fillastre. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pharmacologie expérimentale*,2004, 52,314–322.

Lahouel M. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans laprévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat del'université Mentouri de Constantine, 2005.

Lebeau J, Furman C, Bernier J. L, Duriez P, Teissier E, Cotelle, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids, *Free Radic. Biol. Med*, 2000, 29: 900-912.

Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2004, 3, 21-33.

Leterndre J. effet combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez *Mytilis edulis* :Mécanisemes enzymatiques antioxydats et approche protéomique. Thèse de doctorat. Université du Harve,2009, 343p.

Lhuillier, A. Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse, 2007.

Lindau-Schpard B, Shaffer J. Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Rad Biol Med* ,1993, 15 : 581 - 588.

Liviu Alexandru, Marghita Cristina, Mihai M, Flore Chirila, Daniel Sévère .L'étude de l'activité antimicrobienne Transylvanie(Roumanie)la propolis, 2010,38, 3, 40_44.

M

- Macheix J J**, Fleuriet A. et Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechniques et universitaires romandes, 2005, p4-5.
- Malešev D et Kuntić V.** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*, 2007, 72 (10), 921-939.
- Marcucci M.** propolis : chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 1995, 26, 83-99.
- Marfek A.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, 2003.
- Marmonier A. A.** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, technique usuelles, 1990, 227-236.
- Marquele F,** J Pharm Biomed Anal., Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations, 2005. 39(3-4), 455-462.
- Martin S,** Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 2002, 51, 304-315.
- Martin S,** Andriantsitohaina R. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 2002, 51, 304-315.
- Martini MC** and Seiller M. Actifs et additifs en cosmétologies., 3ème édition, Lavoisier, 2006, p338-350.
- Middleton E,** Kandaswami C et Theoharides T. C. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 2000, 52 (4) ; 673-751.
- Milane, H.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg, 2004.

Molyneux Philip. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technolb*, 2004, 26, 211-219.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*, 2005, 38, 565-570.

N

Narayana K R, Reddy M S, Chaluvadi M R et Krishna D R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 2001,33 , 2-16.

Natarajan D, John Britto S, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*,2005,102, 123-126.

Neuzil J, Stocker R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett*,1993, 331 (3),281 - 284.

Nilesh Kumar, Mueen Ahmd KK, Raman Dang et Ahmed Husain. L'activité antioxydante et antimicrobienne de la propolis sur les Tamil Nadu Zones, 2008, 2, 361_364.

N Takema, HB Arjun , T Yasuhiro, M Kiyoshi, M Katsumichi , K Shingetoshi , J. *Biol.Pharm. Bull*, 2003, 26(4) , 487-491.

P

Park H. J et Cha H. C. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*, 2003, 7, 327-330.

Parekh J. et Chanda S. V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology*, 2007, 31 , 53-58.

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K and Defraigne J.O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2002,16, 233–239.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* ,1994, 4(5)

R

Rajnarayana K, M Sripalreddy, M.R Chaluvadi, D.R Krishna, *J. Indian of Pharmacology*, 2001, (33), 2-16 .

Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Corbett JT, Deterding LJ, Tomer KB, Mason RP Cu, Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper- and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society*, 2008, 10, 1 - 25.

Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18, 427-442.

Raoul A. La route du miel :le grand livre des abeilles et de l'apiculture, Eds. Nathan, 1992.

Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, 2004, 75, 2717 - 2731.

Rice-Evans, C. A Miller, N. J Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolicacids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 20, (7), 933-956.

Rota M. C, Herrera A, Martínez R. M, Sotomayor J. A. et Jordán M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*, 2008, 19, 681-687.

Ribereau- Gayon, P. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod , Paris , 1968, 254 .

S

Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 1991, 30: 3875-3883

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*, 2005, 91, 621-632.

Sagdic, O., **Ozcan, M**. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 2003, 14, 141-143.

Shan, B, Cai, Y.Z, Brooks, J.D Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*, 2007, 117, 112- 119.

Sampson, L Rimm, E Hollman, P. C. H, De Vries, J. H. M Katan, M. B. Flavonol and Flavone Intakes in US Health Professionals. *Journal of the American Dietetic Association*, 2002, 102, (10), 1414-1420.

Sanogo, R Diallo, D Diarra, S Ekoumon, C Bougoudougou, F. Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical*, 2006, 1, 18-24.

Sarni-Manchado P et Cheynier V. Les polyphénols en agroalimentaire. EdLavoisier, 2006, p2- 10.

Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev*, 1996, 54, 1 - 30.

Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem*, 2007, 102, 938-953.

Szent-Györgyi A. Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale* 46 (995), 1893-1971.

T

Turkmen N, Velioglu, Y. S, Sari, F, Polat, G. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 2007, 12, 484-496.

U

Urquiaga I et Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 2000, 33 (2), 55-64.

V

Verhoeven M. E, Bovy A, Collins G, Muir S, Robinson S, De Vos C. H. R et Colliver S. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany*, 2002, 53 (377), 209 -210.

Y

Yen G.C and Duh P.D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *J Agric Food Chem*, 1994, 42, 629-632.

W

Wardman P, Candeias LP . Fenton chemistry , an introduction. *Radiat Res*, 1996, 145 (5) ,523 - 531.

Willems D, Dorchy H and Dufrasne D. Serum antioxidant status and oxidized LDL in well controlled young type 1 diabetic patients with and without subclinical complications. *Athéroxlerosis* 137 suppl, 1998, 561-564.

Williams R. J, Spencer J. P. E, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radical Biology & Medicin*, 2004, 36,838 – 849.

Produced with ScanTOPDF

Résumé

Le stress oxydant est considéré comme un déséquilibre entre antioxydant et prooxydants en faveur de ces dernier. Il est impliqué directement ou indirectement dans la pathogenèse de plusieurs maladies ce explique au moins en partie l'accumulation des recherches de nouvelles substances permettant de maître fin à ses dégâts pathologiques ou leur prévention. Aujourd'hui, la majorité des travaux de recherche s'orientent vers l'utilisation des produits de la ruche (miel, propolis, Gellée royale, pollen) considérées comme source énorme de multiples substances apithérapeutique.

Éteint un produit naturel fait par l'abeille, la propolis fait l'objet de notre travail. Nous avons étudié l'activité antioxydante et antimicrobienne des trois échantillons : l'EEP, la PCA, la PCF. On a commencé par la mise en évidence des flavonoïdes dans ces échantillons, de même nous avons les dosés par la méthode d' AlCl_3 qui nous a mène à conclure la présence des flavonoïdes dont la teneur la plus élevée en flavonoïdes est repérée chez la PCF ($2,555 \pm 0,276\text{mg EQ/ml de PCF}$), vient ensuite l'EEP avec une teneur 20 fois inférieure à celle de la PCF et enfin La PCA qui possède la teneur la plus faible en flavonoïdes de l'ordre de $0,033\text{mg EQ/mg de PCA}$.

L'étude expérimentale de l'activité antioxydante des échantillons de la propolis par l'évaluation de leurs pouvoirs antiradicalaires révèle que la PCF présente un pouvoir antioxydant plus élevé (99.80%) comparé à celui de à celle de l'EEP et la PCA.

L'activité antimicrobienne a été faite par la méthode de diffusion sur gélose contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats obtenues ont montré que L'EEP présente l'activité antibactérienne la plus forte dont la zone maximale de l'inhibition a été trouvé contre le *Staphylococcus aureus* variant de 8 mm à 18 mm à la concentration 1 mg / ml alors que la moindre était pour le *Escherichia coli* variant de 7 à 12 mm.

Mots clés : le stress oxydatif, la propolis, les flavonoïdes, l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne.

Abstract

Oxidative stress is considered a disequilibrium between antioxidant and prooxidant in favor of these last. He is involved or déirectement indéirectement in the pathogenesis of several diseases that explains at least in part the accumulation of research of new substances to end its master or pathological damage prevention. Today, most research is directed towards the use of bee products (honey, propolis, Royal Jelly, Pollen) considered huge source of multiple substances apitherapeutique.

Propolis is a natural product made by bees, it been our work. We investigated the antimicrobial and antioxidant activity of three Sample Pages: EEP, the PCA, the PCF. We started by setting Evidance flavonoids in these Sample Types, of the same we assayed by the method of $AlCl_3$ which led us to conclude the presence of flavonoids with the highest content of flavonoids is identified in the PCF (2.555 ± 0.276 mg EQ / ml PCF), then the EEP comes with a content of less than 20 times that of the PCF and finally PCA which has the lowest content of flavonoids in the range of 0.033 mg EQ / mg BCP.

The experimental study of the antioxidant activity of propolis samples by evaluating their antiradical power reveals that the PCF has a higher antioxidant capacity (99.80%) compared to that of the EEP and the PCA. The antimicrobial activity was done by the agar diffusion method against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. The results obtained showed that the EEP has the highest antibacterial activity with a maximum area of inhibition was found against *Staphylococcus aureus* ranging from 8 mm to 18 mm at a concentration of 1 mg / ml, whereas the least for *Escherichia coli* was between 7 and 12 mm.

Key words: oxidative stress, propolis, the flavonoids, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص

الإجهاد التأكسدي هو اختلال التوازن بين مضادات الأكسدة والمؤكسدات لصالح هذه الأخيرة. يشارك الإجهاد بطريقة مباشرة أو غير مباشرة في التسبب في أمراض عدة مما يفسر تراكم البحوث عن مواد جديدة تسمح بالحد من الضرر الذي يحدثه، في يومنا هذا معظم البحوث تنتج نحو استخدام منتجات النحل (العسل، العكبر، غذاء الملكات، حبوب اللقاح) وتعتبر هذه المواد مصدر ضخم من مواد متعددة من علاج النحل. العكبر هو أحد منتجات النحل الطبيعية، ونظرا لأهميته فهو موضوع دراساتنا. قمنا في هذه البحث بدراسة نشاط مضادات الميكروبات ومضادات الأكسدة لثلاثة عينات من العكبر: PCA, EEP, PCF. بدأنا من خلال تحديد وجود الفلافونويدات في هذه العينات، وقمنا بمعايرة العينات بواسطة طريقة $AlCl_3$ التي أدت بنا إلى استنتاج وجود مركبات الفلافونويد وفقا لأعلى محتوى من الفلافونويد والتي تم تحديدها (2.555 \pm 0.276) ملغ مكافئ PCF / مل ثم يأتي EEP مع محتوى أقل 20 مرة من PCF في النهاية PCA الذي لديه أدنى محتوى من الفلافونويد في مجموعة من مكافئ 0، 033 ملغ / ملغ PCA

الدراسة التجريبية لنشاط مضادات الأكسدة من عينات العكبر الثلاث من خلال تقييم قوتهم ضد الجذور الحرة تكشف أن PCF لديه قدرة عالية مضادة للأكسدة (99.80%) مقارنة بال PCA, EEP.

دراسة النشاط البكتيري تمت بطريقة الانتشار لكل من *Pseudomonas A Staphylococcus .a* و *E. coli, Klebsiella .p* وقد بينت أن EEP لديه أقوى نشاط مضاد للبكتيريا، بحيث أن الحد الأدنى للتثبيط ضد *E. coli* بين 8 و 17 ملغ لتركيز 1 غ / مل، في حين أن الأقل يكون *E. coli* 7 و 12 ملغ.

يمكن الاستنتاج من هذا العمل أن عينات العكبر أظهرت نشاط مضاد للبكتيريا و آخر مضاد للأكسدة فعال جدا.

تعتبر هذه النتائج التي تم الحصول عليها في المختبر هي المرحلة الأولى في البحث عن مواد طبيعية نشطة بيولوجيا، مما يستلزم القيام باختبارات إضافية يجب أن تكون قادرة على تأكيد الأداء ضد التأكسدي لهذه المواد.

كلمات المفتاح: الإجهاد التأكسدي - العكبر - الفلافونويدات - النشاط المضاد للأكسدة - النشاط المضاد للبكتيريا .