

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

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF, M'SILA
FACULTE DES SCIENCES, ET SCIENCES DE L'INGÉNIEUR
DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présenté par :

MOUDIR Naima.

En vue de l'obtention du Diplôme de :

Magister en Chimie.

Option: **Chimie Organique.**

Thème

**LES POLYPHENOLS DE LA *PROPOLIS*
ALGERIENNE**

Thèse soutenue le : 27/11/2004

Devant la commission d'examen composée de :

Président :	Dr. ZEGHOUGH Djidel	Maître de conférences, Université de M'sila.
Rapporteur :	Prof. SAADI Houcine	Professeur, Université de M'sila.
Examineurs :	Dr. ARRAR Lekhmici	Maître de conférences, Université de Sétif.
	Dr. OUALI Dehimi	Maître de conférences, Université de M'sila.

ملخص :

في هذا البحث، قمنا بدراسة إحدى منتجات النحل وهو البروبوليس أو ما يسمى بالعكبر، من أجل تحديد مكوناته الكيميائية وفعاليتها ضد الأكسدة والجنور الحرة.

قمنا بتجميع عينات من البروبوليس من أربع مناطق من الجزائر هي: قالمة، تيزي وزو، تلمسان و المسيلة .
بعد الاستخلاص بالايثانول (70 %)، قمنا بتحليل الراسب بواسطة جهاز كروماتوغرافيا الطور الغازي موصول بجهاز الطيف الكتلي ،
أظهرت النتائج المحصل عليها حوالي 90 مركب ، أغلبها بوليفينولات من أحماض وأسترات فينولية وفلافونيدات.
كما أجرينا اختبار مدى تأثير المستخلص الإيثيلي للبروبوليس على النشاط الأكسدي لحبيبات الدم المتعادلة، والمحرضة بواسطة fMLP و PMA .

بينت النتائج المحصل عليها، أن تركيز 1 ميكروغرام / مللتر له فعل تثبيطي جد قوي للأكسدة، بالنسبة للتحريض بـ fMLP ، أما بالنسبة للطريقة الثانية للتحريض، فإن التثبيط لم يكن مرضي حتى تركيز 2,5 ميكروغرام / مللتر.
هذه الفعالية ناتجة عن المركبات الفينولية التي يحويها البروبوليس .

Abstract

In this work, we made the study of one of the bee products that is the propolis, for the determination of its chemical composition, its antioxidant and scavenge of the free radicals effect.

The collect of samples was made in four regions of Algeria: Tlemcen, Tizi-Ouzou, Guelma and M'sila.

After the hydroethanolic extraction (70%), we analyzed the residual with the GC/MS device. We got about 90 compounds in the four samples, and the more part is polyphénols between phénolic acids and their esters and flavonoids.

The test of the antioxidant effect of the ethanolic extract of the propolis, on the polymorphonuclear neutrophils (PMNs), stimulated by fMLP and PMA, gave a very good results, these last showed that for the stimulation by fMLP, the concentration (1µg/ml) of the propolis extract of the four samples, has a high antioxidant effect, but in the stimulation by PMA, the propolis didn't show a considerable effect that from the concentration (2,5 µg/ml).

This effect is due to the phenolic compounds contained in the propolis.

Résumé

Dans ce travail on a fait l'étude de l'un des produits de l'abeille qui est la propolis, dans le but de déterminer sa composition chimique, et de tester son effet antioxydant et scavenge des radicaux libres.

On a fait la récolte de quatre échantillons de la propolis, de quatre régions de l'Algérie : Tlemcen, Tizi-Ouzou, Guelma et M'sila.

Après l'extraction hydrauéthanolique (70 %), on a analysé le résidu par la technique GC/MS. On a obtenu environ 90 composés dans les quatre échantillons, la plus part sont des polyphénols entre acides phénoliques et leurs esters et flavonoides.

On a testé l'effet antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis sur les neutrophiles humains (PMNs), stimulés par fMLP et PMA. Les résultats obtenus ont montré que pour la stimulation par fMLP, la concentration de 1µg/ml de l'extrait de propolis des quatre échantillons a un grand effet antioxydant, pour la stimulation par PMA, la propolis n'a pas montré un effet considérable qu'a partir de 2,5 µg/ml .

Cet effet est dû aux composés phénoliques contenus dans la propolis.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

- وأوحى ربك إلى النحل أن اتخذني من
الجبال بيوتا ومن الشجر ومما يعرشون
ثم كلّ من كل الثمرات فاسلكي سبل
ربك ذللا يخرج من بطونها شراب
مختلف ألوانه فيه شفاء للناس إن في ذلك
لآية لقوم يتفكرون =

سورة النحل الآيات 68-69

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur SAADI Houcine. Je tiens à le remercier vivement de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie, pour ces précieux conseils, ses critiques constructives ont beaucoup contribué à l'amélioration du manuscrit, et de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans le congrès national de chimie à l'université M'sila.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à l'esprit de Monsieur le Professeur SALOUM LAID, de m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et de me donner la possibilité de travailler en biochimie avec des appareils modernes, pour ses nombreux conseils et suggestions en tant que scientifiques et techniques.

Je remercie Madame le Professeur Vassya BANKOVA de l'Université de SOFIA – Bulgarie- d'avoir nous donner la possibilité de faire les analyses chimiques dans son laboratoire.

Je remercie Monsieur le Docteur Lekhmici ARRAR qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Djidel ZEGHOUGH d'avoir assuré la présidence du jury de thèse.

Comme je tiens de remercier Monsieur Dehimi OUALI qui a accepté de participer de juger mon présent travail.

Je remercie particulièrement Mr le Vis Recteur de L'université de M'sila, Mr : BOUDRAH Brahim pour son aide moral et matériel .**Merci**

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail. Je remercie en particulier Madame TIGRINE, Mademoiselle DJELLILI et tous le groupe de recherche du laboratoire de biochimie de l'université de Sétif.

Je remercie aussi tous les apiculteurs qui m'ont aider de récolter plusieurs échantillons à partir des différentes régions de l'Algérie je cite Mr MOUDIR Akli et Mr DAOUDI Lotfi

Bien que la thèse soit un travail individuel, elle n'aurait pu être menée à bien sans une équipe de collègues qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire, Je remercie pour cela tous mes collègues de laboratoire de phytochimie, spécialement Nouari, Nadia et K arima.

Toute ma gratitude va enfin à mon mari pour son soutien tout au long des mes études universitaires et durant cette thèse.

Sommaire

Introduction générale

I- PARTIE THEORIQUE

I-1- La propolis	3
I-1-1 définition	3
I-1-2 historique de la propolis	3
I-1-3 Utilisation de la propolis	4
I-1-4 Origine de la propolis	4
I-1-5 Récolte de la propolis	4
I-1-5-1 Par l'abeille.	4
I-1-5-2 Par l'homme	5
I-1-6 Propriétés physiques	6
I-1-7 Composition analytique	6
I-1-8 Composition chimique de la propolis	7
I-1-9 Activité antioxydante de la propolis	9
I-2 Les polyphénols	10
I-2-1 Acides et esters phénoliques	13
I-2-1-1 Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque	13
I-2-1-2 Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	13
I-2-1-3 Esters phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	14
I-2-1-4 Propriétés physico-chimiques	15
I-2-1-5 Extraction et propriétés chimiques des acides phénoliques	16
I-2-2 Les coumarines ...	16
I-2-2-1 Structures chimiques et classification ...	16
I-2-2-2 Aspect botaniques et phytochimiques des coumarines	18
I-2-2-3 Propriétés physico-chimiques	19
I-2-2-4 Biosynthèse	19
I-2-3 Les flavonoides	20
I-2-3-1 Structures chimiques	20
I-2-3-2 Sources des flavonoides	22
I-2-3-3 Biosynthèse	22
I-2-3-4 La substitution de squelette flavonique	24
I-2-3-4-1 La O –substitution	24
I-2-3-4-1-a L'hydroxylation	24

I-2-3-4-1-b La méthylation	25
I-2-3-4-1-c La O-glycosylation	25
I-2-3-4-2 La C –substitution	25
I-2-3-4-2-a La C- méthylation	25
I-2-3-4-2-b La C-glycosylation	26
I-2-4- Analyse spectral des composés phénoliques	26
I-2-4-1 Les méthodes de séparation et de purification	26
I-2-4-1-1 Chromatographie sur colonne	26
I-2-4-1-2 Chromatographie sur couche mince	27
I-2-4-1-3 HPLC	27
I-2-4-2 Méthodes d'analyse structurelle	29
I-2-4-2-1 Spectrophotométrie UV- Visible	29
I-2-4-2-2 La Spectroscopie IR	31
I-2-4-2-3 La spectrométrie MS	31
I-2-4-2- 4 La Spectrométrie RMN	32
I-2-5 L'activité Antioxydant des polyphénols	34

II- RESULTATS & DISCUSSIONS

II-1 Extraction	37
II-2 Analyse chimique	37
II-2-1 Résultats	37
II-2-2 Discussion	61
II-3- Effet antioxydant	63
II-3-1 isolement et cytotoxicité des PMNs	63
II-3-2 Stimulation par fMLP	65
II-3-2-1 Résultats	65
II-3-2-2 Discussion	68
II-3-3 Stimulation par PMA	69
II-3-3-1 Résultats	69
II-3-3-2 Discussion	72
II-3-4 IC50	72
II-3-5 Discussion des résultats de l'activité antioxydante	73

III-MATÉRIEL & MÉTHODES

III-1 Récolte de la propolis	76
III-2 Extraction	76
III-3 Analyse chimique (GC/MS)	77
III-3-1 Réactifs	77
III-3-2 Discription de l'appareil	78
III-4- Activité antioxydante	79
III-4-1 Préparation des échantillons de la propolis	79
III-4-2 Isolation des neutrophiles	80
III-4-2 -1 comptage des PMNs	80
III-4-2 -2 Viabilité des PMNs	81
III-4-3 Solutions et réactifs utilisés	81

Conclusion générale

Références Bibliographiques

Annexes

Introduction générale

La propolis ou colle d'abeille est un mélange complexe de plusieurs composés organiques, et inorganiques, utilisée par l'abeille comme colle, enduit et antibiotique.

Elle la récolte à partir des résines de certaines arbres, spécialement le peuplier, au niveau des bourgeons et écorces, puis elle l'additionne ces propres sécrétions ; cette matière balsamique gommeuse a attiré l'attention de l'homme qui l'utilisée au début, dans la médecine traditionnelle comme un antiseptique, antibiotique et anti-inflammatoire ; Récemment a intéressé plusieurs chercheurs, car ce produit du moins très bénéfique pour l'abeille, suscite beaucoup d'intérêts pour l'homme, et constitue un élément susceptible de fournir de nouveaux produits, qui pourraient avoir une protection pour la santé humaine et animale ; actuellement elle est employée dans des milliers de pharmacies de monde, des centres médicaux, des cliniques de médecine humaine ou vétérinaire, des laboratoires expérimentaux.

Dans le monde entier, de nombreuses études sont consacrées à la propolis, source importante de composés phénoliques, notamment les flavonoides; divers substances de propolis récoltées de différentes régions de monde ont été identifiées; dont les acides phénoliques, les flavones, les flavonols et les flavanones marquent leur présence permanente - éléments standards de la propolis-. Ces composés phénoliques possèdent certaines activités biologiques : germicide, bactériostatique, anti-inflammatoire et anti-viraleetc..

C'est pour cela qu'on a jugé utile de réaliser ce travail sur la propolis algérienne, dont notre objectif est de caractériser les polyphénols de cette précieuse matière récoltée sur le territoire algérien, et de tester leurs applications thérapeutiques.

Dans notre travail nous avons récolté quatre échantillons de différentes régions de l'Algérie : l'est (Guelma), le centre (Tizi-ouzou), l'ouest (Tlemcen) et le sud-est (M'sila).

Puis nous avons étudié sa composition chimique - en polyphénols-, en utilisant une méthode d'analyse très développée (GC/MS).

Le deuxième volet de ce travail est de tester la capacité biologique de cette matière précieuse, ou nous sommes intéressés à l'une de ses activités biochimiques, c'est l'activité antioxydante en utilisant une méthode très récente, c'est la chimiluminescence, en stimulant des neutrophiles humains par fMLP et PMA.

Pour cela nous avons présenté notre travail en trois chapitres :

- Le premier est la partie théorique, ou nous avons parlé de la propolis, son origine, son utilisation comme nous avons cité quelques études déjà faites.

La partie dominante de la composition de la propolis - les polyphénols- a eu la part du lion dans ce chapitre : leurs classifications et biosynthèses, les différentes techniques de leurs identifications et leur importance biologique.

- Le deuxième chapitre illustre les résultats obtenus, leurs interprétations et discussions.
- Le troisième chapitre expose les différentes techniques et protocoles opératoires utilisés, ainsi que les descriptions de produits et matériels mis en service.

I-1 LA *PROPOLIS*

I-1-1 DEFINITION

La *Propolis* désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux (certains arbres principalement) par les abeilles, qui les rapportent à la ruche et qui les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement).^{[1] [2]}

I-1-2 HISTORIQUE DE LA *PROPOLIS* :

Depuis la plus haute antiquité l'homme s'est intéressé aux abeilles et à ses produits : le miel, le pollen la cire, le venin, la gelée royale et en fin la *Propolis*.

La *Propolis* est beaucoup moins anciennement connue que le miel, des études confirment que son utilisation remonte à l'Egypte antique et de façon certaine au Grecs^{[3] [4]}; d'où viens son nom « pro » : en avant et « polis » signifie la cité ou la ville ^[3], en fait ce nom provient du fait que les abeilles utilisent cette substance à l'entrée de la ruche^[5].

Les anciens égyptiens, l'utilisaient pour embaumer les corps des défunts, en enduisant avec de la *Propolis* les bandelettes des momies, pour leur assurer une meilleure conservation, et pour soigner et anesthésier les caries dentaires.^[1]

Aristote en parle dans son livre « Histoire des animaux » et la considère comme « remède aux infections de la peau, plaies et suppurations ». ^[6]

Les arabes s'en servaient pour traiter les eczémas, et atténuer les douleurs musculaires ou rhumatismales.^[7]

En Europe, on trouve quelques traces de son usage, dans le traitement des plaies aux 18 et 19^{eme} siècle, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du Sud , qu'elle connaît son apogée d'utilisation, dans le cadre de ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes^[6].

En EX URSS (union soviétique) les apiculteurs ont utilisé la *Propolis* comme un médicament pour les animaux depuis le début de 19 ° siècle ^[8]

I-1-3 UTILISATION DE LA PROPOLIS DANS LA RUCHE :

La *Propolis* est utilisée à de nombreuses fins à l'intérieur de la ruche :

- Pour construire éventuellement de véritables barrières de défense.
- Pour rendre la ruche parfaitement hermétique, permettant une bonne isolation thermique.
- Pour vernisser l'ensemble des surfaces intérieures, afin d'en supprimer les aspérités.
- Pour recouvrir d'une fine pellicule les nouveaux rayons, ainsi que l'intérieur de la totalité des cellules avant que la reine ne vienne y pondre (sorte de stérilisation).
- Pour enduire, combinée avec de la cire, les petits animaux ou insectes, qui ne peuvent être évacués, sorte d'embaumement s'opposant ainsi à toute décomposition putride.
- Enfin, pour consolider les cadres.^{[9] [10]}

I-1-4 ORIGINE DE LA PROPOLIS :

La *Propolis* à deux origines :

- a- origine externe : les principales essences d'arbres, connues pour être productrices de *Propolis* sont représentées par différents conifères : pin, sapin, épicéa ; plusieurs espèces de peupliers (qui semble la source la plus importante); l'aulne; le saule; le marronnier d'Inde; le bouleau; le prunier; le frêne ; le chêne et l'orme.
- b- origine interne : d'après les chercheurs allemands; la *Propolis* serait résidu résineux, provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe, situé entre le jabot et l'intestin moyen^[10].

Il faut toutefois noter que la *Propolis* diffère, tant de point de vue qualitatif que quantitatif des résines végétales, dont elle est issue ; la matière résineuse brute est additionnée de cire, de sécrétions salivaires de pollen et de divers impuretés, donnant naissance à une substance tout à fait originale.

La structure microscopique de la *Propolis* est maintenant assez bien connue grâce au microscope électronique à balayage^[2].

I-1-5 RECOLTE DE LA PROPOLIS :

I-1-5-1 : Par l'abeille :

La récolte de la *Propolis* est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses très spécialisées dans cette activité, puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie, si ce n'est un travail en relation directe avec cette récolte, à savoir le colmatage à l'intérieur de la ruche.

Cette récolte, qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons dégager et analyser les plus notables :

- Facteur saisonnier : la récolte a lieu, selon les cas, soit au début de la saison, c'est-à-dire au printemps, mais le plus souvent et principalement à la fin de la miellée ou soit à l'approche de l'automne, au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage ; de plus, il faut mentionner qu'au moment où la miellée de nectar est la plus abondante, que la récolte de *Propolis* est la moins importante, les abeilles semblant alors y consacrer moins de temps et moins d'efforts;
- Facteur géographique : c'est ainsi, entre autres, que les ruches situées dans les régions boisées, propolisent davantage que les ruches de plaine.
- Facteur climatique : les abeilles spécialisées dans la récolte de la *Propolis*, déploient en général leur activité au cours des journées chaudes (température le plus souvent supérieure à 20°C) et en outre, pendant les heures les mieux exposées, à cette chaleur, ceci du fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires;
- Race d'abeilles: c'est ainsi qu'il est reconnu que les Caucasiennes et certaines autres races d'Asie Mineure propolisent en général davantage que les autres, mais dans de nombreux autres cas, les données d'information en ce qui concerne ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises. ^[1]

I-1-5-2 Par l'homme :

L'homme récolte la *Propolis* par plusieurs méthodes :

- Par grattage : cette méthode consiste à gratter la *Propolis* qui dispose sur les parois internes de la ruche, et sur toute la circonstance des cadres.
- Par les grilles : c'est une méthode très efficace qui donne une très bonne qualité de *Propolis* ; elle consiste à mettre des grilles ou des toiles à l'entrée de la ruche, l'abeille bouche par de la *Propolis* les interstices des grilles ou toiles, l'apiculteur change toutefois ces toiles ou grilles, il les mis dans un congélateur pendant quelques heures, la *Propolis* se décolle facilement des grilles. ^[5]

I-1-6 PROPRIETES PHYSIQUES :

La *Propolis* se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable, en fonction de la température ; dure et friable à 15°C, molle et malléable aux alentours de 30°C, et collante et gluante au-dessus, jusqu'à fondre vers 60-70°C en moyenne, mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C, et au-delà, chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en 2 parties bien distinctes : l'une visqueuse qui tombe au fond, l'autre liquide (cire de *Propolis*), qui surnage à la surface. Elle trouve nombreux usages dans le domaine apicole. [2]

la *Propolis* a une couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toute une gamme de bruns extrêmement riche et étendue^[1], une saveur souvent âcre et parfois amère. Son odeur est variable selon son origine; en général 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 d'encens très délicate en rapport avec les résines aromatiques qu'elle contient. [2]

La *Propolis* est peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, etc..., et seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants^[4].

I-1-7 COMPOSITION ANALYTIQUE

La composition de la *Propolis* est variable selon la source végétale visitée par les abeilles, mais présente tout de même qualitativement de nombreuses substances, qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable, constance vérifiée et confirmée par des travaux d'analyse chromatographique, effectués sur de très nombreux échantillons.

Globalement et généralement, la *Propolis* recueillie dans la ruche est constituée de :

- 50 à 55% de résines et baumes;
- 25 à 35% de cire (soit 30% en moyenne) ;
- 10% d'huiles volatiles ou essentielles;
- 5% de pollen (les pollens présents dans la *Propolis* le sont par accident, au même titre que ceux retrouvés partout dans la ruche);
- 5% de matières diverses organiques et minérales.

Elle est riche d'un grand nombre de substances minérales, et d'oligo-éléments, parmi lesquels nous trouvons en particulier : Al , Cr, Cu ,Fe, Zn, Si, Ni, Pb, Mn et Co.^[11]

I-1-8 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PROPOLIS :

Plusieurs études, ont été sacrées pour déterminer la composition chimique de la *propolis* :

Marekov et autres^[12] ont étudié la composition chimique de la *Propolis* Bulgare, en utilisant des méthodes d'analyses chromatographiques et spectrales : HPLC, MS, RMN.

Ils ont distingué que la *Propolis* est une substance très complexe de composés naturels, et ils ont identifié un nombre important de polyphénols et de flavonoides (flavones, flavonones et flavonoles), ces composés représentent un grand pourcentage de la composition de la *Propolis*.

Bankova et autres^[13] ont utilisé la méthode de la chromatographie capillaire, pour la détermination des composés phénoliques contenus dans la *Propolis*, ils ont isolé quatre éléments phénoliques, comme ils ont testé l'effet biologique de ces composés; et conclure à la fin que la meilleure extraction de la *Propolis* est l'éthanol dilué à 70 %. Après avoir fait leurs tests biologiques, ces éléments identifiés ont montré une grande efficacité.

Bankova et Christov^[14] ont étudié les composés phénoliques de la *Propolis*, en utilisant une autre méthode, qui été la technique la plus développée à l'époque :la chromatographie en phase gazeuse (GC) avec un détecteur électronique; ils ont abouti à la quantification des composés phénoliques particulièrement les flavonoides .

Zhou et autres^[15] ont analysé la *Propolis* de la région de Beijing, en basant sur l'étude des flavonoides, dont ils ont identifié pour la première fois 3 nouveaux flavonoides.

Bankova et autres^[16] ont analysé les composés phénoliques de la *Propolis* bulgare et mongolienne, pour déterminer la relation composition - flore ; cette étude a montré que la composition chimique des deux échantillons, ressemble à celle des bourgeons de peupliers, qui se trouve dans ces régions.

Giuseppina N et autres^[17] ont fait l'étude de 14 échantillons de la *Propolis* brésilienne, en utilisant des méthodes d'analyses chromatographiques et spectroscopiques, pour déterminer les pourcentages des composés organiques, selon le nombre de carbone qu'ils contiennent. Ils ont trouvé que les composés avec C₂₄ et C₃₂ sont les plus dominants ; comme ils ont montré que la richesse de la *Propolis* dépend de la diversité florale de site ou elle a été prélevée.

Marcucci et autres ^[18] ont inspecté les composés phénoliques dans la *Propolis* brésilienne, et ils ont étudié la relation qui existe entre la composition chimique et le site géographique : 18 composés phénoliques ont été identifiés par HPLC, l'interprétation des résultats a permis de classer les échantillons en 3 catégories selon les 3 sites de prélèvement ; à cet effet une relation composition chimique- source florale a été vérifiée.

Velikova M et autres ^[19] ont cherché l'influence des facteurs géographiques, climatiques et la race de l'abeille sur la qualité de la *Propolis*, plus exactement sur sa composition chimique ; et ils ont fait des analyses GC-MS pour déterminer par exactitude la composition des 21 échantillons provenant de 12 régions différentes de Brésil.

Bankova et autres ^[20] ont étudié 10 échantillons de la *Propolis* : 4 de la Bulgarie ; 3 de l'Italie et 3 de la Suisse. Ils ont montré l'influence de la flore, le site et la période de la récolte, sur la qualité de la *Propolis* ; comme ils les ont comparés avec la *Propolis* standard (*Propolis* de peuplier), d'après cette étude, le pourcentage des composés phénoliques varie entre 40 et 75 %, cela est semblable pour tous les échantillons, à l'exception de celui de l'Italie qui a été récolté d'une région pauvre en peuplier. D'après ces chercheurs, il a eu un pourcentage très bas en composés phénoliques (1,3 %), par contre il a été très riche en terpènes (53,2%), ceci a été justifié par l'absence du peuplier dans la région de prélèvement.

Après l'étude de plusieurs échantillons de la *Propolis* des différentes régions du monde, Bankova ^[21] a abouti à la standardisation des méthodes de traitement de la *Propolis* ; dont 7 points ont été posés.

Velikova M et autres ^[22] ont étudié plusieurs échantillons de *propolis* de la région méditerranéenne, - dont deux échantillons de l'Algérie (M'sila et Constantine) - en collaboration avec le professeur SAADI Houcine, cette étude a permis de comparer la composition chimique de ces *propolis*, les résultats obtenus ont prouvé que le climat, et la flore ont une influence directe sur la qualité de la *propolis*, les deux échantillons de l'Algérie ont montré des quantités considérables en terpènes.

Shigenori et autres ^[23] ont étudié la *Propolis* de la région de l'Uruguay, ils ont identifié 18 flavonoides, dont 2 constatés pour la première fois dans la *Propolis* ; 4 acides aromatiques et 11 composés phénoliques. La composition chimique de la *Propolis* de cette région est similaire à celles de la Chine et de l'Europe, d'après les chercheurs cette similarité montre qu'elles sont de même source botanique.

Deux échantillons de la *Propolis* de Turquie ont été analysés par Murat et autres ^[24], dans cette étude 24 composés ont été identifiés pour la première fois dans la *Propolis*. 8 constatés dans le premier échantillon et 18 dans le second.

Chia Ch Chang et autres ^[25] ont identifié les flavonoides contenus dans la *Propolis*, en utilisant 2 méthodes colorimétriques. Les pourcentages des flavonoides d'après CHIA varient entre 10,38 et 25,13%)

I-1-9 L'activité anti-oxydante de la *Propolis* :

La *Propolis* a prouvé une activité antioxydante très forte, due à sa composition chimique, elle contient un grand pourcentage des flavonoides et des polyphénols qui sont très connus comme des antioxydants très forts ^[26].

On cite dans ces lignes quelques études déjà faite :

Yanishlieva et autres ^[27] ont testé l'efficacité de l'extrait méthanolique de la *Propolis*, et ses flavonoides isolés, comme des anti-oxydatives sur des systèmes lipides. Ils ont conclu que l'effet anti-oxydant n'est pas dû uniquement aux flavonoides, mais à d'autres éléments comme l'acide caféique et ces dérivés.

Krol et autres ^[28] ont isolé 19 composés phénoliques de EEP, pour les tester sur les radicaux libres générés par des neutrophiles stimulés par PMA, en utilisant la technique de chimiluminescence.

Une grande influence été prouvée à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dont le phenethyl-ester d'acide caféique été considéré comme l'élément ayant le plus grand effet, d'autres part trois flavones et trois flavonoles, à la même concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ ont diminué la chimiluminescence avec un pourcentage de 73-93 % . De cette étude, ils ont concluent que tous les composés phénoliques de la *Propolis* ont une très forte action anti-inflammatoire.

Une étude de la *Propolis* de l'Argentine est faite par Maria et autres ^[29], dont ils ont étudié la composition chimique de la *Propolis* de déférentes régions de l'Argentine. Ils ont déterminé que la quasi-totalité de sa composition sont des flavonoides, aussi ils ont testé l'influence de ces derniers sur les radicaux libres. Les résultats obtenus montrent qu'une concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ de chaque échantillon donne une inhibition allant de 20 à 70 %.

Yun seon Song et autre ^[30] ont testé l'effet de l'extrait alcoolique de la *Propolis* (EEP), sur l'oxyde nitrique (NO) synthétisé par le iNOS (nitric oxide synthase), des résultats satisfaisants ont été obtenus, en ce qui concerne l'inhibition de ces deux éléments responsables de l'inflammation, cette étude a prouvé l'activité anti-inflammatoire de la *Propolis*.

La réduction des radicaux libres par la *Propolis* été étudié par Ichkawa et autres ^[31], des concentrations utilisées à l'ordre de 2% avaient un grand effet d'inhibition sur le superoxyde généré.

I-2 Les Polyphénols

Les composés phénoliques, forment un grand groupe hétérogène de métabolites secondaires des plantes, ils sont très répandus dans le règne végétal, synthétisés par plusieurs voix, au points qu'ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement.

Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales. C'est pourquoi 80% des composés phénoliques vont être essentiellement dans les tissus épidermiques des fruits.

Ceux sont des phytomicronutriments et ceux sont généralement des pigments, responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge). [32]

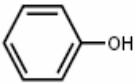
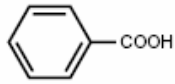
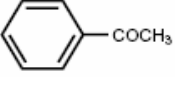
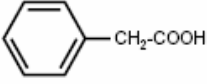
C'est une classe constituée d'environ 8000 composés. Ils sont devisés en plusieurs catégories :

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

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyl, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside.

Donc les composés phénoliques présentent une très grande variété de structures. [33]

Le tableau suivant montre les structures de base de quelques classes des polyphénols [34] :

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Structure de base
6	C_6	Phénols simples benzoquinones	 
7	$C_6 - C_1$	Acides phénoliques	
8	$C_6 - C_2$	Acetophénone , acides phénylacétique	 

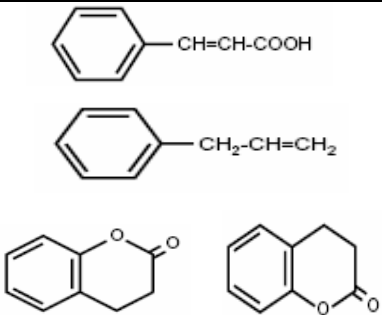
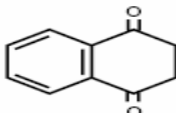
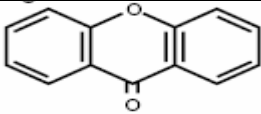
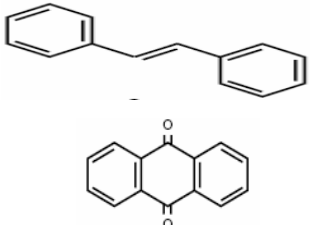
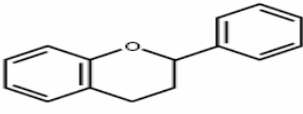
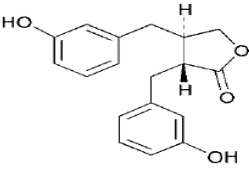
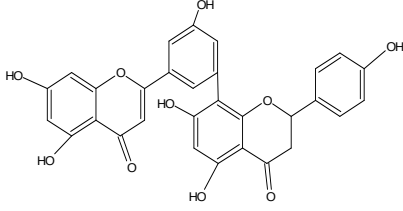
9	$C_6 - C_3$	Acides hydroxycinnamiques , phenylpropenes , coumarines, isocoumarines	
10	$C_6 - C_4$	Naphtoquinones	
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xanthenes	
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbenes anthrachinones	
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides et isoflavonoides	
18	$(C_6 - C_3)_2$	Lignanes	
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Biflavonoides	
n	$(C_6 - C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Lignines Caticholmelagnines Tanins condensés	

Tableau N° 1 : Squelette carbonique de quelques classes des polyphénols

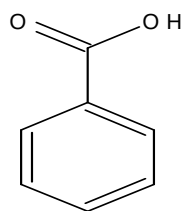
Ils sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires des polyphénols sont : les fruits et légumes, les boissons (thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols.

Les petits fruits sont extrêmement riches en acides phénoliques, comme la myrtille. Les flavonols sont essentiellement apportés par l'oignon, pomme, brocoli, haricots verts, chou, petit fruit et thé.

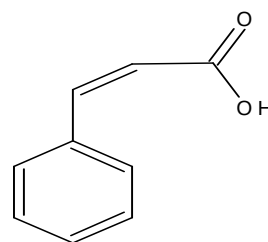
On trouve des flavanones dans les agrumes, des isoflavones dans la soja, des flavanols dans le thé, des anthocyanes dans les fruits et légumes colorés (rouges ou bleus) et pro-anthocyanidines dans divers fruits et boissons (thé, cidre et chocolat) [32]

On se limite dans cette étude aux groupes suivants :

- **Les acides phénoliques** : le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyl phénolique. [33] 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 (1) et l'acide cinnamique (2) [35]



(1) Acide benzoïque



(2) Acide cinnamique

- **Les coumarines** : tirent leur nom de « coumarou » qui est le nom vernaculaire de fève tonka (*Dipteryx odorata Willd ; Fabaceae*) d'où fut isolée en 1820 la coumarine [33]. Ils sont responsables de l'odeur caractéristique de foin ; ils sont très toxiques. En 1996 au moins 1300 coumarines ont été identifiées [36].

- **Les flavonoïdes** : L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner tous les pigments ayant un squelette $C_6-C_3-C_6$, analogues à celui des flavones (y compris les anthocyanes), provenant du latin flavus qui signifie jaune [37].

On recense 4000 flavonoïdes dans le règne végétal ; les flavonoïdes sont eux-mêmes classés en fonction de leurs degrés d'oxydation en 6 grandes classes.

I-2- 1 ACIDES ET ESTERS PHENOLIQUES :

I-2-1-1 Acides – phénoliques dérivés de l'acide benzoïque :

Les acides phénoliques en C_6-C_1 , dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque (*Fig.1*), sont très commun aussi bien sous forme libre que combiné, à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère sont les éléments constitutifs des tanins hydrolysables^[33].

Le tableau N°2 montre quelques structures de ce type d'acide phénolique^[38].

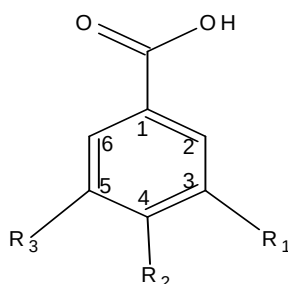


Fig. 1 : Structure de base des acides - phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

Tableau N° 2 : Acides - phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

Nom	R1	R2	R3
Acide benzoïque	H	H	H
Acide hydroxy-4- benzoïque	H	OH	H
Acide méthoxy-4- benzoïque	H	OCH ₃	H
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide vanillique	OCH ₃	OH	H

I-2-1-2 Acides - phénoliques dérivés de l'acide cinnamique :

La plus part des acides phénoliques en C_6-C_3 : acides p-coumarique, caféique, ferulique (tableau N°3) ont une distribution très large; les autres (Ex : acide 2-coumarique (3)) sont peut fréquents. Rarement libres, ou alors sont des artefacts, ils sont souvent estérifiés^[33].

Le tableau N° 3 montre quelques structures de ce type d'acide phénolique^[38].

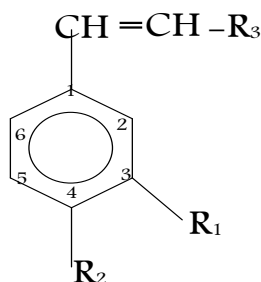
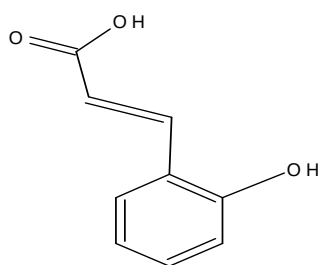


Fig. 2 : Structure de base des acides - phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

Tableau N° 3 : Acides - phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

Nom	R1	R2	R3
Acide cinnamique	H	H	COOH
Acide p-coumarique	H	OH	COOH
Acide caféique	OH	OH	COOH
Acide Férulique	OCH ₃	OH	COOH
Acide Isoférulique	OH	OCH ₃	COOH

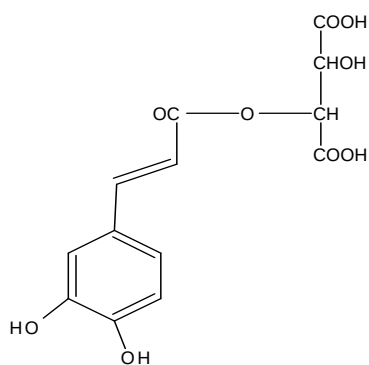


(3) Acide 2- coumarique

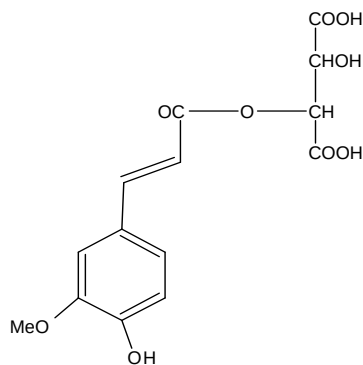
I-2-1-3 Esters phénoliques dérivés de l'acide cinnamique :

Après estérification des acides précédents on aura les esters suivants :

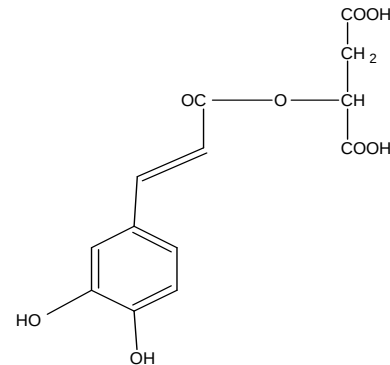
- Ester d'alcools aliphatiques (acide caféoyl-tartrique(4), féruloyl-tartrique (5) et caféoyl-malique (6))



(4) Caféoyl-tartrique

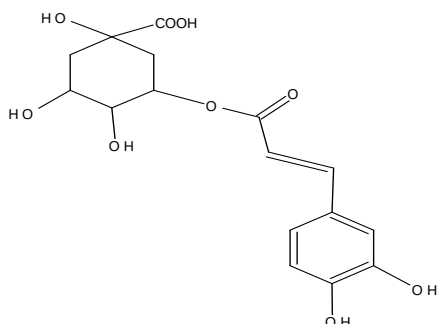


(5) Féruloyl-tartrique

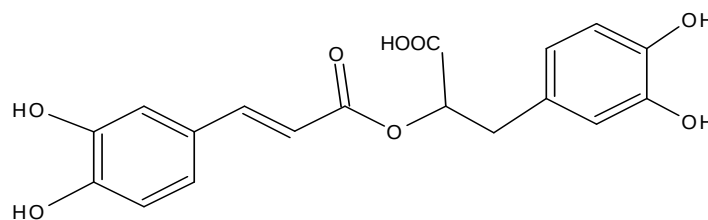


(6) Caféoyl-malique

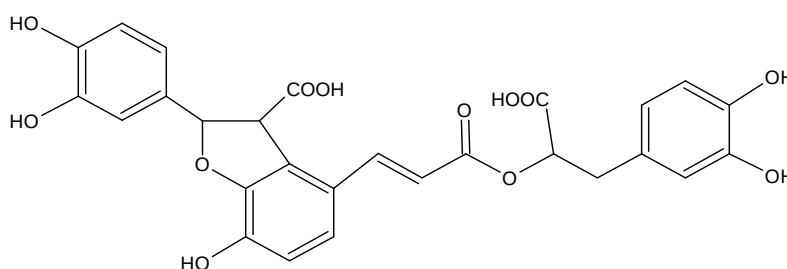
- Ester de l'acide quinique (acide chlorogénique (7)) et acide rosmarinique (8) et lithospermique (9). Ils peuvent également être amidifiés, ou combinés avec des sucres : ester de glucose (c'est la cas le plus fréquent) ou éther du glucose. [33]



(7) Acide chlorogénique



(8) Acide rosmarinique



(9) Acide lithospermique

I-2-1-4 : propriétés physico-chimiques :

Les phénols sont en principe solubles dans les solvants organiques polaires ; ils sont aussi solubles dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium.

Les acides phénoliques sont solubilisés par les hydrogénocarbonates ; ils sont extractibles par les solvants organiques en milieu légèrement acide.

Les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques sont, classiquement, solubles dans l'eau. Tous ces composés sont instables. Tous les phénols sont facilement oxydables, surtout en milieu alcalin, les dérivés cinnamiques tendent à s'isomériser en solution aqueuse sous l'influence de rayonnement ultraviolet.

Les ester cinnamiques d'hydroxy-acides, s'isomérisent facilement, en milieu acide ou alcalin pour donner des mélanges d'isomères de position acide chlorogénique (7) [33]

I-2-1-5 Extraction et propriétés chimique des acides phénoliques :

L'extraction de ces composés, conduite de préférence sur du matériel frais, est généralement obtenue à l'aide d'un alcool, mais pour extraire moins de substances lipophiles et éviter une estérification partielle des acides phénoliques, une solution hydro –alcoolique est favorisée.

Compte tenu de la fragilité de ces molécules, il est recommandé de travailler sous atmosphère inerte, d'éviter les PH excessifs et de concentrer les solutions extractives à basse température (30°C).

Une réextraction de la solution aqueuse par les solvants non miscibles, de polarité croissante, permet de séparer les formes libres, les esters et les hétérosides

L'analyse des composés phénoliques simples, et des acides phénoliques d'un végétal est couramment réalisée en CCM, en CPG (après silylation) et/ou en HPLC .

La CCM utilise des mélanges solvants, contenant les plus souvent un acides (acétique, formique) et des supports de type cellulose, silice ou mélange des deux. Les plaques sont révélées par des réactifs généraux des phénols (chlorure ferrique, vanilline chlorhydrique, 2,6-dichloroquinone chlorimide en milieu alcalin).

La méthode analytique de choix est la HPLC. En règle générale elle est mise en œuvre sur des phases inverses (Ex : C₁₈), éluées avec des mélange d'eau, d'alcools (et/ou d'acétonitrile) et d'acides (pour limiter l'ionisation) ^[33] .

I-2 -2 : LES COUMARINES :

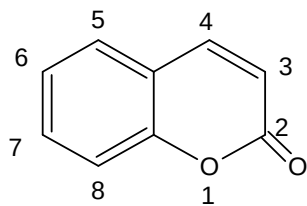
Les coumarines sont des substances phénoliques, formées de l'union de noyau benzénique et α -pyrone^[39] .

Ils ont plusieurs activités biologiques : anti-inflammatoire, antivirale. Vu 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.^[40]

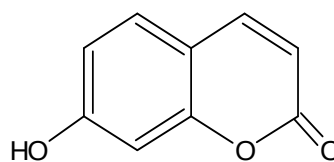
I-2-2-1 Structure chimique et classification :

En dehors de quelque cas, dont la coumarine (10) elle-même, toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyl . La 7-hydroxycoumarine (11), connue sous le nom d'ombelliférone (11) est le précurseur de 6,7-dihydroxycoumarine (12) et 6, 7,8-trihydroxycoumarine (13).

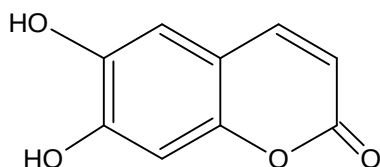
Les hydroxyls de ces coumarines simples peuvent être méthylées ou, cela n'est pas rare, l'un d'eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique ^[33]



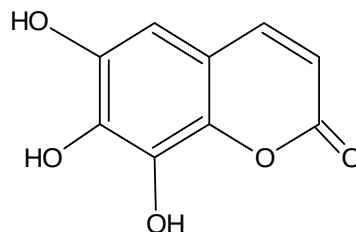
(10) Coumarine



(11) Ombelliférone



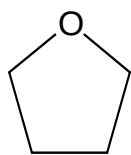
(12) 6,7-dihydroxycoumarine



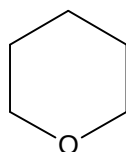
(13) 6,7,8-trihydroxycoumarine

En général les coumarines sont classées en quatre catégories comme suit ^[41]:

- Les coumarines simples : dont l'élément structural subie soit une hydroxylation, une alkoxylation ou une alkylation
- Les furano-coumarine : les éléments de cette famille consiste un hétérocycle pentagonale qui est le furane (14) attaché au noyau coumarinique.
- Les pyrano-coumarines : les composés de ce groupe sont analogues à ceux de groupe précédent (les furano-coumarine), à part que les substances de cette catégorie consiste un hétérocycle hexagonale qui est le pyrane (15) attaché au noyau coumarinique
- Des coumarines substituées dans le noyau de pyrane :

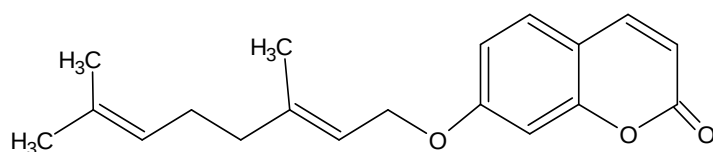


(14) Furane

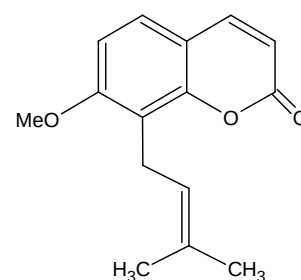


(15) pyrane

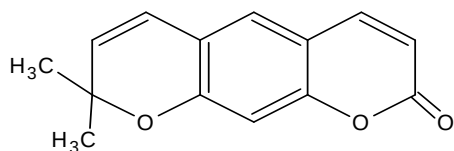
On donne quelques structures coumariniques



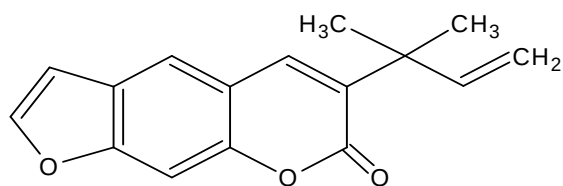
(16) Aurapten



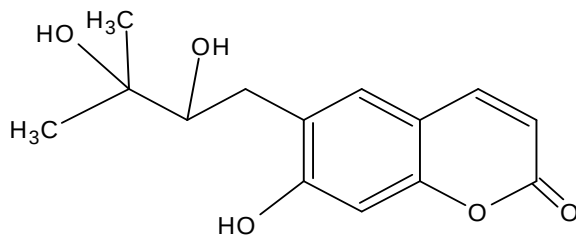
(17) Osthol



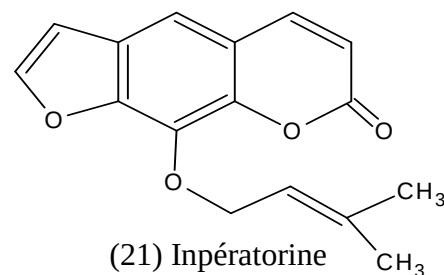
(18) Xanthylétine



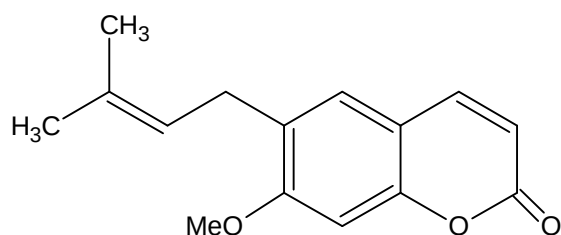
(19) Chalepenseine



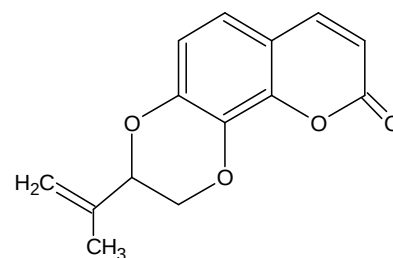
(20) Peucedaeol



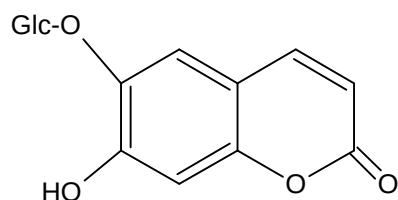
(21) Inpératorine



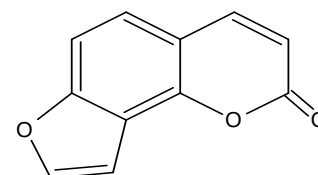
(22) Subérosine



(23) Obliquine



(24) Esculoside



(25) Angélocine

I-2-2-2 Aspect botanique et phytochimique des coumarines :

Les coumarines sont disponibles chez les familles des dicotylédones, comme les *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabiaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Poubiaceae*, *Rutaceae* et *Solanaceae*.

Quelques monocotylédones, spécialement les graminées sont riches en coumarines, qui sont surtout synthétisées au niveau des feuilles ; les coumarines se trouvent en grande quantité dans les fruits puis dans les racines et les tiges, en indiquant que les facteurs climatiques ont une relation directe sur leur production.^[41]

I-2-2-3 Propriétés physico-chimique :

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools, et dans les solvants organiques, tels que les dioxydes d'éthyles ou les solvants chlorés, avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau.

Les coumarines ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants, profondément modifié en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃).

Examinées en lumière UV, les CCM de drogues à coumarines présentent des taches dont la coloration, exaltée en présence d'ammoniac, varie du bleu au jaune et au pourpre^[33].

I-2-2-4 Biosynthèse :

Les coumarines sont des métabolites secondaires des plantes. Cette classe de produits naturels résulte de la transformation de la phenylalanine (26) en trans-cinnamic acid (27) catalysé par l'enzyme intracellulaire la phenylalanine amonialyase (A), cette transformation est considérée l'étape clef de la formation des coumarines, elle sera suivi par une catalysation de l'enzyme cinnamic acid -O- hydroxylase (B) qui transforme le trans-cinnamic acid (27) en O-coumaric acid (3) puis par la O-coumaric acid O-glucosyltransferase (C), cette dernière est responsable de la substitution de l'hydrogène de groupe hydroxyl par un glucose et obtenir β -clucoside de O-coumaric acid (28), ce dernier composé subie une *Cis-Trans* isomérisation par la lumière UV (D), pour avoir β -glucoside de coumarinic acid (29) puis sera converti en coumarinic acid (30) par la substitution de glucose par un hydrogène, cette dernière réaction est catalysée par β -clucosidase (E). En fin la coumarine (10) est formée par une lactonisation spontanée du coumaric acid (F) (Fig. 3).^[42]

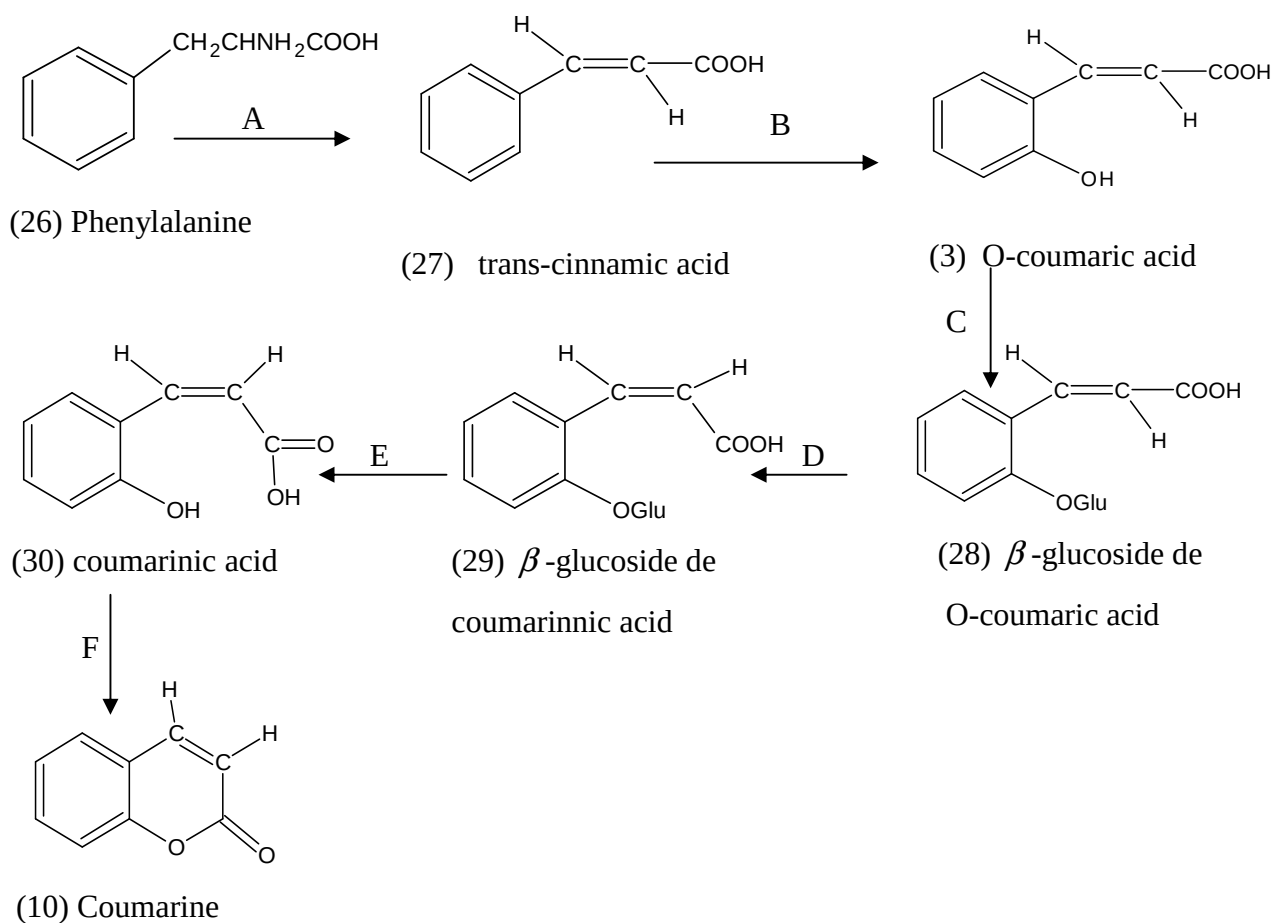


Fig. 3 Biosynthèse des coumarines

I-2-3 : LES FLAVONOIDES

I-2-3-1 Structures chimiques

La structure de base des flavonoides est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoides peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que de sucre lié.

Tous les flavonoides ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Fig. 4)

Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Tableau N° 4)^[43].

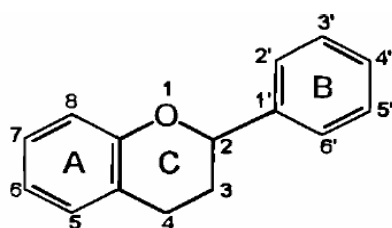


Fig 4 : L'élément structural de base des flavonoides

Tableau N° 4 : Nomenclature des sous-classes des flavonoides en basant sur la position de leurs substituants [43]

	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 ¹	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Quercetin	OH	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 ¹	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
Likviritin	H	H	OH	H	H	O-Glu H	H
Flavones:							
Rpoifolin	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
Baicalein	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 ¹	H	OH	O-Me	H
Flavanolols:							
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-R¹ = Alkoxy

I-2-3-2 Sources des flavonoides :

Les flavonoides sont surtout abondants chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : *polygonaceae*, *rutaceae*, *légumineuses*, *ombellifères* et *composeae*.

Ils sont omniprésents dans les organes aériens. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporée dans la biosynthèse flavonique .

Les formes hétérosidiques des flavonoides hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. Lorsque les flavonoides sont présents dans le cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dans la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyls ^[33]

I-2-3-3 Biosynthèses :

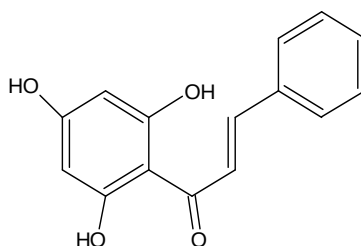
La diversité structurale des flavonoides est due à l'organisation biogénétique du métabolisme secondaire. Une richesse de gène flavonoidiques a été identifiée par des expériences classiques. Cette diversité de gène sélectionne la biosynthèse de plusieurs classes de flavonoides.

D'une façon générale, la synthèse de cette classe de produits naturels résulte de l'association de deux voies complémentaires dont l'une intervient dans la biosynthèse des polyacétylènes a savoir la voie « acétate malonate » et l'autre la voie « shikimate ».

Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de précurseur radio marque et par des cultures de tissu sur la plante entière (pétales en particulier), aussi bien sure par des études enzymatiques.

L'étape clé de la réaction est la condensation par la chalcone synthase (CHS) de 4-coumaroyl-CoA avec 3 unités acétate provenant du malonyl-CoA (acétate malonate)

Le produit de la réaction constitue le tronc métabolique central : Chalcone (31). ^[44]



(31) Chalcone

Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone, en fait la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone isomérase (CHI) qui induit une fermeture de cycle conduisant une flavanone,.

Presque toutes les enzymes qui tendent vers des chemins de formation de différentes classes de flavonoides ont été déterminées (Fig.5).

Les réactions qui donnent les anthocyanidins sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), la chalcone isomérase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (FHT), dihydroflavonol4-réductase (DFR), anthocyanidin synthase (ANS) et flavonoid 3-O-glucosyltransferase (FGT).

Les autres classes de flavonoides ont été dérivées intermédiairement lors de la formation des anthocyanidins et leurs réactions respectives sont catalyées par leucoanthocyanidin reductase (LAR), flavone synthase I ou II (FNS I FNS II), flavonol synthase (FLS) et isoflavone synthase (IFS).

Les 5-dioxyflavonoides sont synthétisés à travers l'action combinée de CHS et la chalcone ketide réductase (CHKR).

La formation de 3-deoxyflavanoïde s'initialise par flavanone 4-reductase (FNR) qui se forme à travers une réaction semblable de celle de (DFR) (Fig.5)

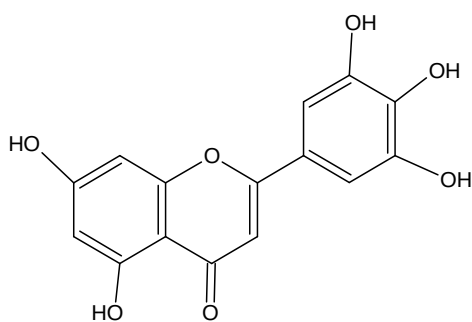
Les flavonoides peuvent être largement modifiés par hydroxylation, méthylation des groupes hydroxyl, glycosylation, acylation et par d'autres réactions.

Les flavonoides résultant de 3'-hydroxylase (F3'H) et 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) ont un intérêt particulier, ces enzymes catalysent l'introduction des groupes hydroxyls de noyau B dans des positions appropriées pour fournir les précurseurs de formation de différents flavonoides, y compris :

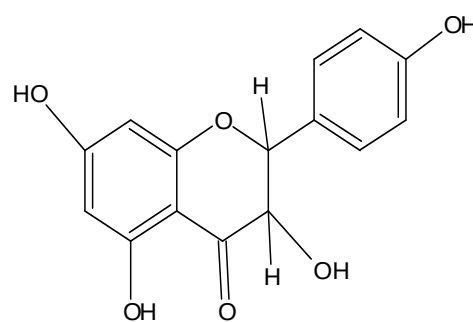
Tricetin (32) (flavones)

Quercetin et myricetin (flavonols) (Tableau N°4)

Les principaux flavonoides caractérisés par hydroxylation de noyau B sont la naringenin (Tableau N°4) et dihydrokaempferol (33) [44]



(32) Tricetin



(33) Dihydrokaempferol

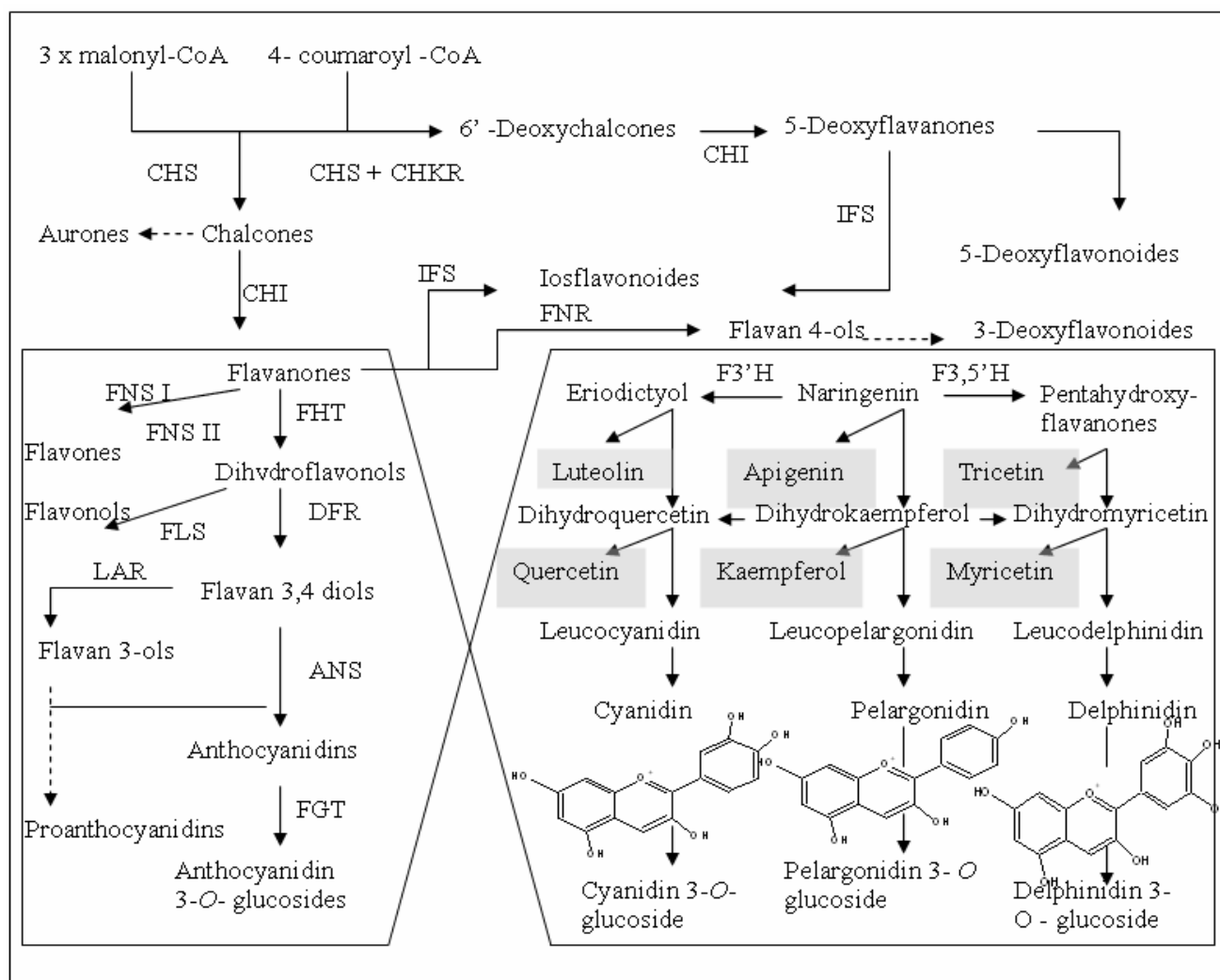


Fig.5 : Biosynthèse des flavonoïdes

I-2-3-4 La substitution du squelette flavonique :

Il existe différents processus de substitution du squelette flavonique et qui sont à l'origine de l'extraordinaire diversité des structures flavoniques .

I-2-3-4-1 : La O-substitution :

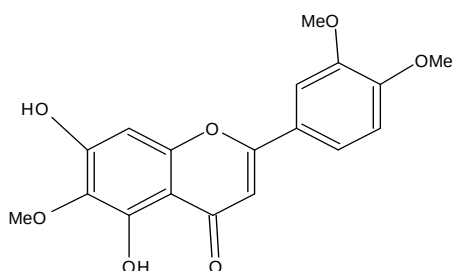
I-2-3-4-1-a L'hydroxylation :

Les hydroxyls 5 et 7 viennent s'introduire avant la formation du noyau A .Pour ce fait, ils sont considérés comme hydroxyls originales .Il est de même pour l'hydroxyl en 4' apporté par le précurseur (p-coumaroyl) du noyau B , tout les autres seront des extra hydroxyls^[45] .

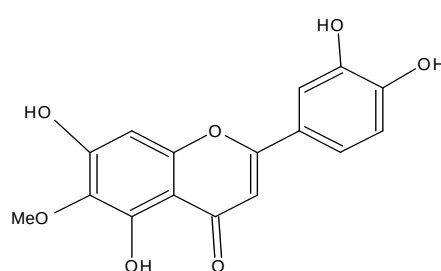
Exemple : catéchin (voir tableau N°4)

I-2-3-4-1-b : La méthoxylation :

C'est la méthylation des hydroxyls aussi bien originels que les extra-hydroxyls ^[46] .



(34) Epalitin



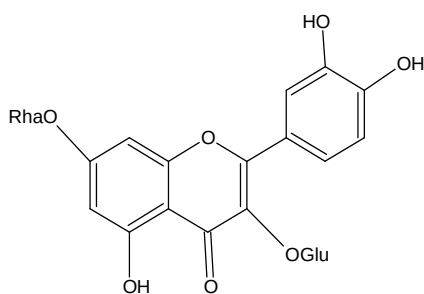
(35) Népitin

I-2-3-4-1-c :La O-glycosylation :

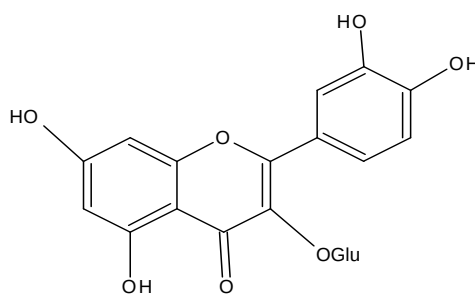
La liaison s'effectue entre un hydroxyl phénolique et un autre alcoolique d'un sucre.

Un deuxième sucre peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique, soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé.

La O-glycosylation se fait préférentiellement avec l'hydroxyl en 7 chez les flavones et les flavanones et en 3 chez les flavonols. Parfois elle se fait sur les deux hydroxyls de la même molécule. ^[47]



(36) 3-O-glucosyl ,7-O-rhamnosyl Quercétin

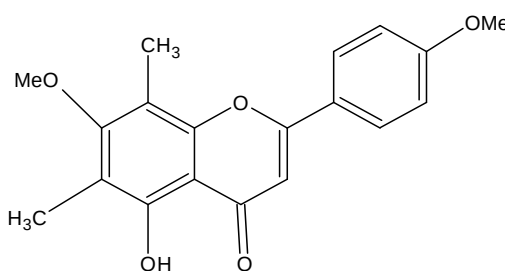


(37) 3-O-glucosyl Quercétin

I-2-3-4-2 : La C-Substitution :

I-2-3-4-2-a : La C-méthylation :

Le méthyl est directement lié au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone ^[46]

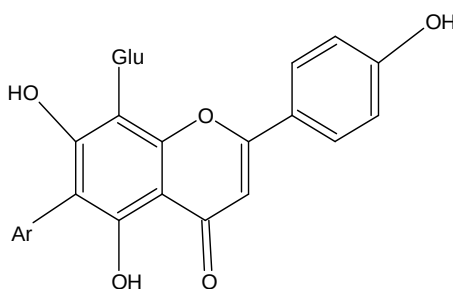


(38) Eucalyptin

I-2-3-4-2-b : La C-glycosylation :

Le sucre est directement lié au cycle benzénique par une liaison carbone- carbone, très résistante aux acides contrairement au cas des O-glycosides. Dans cette glycosylation, la liaison s'établit entre le carbone de sucre et celui en position 6 ou 8 de flavonoides qui est le plus souvent une flavone. Dans certains composés, les deux modes de glycosylation coexistent. [48]

Exemple : Isochaftoside (39)



(39) Isochaftoside

I-2-4 : ANALYSE SPECTRALE DES COMPOSES PHENOLIQUES :

L'analyse des composés phénoliques est très délicate, vu la grande variété et la forte réactivité de ces composés. En revanche, les méthodes d'analyses modernes sont convenables pour la séparation et l'identification de ce genre de composés. [32]

I-2-4-1 : Les méthodes de séparation et de purification : [49]

La séparation de ces produits, est essentiellement réalisée par des méthodes chromatographiques :

I-2-4-1-1 : Chromatographie sur colonne.

Le support chromatographique étant le polyamide, qui permet la séparation des produits phénoliques, et cela par la fonction carbonyl amide, qui donne lieu à de fortes liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyls des composés phénoliques .

Avant la confection de la colonne, l'adsorbant est mis en suspension dans le solvant de base (toluène ou eau), sous agitation magnétique afin d'homogénéiser la bouillie formée, avant de l'introduire dans la colonne (30 g de polyamide pour 1g de l'extrait).

Le choix de la taille de la colonne, (longueur et diamètre) est en fonction de la quantité de l'extrait brut à étudier. Ce dernier, est solubilisé dans un minimum de méthanol, et introduit à l'aide d'une pipette pasteur sur les parois de la colonne confectionnée.

La progression des différentes substances, suivie en lumière UV, dicte des changements de la polarité de mélange éluant d'un gradient à un autre.

Les fractions collectées sont contrôlées par chromatographie sur couche mince, celles qui sont pure sont évaporées à sec. [50]

I-2-4-1-2 : Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM), a remplacé la chromatographie sur papier qui a été utilisée pendant longtemps (1950-1960), pour la séparation des composés phénoliques.

L'utilisation des solvants et des phases stationnaires convenables (silica gel, cellulose, polyamide), l'a rendu une méthode de choix pour l'identification préliminaire de ce genre de composés.

Par exemple, les polyphénols hydrophobes comme les flavonols peuvent être séparés facilement par CCM, sur polyamide ou sur la cellulose microcristalline.

La CCM est aussi utilisée en commun avec la chromatographie préparative sur couche mince, pour déterminer les différents composés des classes des flavonoïdes présents dans les fruits, le miel et les plantes. [51]

La technique CCM a pour avantages :

- Rapidité et prix
- Une grande sensibilité puisque on peut détecter des quantités de l'ordre de 1/100 µg.
- Une séparation plus nette pour les mélanges d'isomères [49]

I-2-4 -1 -3 : HPLC :

La chromatographie liquide haute performance a un champ d'application qui recouvre une grande partie de l'analyse des substances naturelles, spécialement l'analyse des composés de masse moléculaires à la fois grande et même polaire. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise, sur la sélectivité entre les composés phénoliques, au point qu'elle est devenue la méthode d'analyse la plus connue pour ces composés phénoliques, et elle est considérée parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide.

Les composés phénoliques d'origine naturelle ont la propriété d'être solubles dans les solvants polaires, ce qui rend possible l'utilisation de la phase renversée en HPLC (RP-HPLC) pour leur analyse. [52]

Sous les conditions chromatographiques utilisant l'analyse HPLC, la figure (Fig. 6) illustre les chromatogrammes de l'Apiginin et Luteolin (Tableau N°4), l'Apigenin-7-O-glucoside(40), et Luteolin-7-O-glucoside (41); et la Quercetine et Kaempferol (Tableau N°4) sont illustrés sur la figure sur (Fig. 7) [52]

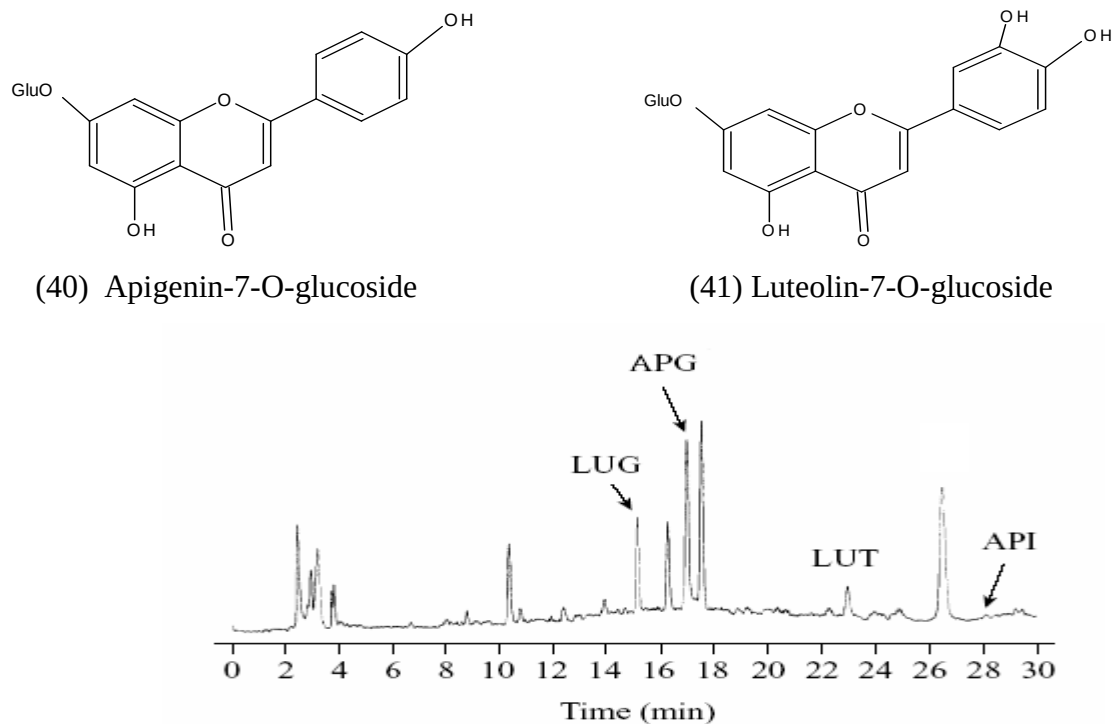


Fig. 6: Apigenin-7-O-glucoside; Apigenin ; luteolin-7-O-glucoside; Luteolin

I-2-4-2 : METHODES D'ANALYSE STRUCTURELLE :

Une fois que les produits isolés sont purifiés, les techniques spectrales sont utilisées pour déterminer leurs structures.

L'utilisation des valeurs des données spectrales, dans l'identification et l'analyse structurale des polyphénols, a considérablement augmenté grâce à l'emploi de plusieurs méthodes qui ont permis de localiser les substituants sur le squelette de base

I-2-4-2-1: La spectrophotométrie UV- VISIBLE :

La spectrophotométrie UV-VISIBLE, reste une technique essentielle pour l'identification des polyphénols. Cette méthode est sensible car elle n'exige que peu de produit (une tache de chromatographie sur papier suffit) pour donner des renseignements structuraux de première importance, dans la détermination de la nature des composés. [53]

La corrélation des données spectrales avec les règles de la spectrométrie, a été décrite par de nombreux chercheurs.

Le spectre d'absorption ultra violet des composés flavoniques dans le MeOH neutre, présente 2 maximums ou pics (Tableau N°5)

- Le premier se situe approximativement entre 300 et 400 nm, il constitue la bande (pic I),
- Le deuxième se trouve dans la zone de plus basse longueur d'onde comprise entre 240 et 285 nm, et forme la bande (pic II).

La bande (pic I) résulte du noyau (B) couplé avec la double liaison $C_2 = C_3$ et la bande (pic II) est caractéristique du noyau benzénique (A). [54]

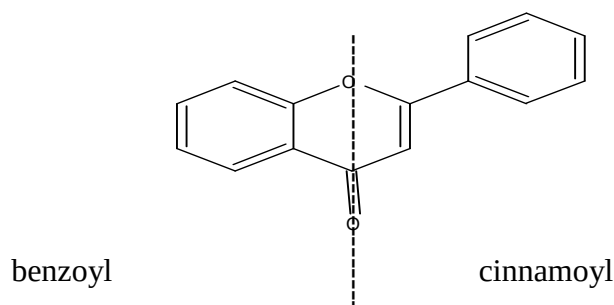


Fig. 8 : forme benzoyl/cinnamoyl

Les pigments flavoniques présentent des spectres qui sont susceptibles d'être modifiés selon la substitution ou selon les réactifs utilisés, tels que $AlCl_3$, MeOH, NaOAc

La série spectrale de ces composés est illustrée comme suit (Fig.9, Fig. 10 et Fig. 11)

Tableau N° 5 : Ordres d'absorption UV pour les flavonoides [54]

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Type de flavonoides
250 – 280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonoles(3-OH substitués)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libres)
245-275	310-330 épaulement pic à 320.	Isoflavones Isoflavones(5-deoxy -6,7-dioxygénés)
275-295	300-330 épaulement	Flavones et Dihydroflavonoles
230-270 intensité faible	340-490 380-430	Chalcones Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes et anthocyanidines

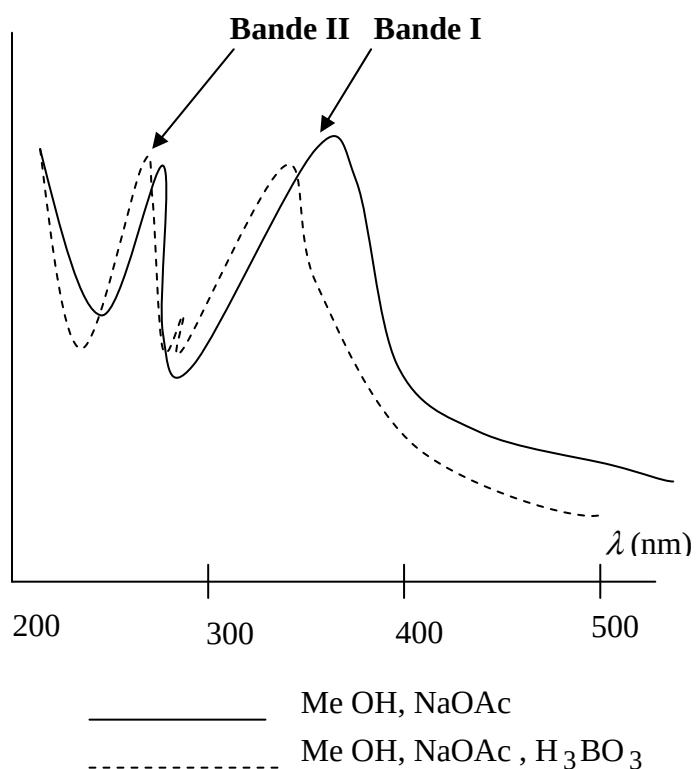


Fig. 9 : Spectre de UV-VIS des flavone

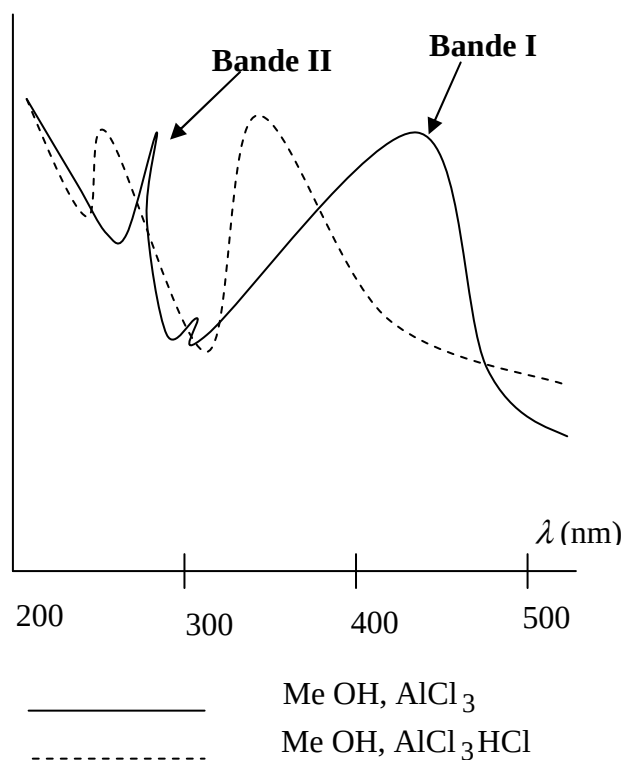


Fig. 10 : Spectres UV-VIS d'un flavonol

I-2-4-2-2 : La spectroscopie IR :

- En solution dans un solvant apolaire, on observe un pic fin à 3610 cm^{-1} . Il s'agit de la vibration d'élongation de la liaison O-H libre.
- Pour le composé pur, on observe une bande large $3200\text{ cm}^{-1} < \bar{\nu} < 3400\text{ cm}^{-1}$. Il s'agit des liaisons O-H associées par liaison hydrogène intermoléculaire.

Certains composés polyfonctionnels possèdent une liaison hydrogène intramoléculaire ($\nu = 3480\text{cm}^{-1}$). Ce type de liaison se distingue facilement d'une liaison intermoléculaire. En effet, un tel pic n'est pas affecté lors de la dilution du composé dans un solvant inerte comme CCl_4 . [55]

I-2-4-2-3 : La spectrométrie MS :

La spectrométrie de masse est une technique pour l'étude structurel des polyphénols, ultrasensible (à l'ordre de $1\text{ }\mu\text{g}$).

Cette technique est utilisée pour confirmer l'identification structurelle, en donnant les informations suivantes :

- La formule de la molécule
- La répartition des substituants sur le noyau benzénique à partir de la détermination des pics de la fragmentation de la molécule
- La détermination de la nature et le site d'attachement des sucres dans les « O » ou « C » glycosides pour les flavonoides.

Ils existent différentes techniques en spectrométrie de masse dont les plus utilisées sont : la spectrométrie de masse à impact électronique (EI), spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide (FAB), spectrométrie de masse electrospray (ES).

Les flavonoides caractérisées par une structure communes en C_{15} : $\text{C}_6 - \text{C}_3 - \text{C}_6$, dont la quelle les deux noyaux benzéniques (A et B) réunis par une chaîne de trois carbones (noyau C), en spectroscopie de masse les deux noyaux (A et B) gardent leur structures et ne se fragmentent pas. A l'inverse de noyau (C) qui est considéré très faible, ce qui favorise le clivage des liaisons à ce niveau [52], comme l'indique la *Fig.12* qui montrent les fragments obtenus après clivage des liaisons de la molécule flavonique : 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavonol (genkwanin) (42).

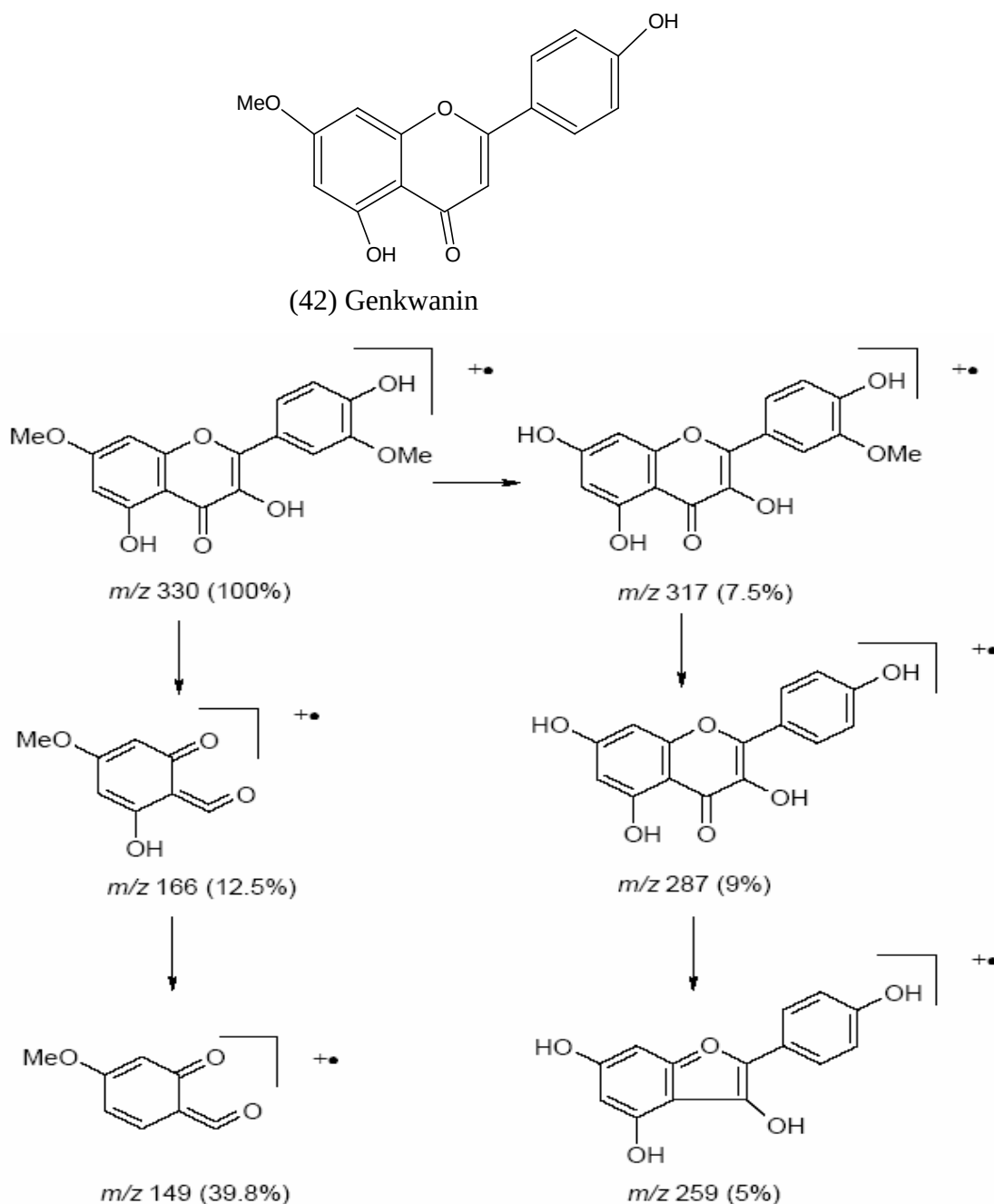


Fig. N°11 : Fragmentation de la molécule 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavonol (42)

I-2-4-2-4 :La spectrométrie (RMN) :

La résonance magnétique nucléaire constitue une des techniques d'analyse moderne et les plus efficaces pour la détermination de la structure et de la stéréochimie des molécules organiques complexes.^[56]

Pour les polyphénols naturels, la RMN donne des informations sur le squelette de la molécule, à travers la localisation des protons, la détermination de nombre et positions des groupements méthoxy, des sucres ... etc...^[54]

Généralement les flavonoides donnent des signaux protoniques nucléaires dans l'intervalle de 0-9 ppm, avec CCl_4 comme solvant, et TMS comme référence.

La figure (Fig. 12) indique les déplacements chimiques (δ en ppm) des différents flavonoides

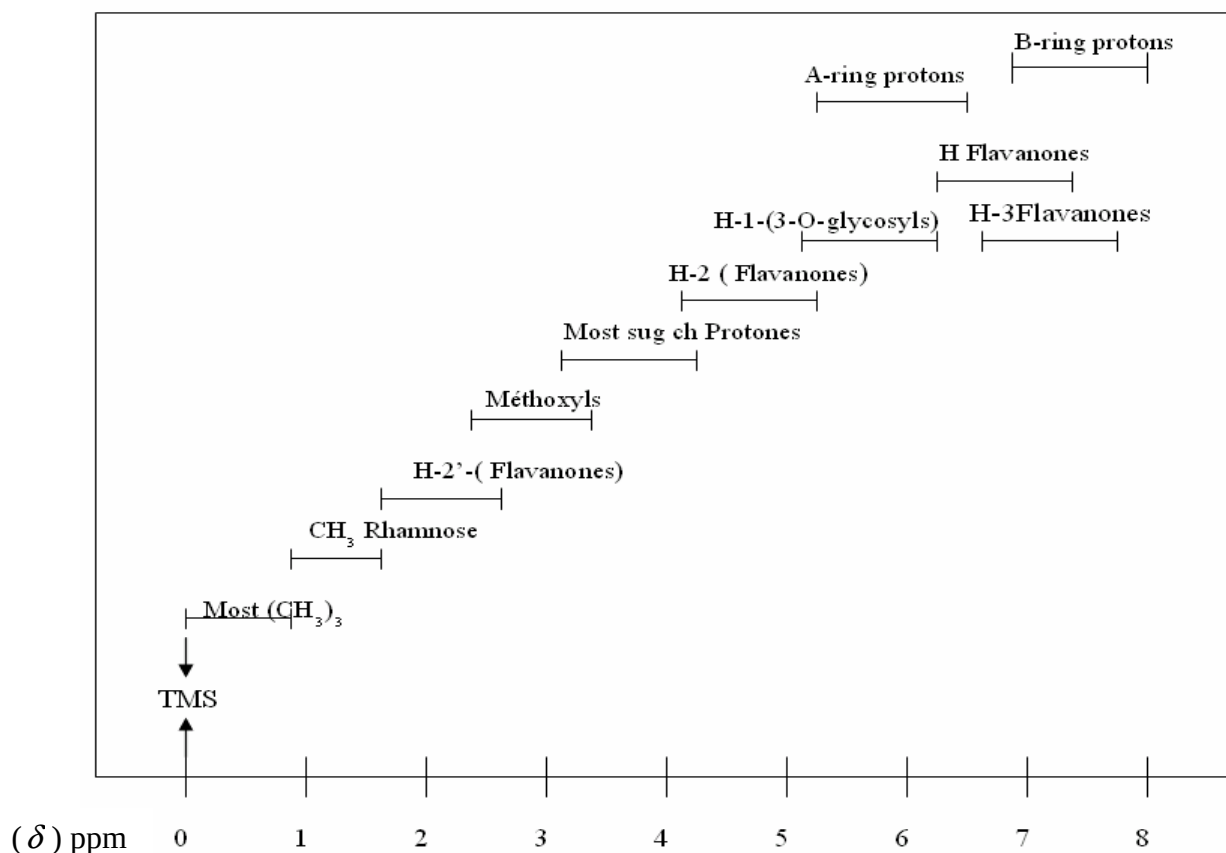


Fig. 12 : Déplacements chimiques (δ en ppm) des différents flavonoides

En voici les déplacements chimiques des protons de quelques composés flavonoidiques (Tableau N°6):

Apigenin (voir tableau N°4) et Genkwanin (42)

Flavonoïde	Apigenin (5, 7,4'trihydroxy- flavone)	Genkwanin 5,4' dihydroxy 7- methoxyflavone
Position de proton		
3	6.85(s)	6.94 (s)
6	6.29 (d, 2)	6.64 (d, 2)
8	6.57 (d, 2)	6.73 (d, 2)
2'/6'	8.01 (d, 8.8)	7.97 (d, 8.8)
3'/5'	7.02 (d, 8.8)	7.28 (d, 8.8)

Tableau N° 6 : RMN H-1 de quelques structures flavonoidiques,

Les résultats sont obtenus dans les conditions suivantes : solvant DMSO-d_6 et à 300 MHz^[52]

I-2-5 L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES POLYPHENOLES :

Les études scientifiques actuelles ont permis de confirmer les propriétés médicinales, attribuées au polyphénols. Parmi ces derniers, il a été reconnu que les flavonoides possèdent des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, antivirales ...ect.

Les polyphénols sont absorbés à travers la barrière intestinale et parviennent au niveau des tissus cibles, où ils peuvent exercer des effets protecteurs.

Notre organisme étant soumis à un stress oxydant, il développe diverses pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, maladies neuro - dégénératives ...).

Les effets protecteurs cardiovasculaires sont de mieux en mieux établis. [57]

Un antioxydant est une substance qui, quand elle se présente à une concentration basse par rapport à celle d'un substrat oxydable, elle empêche (prévient) considérablement l'oxydation de cette dernière [58].

Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres (l'effet scavenger) générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections), tel que $O_2^{\bullet-}$ (superoxid anion) $HO_2^{\bullet-}$ (Perhydroxy radical) H_2O_2 (hydrogène peroxyd), OH (Hydroxy radical) $RO^{\bullet}$ (Alkoxyl radical), $ROO^{\bullet}$ (peroxyl radical), $O_2^{\bullet}$ (singlet oxygen) [59].

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans nos régimes alimentaires. Nous consommons chaque jour environ 1 g de polyphénols qui proviennent exclusivement des aliments d'origines végétales. Ils renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydant et préviendraient ainsi diverses maladies chroniques, telles que cancers et maladies cardiovasculaires

C'est admis que la capacité anti-oxydante de plusieurs fruits est due à la présence des flavonoides, en fait, la plus part des constituants polyphénoliques de la nourriture montre une plus grande efficacité dans ces systèmes, comme des antioxydants mieux que les éléments antioxydants nutritifs : vitamine C, vitamine E, et β - carotène [60].

Des différences entre les capacités antioxydantes existent dans les composés sélectionnés, et qui peuvent être mesurées en utilisant différentes techniques (chimiluminescence).

Parce que la plupart des produits phytochimiques sont multifonctionnels, donc un protocole fiable de l'antioxydant exige la mesure de plus qu'une propriété pertinente soit pour les nourritures ou les systèmes biologiques [61]

Certaines relations structure- activité antioxydante des flavonoides peuvent être déterminés d'après les littératures. Une comparaison entre la quercetin, catechin (Tableau N°4) démontre l'importance de l'insaturation dans le noyau C (Fig. 13 et Fig. 14), permettant la localisation de l'électron à travers la molécule pour une stabilisation du radical de l'aryloxy [59]

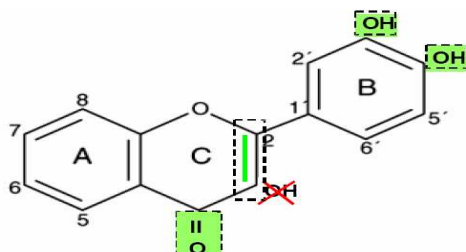


Fig. 13 : Les substitutions qui participent dans la réaction antioxydante

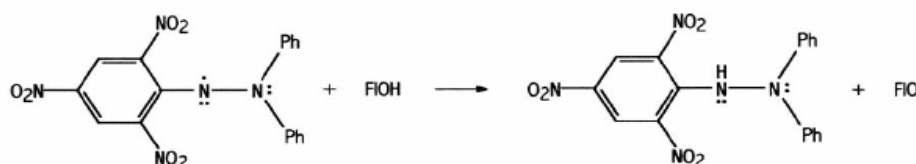


Fig. 14 : Réaction de réduction d'un radical libre par un polyphénol

Le groupe : 3-OH attaché à la double liaison $C_2 - C_3$, et son emplacement adjacent au 4-carbonyl dans le noyau C, a causé une efficacité maximale d'ébouage des radicaux.

La capacité anti-oxydante très faible de catechin peut être augmenté lors de formation de la quercetin, par l'incorporation de la double liaison $C_2 - C_3$, et la fonction 4-oxo, et l'incorporation d'un groupe supplémentaire 5' OH dans le noyau B, ce qui donne une grande inhibition du radical superoxide. [62]

Pour cela l'activité anti-oxydante est à son maximum quand le noyau B est substitué par deux groupes hydroxyls, dont l'arrangement est ortho.

La présence d'un troisième groupe OH dans le noyau B n'hausse pas l'efficacité contre les radicaux, sauf dans le cas des catechins, existe des contributions à l'activité anti-oxydante des groupes hydroxyls sur le noyau A en absence des structures dihydroxy dans le noyau B. [32]

Généralement, la O-methylation des substitutions hydroxyls annule l'activité antioxydante des flavonoides. Aussi la 3-glycosylation des flavonoides réduisent leur activité antioxydante en comparant aux aglycones correspondants, mais la glycolysation de groupe 7-OH dans une structure avec un noyau hétérocyclique saturé et avec un groupe d'hydroxyl solitaire sur le noyau B, a la même influence sur l'activité antioxydante [63]

Dans les graisses, la configuration 3',4'-orthodihydroxy de noyau B, et le groupe 4-carbonyl et le groupe 3-OH dans le noyau C, sont encore associés avec une optimale activité anti-oxydante. A l'inverse des cas des interactions de la phase aqueuse, cependant, la double liaison 2,3 est considérée moins importante. [64]

Les acides monohydroxy benzoïques agissent comme des antioxydants très faibles, à cause de l'électronégativité de groupe carboxylique, seulement l'acide m-hydroxy benzoïque a l'activité anti-oxydative remarquable. Cette activité augmente considérablement dans le cas des substituants dihydroxy d'acide benzoïque, à qui une réponse antioxydante été démontrée, cette dernière dépend des positions relatives des groupes hydroxyls dans le noyau. L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxy benzoïque) est l'antioxydant le plus fort de tous les acides hydroxybenzoïque [65]

L'insertion d'un groupe ethylenique entre un noyau phényl porteur d'un groupe hydroxyl et un groupe carboxylate a un effet très favorable sur les propriétés réductrices du groupe OH.

Les activités antioxydantes totales des acides hydroxycinnamiques sont plus fortes que celles des acides hydroxybenzoïques correspondants. Cette activité peut être augmentée par certaines substitutions du methoxylation, mais la glycosylation du groupe carboxylate n'a aucune influence sur cette propriété [65]

L'efficacité anti-oxydative des monophenols est augmentée substantiellement par un ou deux substituants methoxy dans les O-positions par rapport à OH

Au moins deux, ou même trois groupes d'hydroxyl phenoliques voisins à un groupe carbonyl montrent des traits moléculaires essentiels responsables d'une forte activité anti-oxydante. [65]

II- RESULTATS ET DISCUSSION :

II-1- Extraction :

Les rendements de l'extraction de la *propolis* par de l'alcool éthanolique (70 %) sont donnés dans le tableau suivants (Tableau N° 7)

Tableau N ° 7 : Les pourcentages des résidus par rapport à la quantité initiale de la *propolis*

La région	Solvant	Poids initial en g	Poids final en g	Le pourcentage
Guelma	Ethanol 70 %	1	0.24	24 %
Tlemcen	Ethanol 70 %	1	0.53	53 %
M'sila	Ethanol 70 %	1	0.34	34 %
Tizi-Ouzou	Ethanol 70 %	1	0.28	28 %

II-2 Analyse chimique :

II-2-1- Résultats :

La syllilation et l'analyse des quatre échantillons par GC/MS, nous ont donné les chromatogrammes représentés dans les figures *Fig 15*, *Fig 16*, *Fig17* et *Fig 18* correspondants aux échantillons de Tlemcen, Guelma , M'sila et Tizi-Ouzou respectivement.

Les spectres à haute résolution de ces chromatogrammes sont montrés dans l'annexe N°1.

Les chromatogrammes obtenus après cette analyse, montrent l'apparition d'un grand nombre de composés avec différentes abondances, à différents temps de rétention ; ce qui prouve à la fois la diversité qualitative, et quantitative des *propolis* étudiées.

Nous remarquons dans les chromatogrammes des échantillons de Tlemcen et Guelma, l'apparition d'un pic à faible abondance à $R_t = 8,56$ min, mais il est absent dans ceux de M'sila et Tizi-Ouzou.

Nous constatons l'existence de deux pics, le premier moyen à $R_t = 9,69$ min, l'autre faible à 10,49 min dans les quatre échantillons.

Un pic moyen est remarqué à 15,26 min dans le chromatogramme de l'échantillon de Tizi-Ouzou, ce pic est aussi apparu avec une faible abondance dans le chromatogramme de Tlemcen et absent dans les autres.

La *propolis* de Tizi-Ouzou s'est spécifiée seule par l'apparition d'un pic moyen à $R_t=17,90$ min.

A 22,5 et 26,27 min des pics forts sont apparus dans les quatre chromatogrammes, mais à 27,27 min nous avons un pic très fort dans le chromatogramme de Tizi-Ouzou, moyen dans celui de M'sila, faible à Guelma et absent dans le chromatogramme de Tlemcen.

Les quatre échantillons ont marqué l'existence de deux composés avec des abondances moyennes, respectivement à $R_t=28,10$ et $29,27$ min, sauf que pour Tizi-Ouzou le premier pic été faible.

La zone de $R_t=30$ min à $R_t=40$ min est très condensée dont on remarque un grand nombre de pics donc les quatre échantillons présentent plusieurs composés dans cet intervalle, on mentionne les plus importants :

A $R_t=31,73$ min, un pic très fort est apparu dans l'échantillon de Tlemcen, fort pour celui Guelma et M'sila, très faible pour Tizi-Ouzou.

A $R_t=31,01$ min et $32,02$ min, deux pics abondants sont apparus dans l'échantillon de M'sila, faibles dans Tizi-Ouzou et Guelma, mais dans le chromatogramme de Tlemcen le premier est faible, le deuxième est complètement absent.

Un pic fort est apparu à $R_t=32,60$ min dans le chromatogramme de l'échantillon de Tlemcen, le même composé est apparu dans les trois autres, mais à moyennes abondances pour Guelma et M'sila et à faible intensité pour Tizi-Ouzou.

Le pic le plus abondant dans l'échantillon de M'sila correspondant à $R_t=34,58$ min, est aussi présent dans les autres chromatogrammes, avec des abondances très considérables dans Tlemcen et Guelma, mais faible à Tizi-ouzu.

La zone dont les temps de rétention R_t (min) = 36,63 ; 37,05 ; 37,35 ; 37,66 est caractérisée par une multitude de pics, souvent à des intensités très élevées pour les échantillons de Guelma, Tlemcen et M'sila, généralement faible pour l'échantillon de Tizi-Ouzou

Ce dernier s'est spécifié seul par l'apparition de deux pics très abondants à $R_t=41,2$ et $42,0$ min.

A partir de $R_t=43$ min plus exactement à $R_t=43,70$; $46,02$; $46,56$; $47,66$ min, le chromatogramme de Guelma s'est caractérisé par l'apparition des pics moyennement intenses, généralement faibles ou absents dans les autres échantillons.

La haute résolution de ces chromatogramme avec l'incorporation des spectres MS, a permet d'avoir plus de détail sur les composés identifiés, représentés dans les tableau suivants (N° 8, 9, 10, 11, 12,13 et 14) :

Fig. 15 : Chromatogramme de l'échantillon de Tlemcen

Fig. 16 : Chromatogramme de l'échantillon de Guelma

Fig. 17 : Chromatogramme de l'échantillon de M'sila

Fig 18: chromatogramme de l'échantillon de Tizi-Ouzou

Les tableaux N° 8, 9, 10, 11, 12,13 et 14 illustrent les résultats détaillés des composés identifiés dans les quatre échantillons, classés par familles, en indiquant pour chacun son Rt (min) correspondant:

Tableau N° 8 : Les acides aliphatiques

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Butanedioic acid	0,3	0,3	0,2	0,1	10,49
2	Hydroxymandelic acid	-	-	-	0,1	19,11
3	Hexadecanoic acid	1,1	1,7	1,4	2,1	26,27
4	Linolic acid	-	0,4	0,4	-	29,16
5	Oleic acid	1,1	2,0	1,5	1,7	29,27
6	Octadecanoic acid	0,3	0,5	0,7	0,3	29,73

Nous remarquons que les quatre échantillons ont des faibles taux en acides aliphatiques, allant d'un pourcentage global de 2,8 % pour l'échantillon de Tlemcen à 4,9 % pour l'échantillon de Guelma.

Les acides butanedioïque, Hexadecanoïque et Octadecanoïque sont présents dans les quatre échantillons.

Comme on voit que l'acide Oléique est présent dans tous les échantillons, ce qui est justifié par la présence des arbres d'olivier dans les environs des quatre régions.

Tableau N°9 : Les acides aromatiques

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Benzoic acid	0,3	0,2	-	-	8,56
2	Salicylic acid	0,2	-	-	0,8	15,26
3	Cinnamic acid	-	0,3	-	-	15,90
4	Hydrobenzoic acid	-	-	-	0,4	17,90
5	Vanillic acid	-	-	-	0,1	20,93
6	Z-Ferulic acid	-	-	-	0,5	24,07
7	<i>p</i> -Coumaric acid	0,4	0,3	-	0,1	24,32
8	Dimethoxycinnamic acid	0,4	0,5	-	-	26,00
9	Ferulic acid	0,6	0,6	0,6	-	26,96
10	Isoferulic acid	-	0,3	1,0	6,7	27,27
11	Caffeic acid	1,8	1,4	1,1	0,2	28,10

Pour les acides aromatiques, nous remarquons aussi des taux faibles pour tous les échantillons allant de 2,7 à 3,7 %, sauf pour celui de Tizi-Ouzou, dont on marque la présence de l'acide Isoferulique avec un taux de 6,7 %, ce qui les ramènes à un pourcentage global de 8,8 %.

Comme on remarque que l'acide caféique est présent dans toutes les *propolis*, mais avec un taux très faible pour celle de Tizi-ouzou (0,2%).

Tableau N°10 : Les esters

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Ethyl hexadecanoate	-	-	-	0,2	25,25
2	Pentenyl p-coumarate	0,3	-	-	-	28,21
3	Ethyl octadecenoate	-	0,1	0,2	0,2	28,35
4	Pentenyl ferulate	0,3	0,6	1,7	0,2	30,90
5	Isopentenyl caffeate	0,2	0,2	0,7	-	31,55
6	Pentenyl caffeate	4,5	2,1	1,8	0,3	31,71
7	Pentenyl ferulate	0,8	1,6	1,7	0,1	31,80
8	Pentenyl caffeate	4,7	1,2	1,6	0,2	32,60
9	Benzyle caffeate	4,9	1,4	1,2	1,2	37,05
10	Phenethyl caffeate	0,9	1,7	0,9	0,2	38,17
11	Cinnamyl caffeate	0,6	2,2	-	-	41,30

Pour les esters, la remarque flagrante est que les taux de ces substances sont très faibles dans la propolis de la région de Tizi-Ouzou.

A l'inverse de la propolis de Tizi-Ouzou, l'échantillon de Tlemcen a montré un taux global très élevé (17,20 %), avec la présence de trois esters dérivés de l'acide caféique, à des taux très importants et qui sont le benzyl caffeate (4,9 %), et deux isomères de Pentenyl caffeate avec des pourcentage (4,7%) et (4,5%).

Nous constatons aussi que la plus part des esters identifiés dans les quatre échantillons, sont des dérivés de l'acide caféique, le reste sont deux esters de l'acide ferrulique (isomères) et trois esters d'acides aliphatiques et qui sont l'éthyl hexadecanoate, éthyl octadecanoate et le pentenyl *p*-coumarate.

Tableau N°11 : Les flavonoides

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Pinostrobin chalcone	0,9	0,3	-	0,6	33,86
2	Pinostrobin	1,0	0,9	0,4	0,2	33,95
3	Pinocembrin chalcone	3,7	1,4	0,6	0,2	34,40
4	Pinocembrin	5,9	6,9	9,5	0,8	34,50
5	Pinobanksin	3,9	3,0	3,5	0,6	35,40
6	Sakuranetin	1,5	1,9	-	-	36,35
7	Pinobanksin acetate	7,4	5,9	4,4	0,2	36,60
8	Chrysin	7,5	6,9	1,9	0,4	37,35
9	Galangin	8,5	6,9	2,3	0,7	37,66
10	Pinobanksin butanoate	-	0,7	-	-	38,00
11	Pinobanksin pentanoate	0,3	0,9	-	-	39,23
12	Kaempferol methyl ether	-	0,3	0,2	-	42,01
13	Kaempferol methyl ether	0,1	0,3	-	-	42,50
14	Apigenin	-	0,3	-	-	42,74
15	Quercetin methyl ether	0,5	-	-	-	43,52
16	Quercetin dimethyl ether	1,1	0,6	0,3	0,2	43,70
17	Quercitin methyl ether	-	0,2	-	-	44,40

Les flavonoides : Cette famille de substance est considérée la partie dominante de la *propolis*, elle a une grande importance dans notre étude. Et d'après les recherches déjà faites la qualité de la *propolis* a un lien direct avec le pourcentage de ces substances.

Nous remarquons tous d'abord le taux global très élevé en flavonoides dans la *propolis* de Tlemcen (42,3 %), avec la présence de 13 flavonoides, dont six marquent des taux importants : (8,5 %) pour la galangin, (7,5 %) pour la chrysin, (7,4%) de Pinobanksin acétate, (5,9 %) pour la pinocembrin, (3,9 %) de Pinobanksin et enfin la pinocembrin chalcone avec un taux de (3,7 %).

Le taux global des flavonoides dans la *propolis* de Guelma est de (37,4 %), On remarque la présence de seize 16 flavonoides, dont quatre marquent des taux élevés. La chrysin, la galangin et la pinocembrin ont un pourcentage de (6,9 %) pour chacun, la pinobanksin acétate (5,9%) et la pinobanksin (3%).

On note que la *propolis* de Guelma s'est spécifiée de contenir trois flavonoides, qui n'ont pas été figurés dans les trois autres échantillons (l'apigenin, la pinobanksin butanoate et la Quercitin methyl ether)

La *propolis* de M'sila n'a montré qu'une proportion de (23,1 %), avec la grande présence de la Pinocembrin (9,5 %), la Pinobanksin acétate (4,4%) et la pinobanksin (3,5 %).

Par contre la *propolis* de la région de Tizi-ouzou été pauvre en cette famille de substance, car on a marqué seulement la présence de neuf flavonoides avec un taux global de (3,9 %).

Nous pouvons classer les flavonoides existant dans les quatre échantillons comme suit :

Tableau N° 12 : Classification des flavonoides identifiés :

Famille	Composés	Tl	Gl	Ms	To
Flavones	Apigenin		X		
	Chrysin	X	X	X	X
Flavonol	Galangin	X	X	X	X
	Kaempferol methyl ether		X	X	
	Kaempferol methyl ether	X	X		
	Quercitin dimethyl ether	X	X	X	X
	Quercitin methyl ether	X	X		
Flavanolol	Pinobanksin	X	X	X	X
	Pinobanksin acetate	X	X	X	X
	Pinobanksin butanoate		X		
	Pinobanksin pentanoate	X	X		
Flavonone	Pinocembrin	X	X	X	X
	Pinostrobin	X	X	X	X
	Sakuranetin	X	X		
Chalcone	Pinocembrin chalcone	X	X	X	X
	Pinostrobin chalcone	X	X		X

Tableau N° 13 : Les terpènes

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt
1	Diterpenic acid	-	-	0,7	-	29,67
2	Diterpene	-	0,5	0,3	-	29,94
3	Diterpenic acid	-	-	0,4	-	30,49
4	Pimaric acid	-	0,2	1,4	0,3	30,58
5	Diterpenic acid	0,2	0,9	3,3	0,1	31,01
6	Diterpene	-	-	-	-	31,80
7	Dihydroabeietic acid	-	1,1	3,9	0,3	32,02
8	Diterpene	-	0,3	-	0,1	32,15
9	Abeietic acid	1,2	1,2	2,7	0,1	32,44
10	Diterpenic hydroxyacid	-	0,4	1,1	4,8	33,50
11	Diterpenic acid	1,8	5,0	7,0	3,8	35,20
12	Diterpene	-	0,8	1,0	-	35,88
13	Triterpene	0,7	0,2	-	-	44,59
14	Triterpene	0,2	0,2	1,3	0,4	44,98
15	Triterpene	-	-	-	0,4	45,06
16	Triterpenic alcohol	-	0,8	-	-	45,39
17	Triterpenic acid	-	1,2	-	0,5	45,52
18	Triterpene	-	0,3	-	-	45,64
19	Triterpene	0,2	1,0	0,4	0,3	46,02
20	Triterpene alcohol	0,2	1,2	-	0,4	46,44
21	Triterpene acétate	-	2,6	0,8	0,5	46,56
22	Triterpene	-	-	1,1	-	46,89
23	Triterpene	0,8	-	-	-	47,16
24	Triterpene acetate	-	-	0,6	-	47,35
25	Triterpene	0,3	0,6	0,8	0,5	47,53
26	Triterpene alcohol acetate	-	1,4	-	0,1	47,66

Les terpènes : les échantillons ont marqué une grande diversité de ce genre de substance, au total on a identifié 26 terpènes à faibles pourcentages pour la *propolis* de Tlemcen (5,6 %) , mais à des pourcentages élevés pour les autres échantillons (12,6 ; 19,9 et 26,8 %) respectivement pour Tizi-ouzou, Guelma et M'sila.

Tableau N°14 : Les sucres

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Pentoses	2,3	2,1	1,7	1,3	22,20 22,50
2	Hexoses	0,3	1,5	0,5	-	24,00 25,90
3	Disaccharide	0,4	1,1	2	-	33,64
4	Trisacharide	0,4	-	-	-	48,30

Tableau N°15 Autres

N°	Le composé	Tl	Gl	Ms	To	Rt (min)
1	Butanediol	-	0,2	-	-	07,31
3	Glycerol	0,7	0,8	0,7	0,6	09,69
4	Treitol	-	-	-	0,2	15,75
5	Xylitol	-	-	-	0,1	20,59
6	Non identifié	-	-	-	6,7	41,22
7	Non identifié	-	-	-	9,9	42,02

La *propolis* de Tizi-Ouzou s'est spécifiée par l'existence de deux (02) composés non connus dans les bibliothèques standards, l'un avec un taux de 9,9 % et l'autre à 6,7 %. Leurs spectres de masse sont montrés respectivement dans l'annexe II.

L'apparition du glycérol est très habituelle, comme la montré les études antérieures sur la *propolis*.

On peut récapituler les pourcentages totaux des composés précédents - par famille- comme suit :

Tableau N°16 : les pourcentages totaux (en %)

N°	Famille	Tl	Gl	Ms	To
1	Acide aliphatique	2,80	4,90	4,20	4,30
2	Acide aromatique	3,70	3,60	2,70	8,80
3	Esters	17,20	9,00	9,80	2,60
4	Flavonoides	42,30	37,4	23,1	3,9
5	Terpènes	5,60	19,9	26,8	12,6

L'identification a été confirmée par la comparaison des spectres de masse EI avec une librairie qui permet d'identifier avec précision les masses des composés présents dans la *propolis*.

Les figures Fig.19, Fig.21, Fig.23 et Fig.25 illustrent les spectres MS des composés sakuranetin (flavonone), quercetin methyl ether (flavonol), l'ester pentenyl p-coumarate et l'acide p-methoxy- cinnamic acid

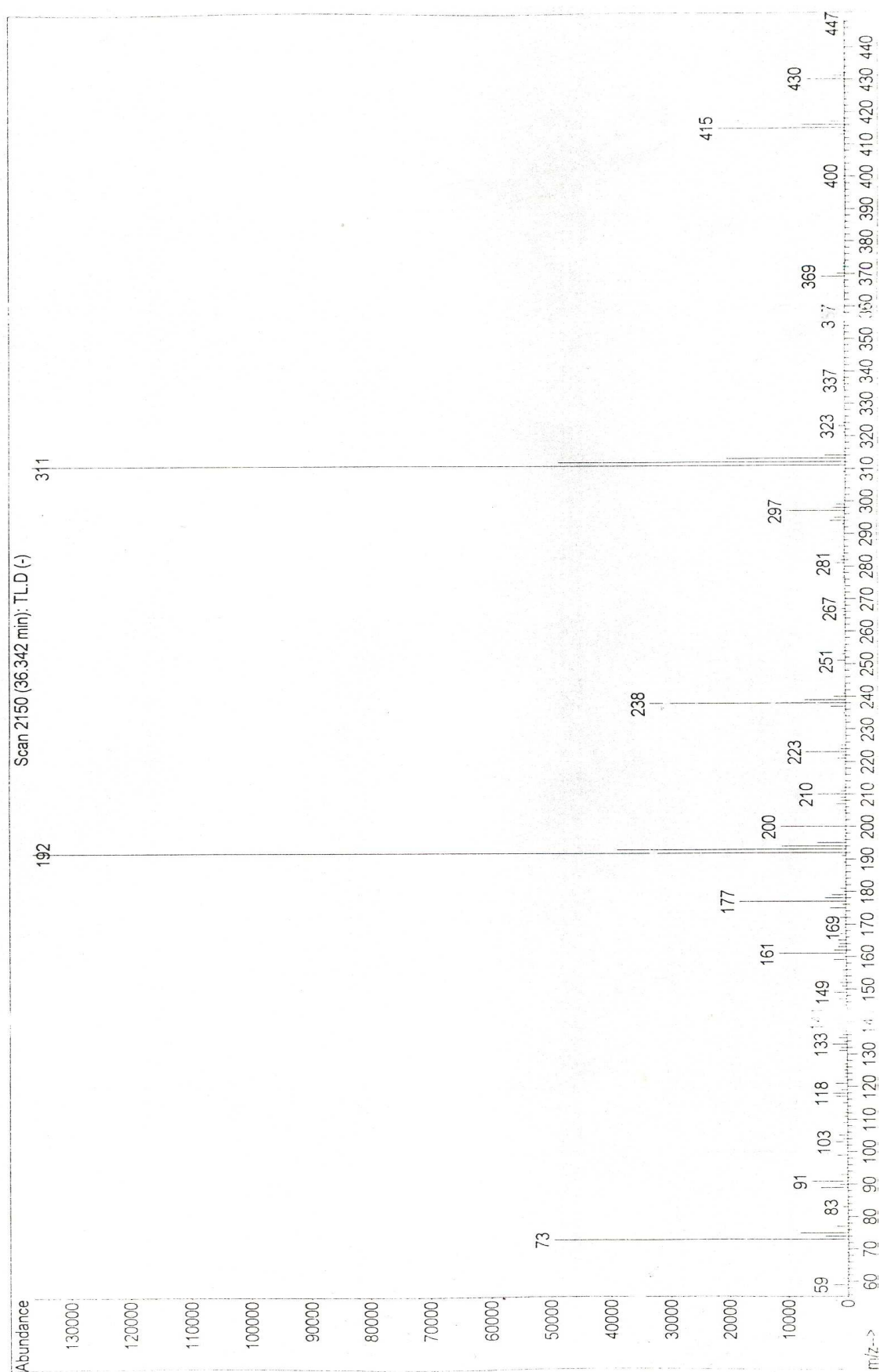


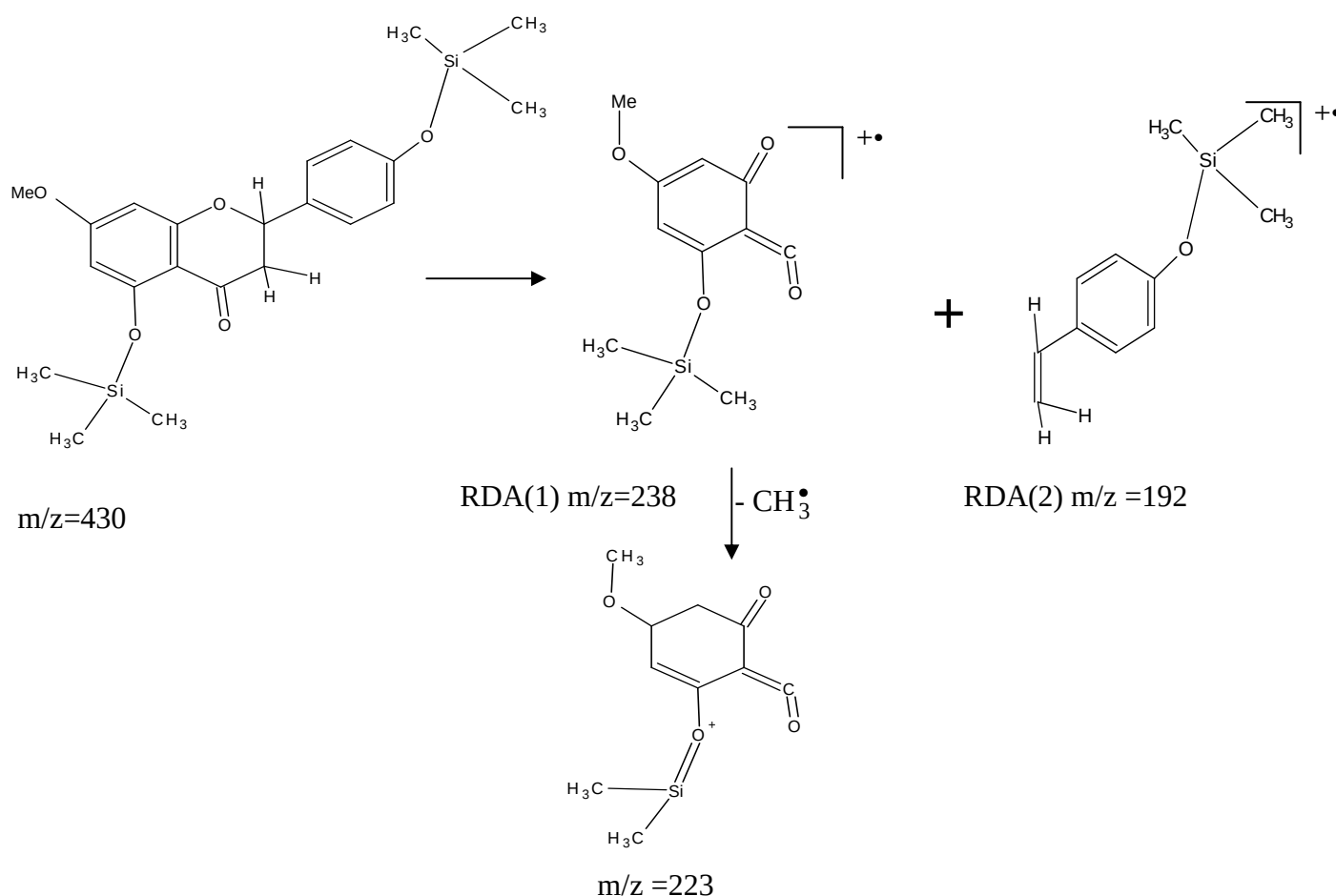
Fig 19 : Spectre de masse de la Sakuranetin

La silylation de la plus part des composés portant un hydroxyl libre, donne une grande possibilité dans la spectrométrie de masse (EI) d'augmenter le degré de température de leurs volatilité, dont l'ion moléculaire ainsi que les autres fragments sont facile à détecter

D'après le spectre de masse de la Sakuranetin, on remarque l'ion moléculaire de ce composé après silylation est visible à $m/z = 430$ (5%), suivi par un pic de $m/z = 415$ (15%), ce qui peut être expliqué par la fragmentation d'un groupe ($\text{CH}_3^\bullet$). Comme il été possible d'éliminer un autre groupe méthyl et le radical $^\bullet\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ pour donner de principaux pics, comme c'est le cas de pic de base à $m/z = 311$ (100%), le second pic principal observé est dû au clivage des liaisons faibles des composés flavonoidiques dans la noyau (C) car les cycles aromatiques (A) et (B) sont très stables, leur fragmentation est difficile, c'est pour cela que le fragment obtenu par le réarrangement Retro Diels Alder (RDA(2)) présenté par un pic intense à $m/z = 192$ (99%).

Le pic à $m/z = 73$ (36%) caractérise l'ion $\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$.

Le mécanisme proposé pour la fragmentation est comme suit (Fig. 20):





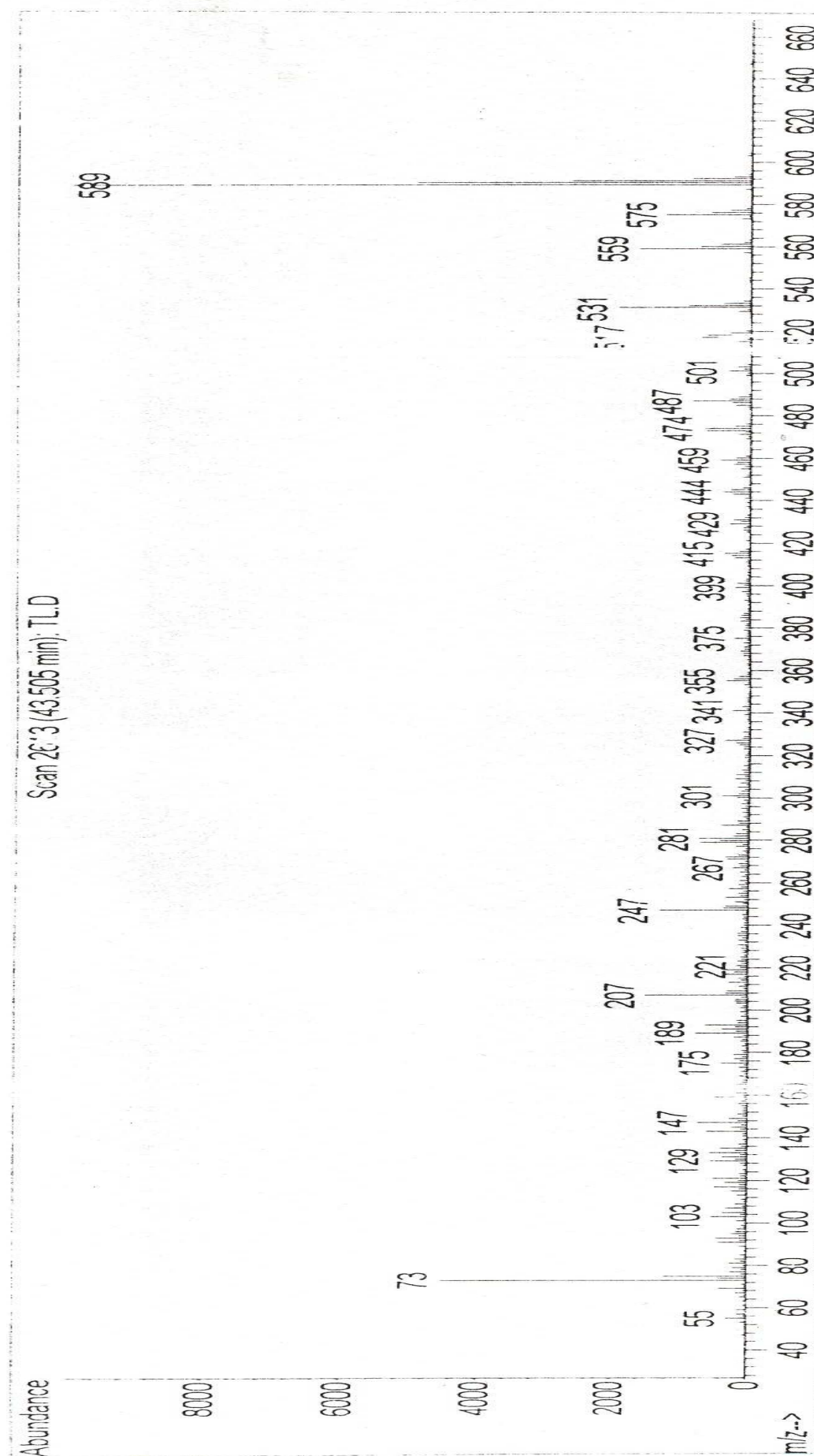


Fig. 21: Spectre de masse de la Quercetin methyl éther.

Le pic moléculaire qui doit être présent à $m/z = 604$ est inapparent, cela est expliqué par la grande fragilité de la molécule.

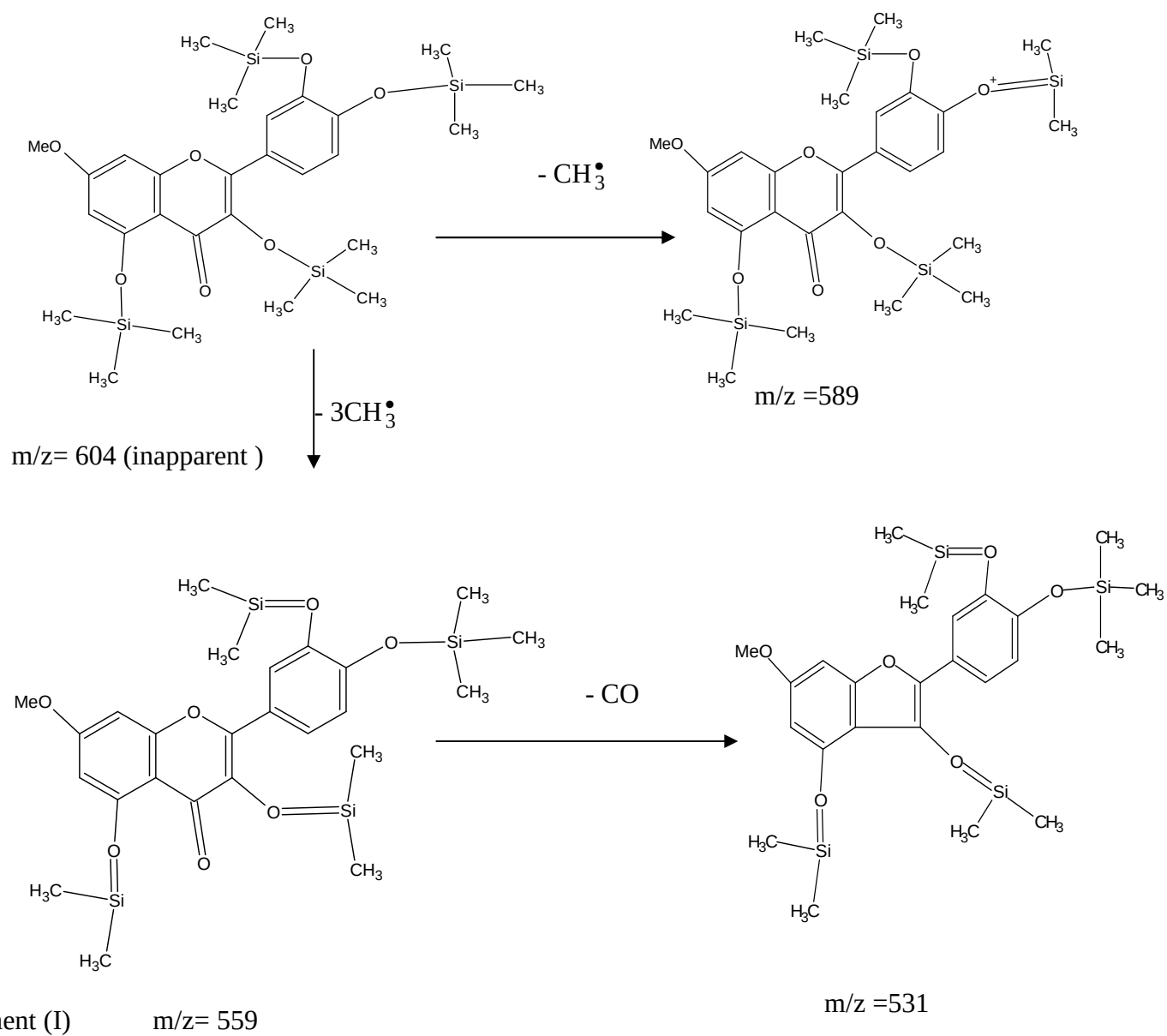
Le spectre (MS) produit par la fragmentation de la quercetin methyl ether permet d'observer le fragment à $m/z = 589$ avec une abondance relative de (100%), montrant que celui ci est un pic de base, obtenu par la perte d'un groupe méthyl CH_3 .

Les deux pics suivants à $m/z = 575$ (13 %) et 559 (16 %) correspondent à des pertes de deux autres méthyl par le groupe triméthyl silyl

Nous voyons apparaître sur le spectre (MS) un ion avec une masse inférieure au pics précédents, il correspond à $m/z = 531$ (19%), obtenu par la perte d'un atome (Si) ou d'un carbonyl (CO) de fragment (I).

Les fragments attendus à apparaître par le réarrangement (RDA), $m/z = 238$ (RDA(1)) et $m/z = 366$ (RDA(2)) ne sont pas présent sur les spectres à cause de leurs fragilité, mais nous voyons apparaître des ions avec des masses inférieures, il s'agit des structures obtenues par fragmentation des RDA(1) et RDA(2) ($m/z = 247$ (13 %) correspond à RDA(2)- 2CH_3 - $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ et $m/z 207$ (15%) correspond à RDA(1) - OCH_3)

Le pic $m/z = 73$ (45%) caractérise l'ion $\text{Si}(\text{CH}_3)_3^{+\bullet}$



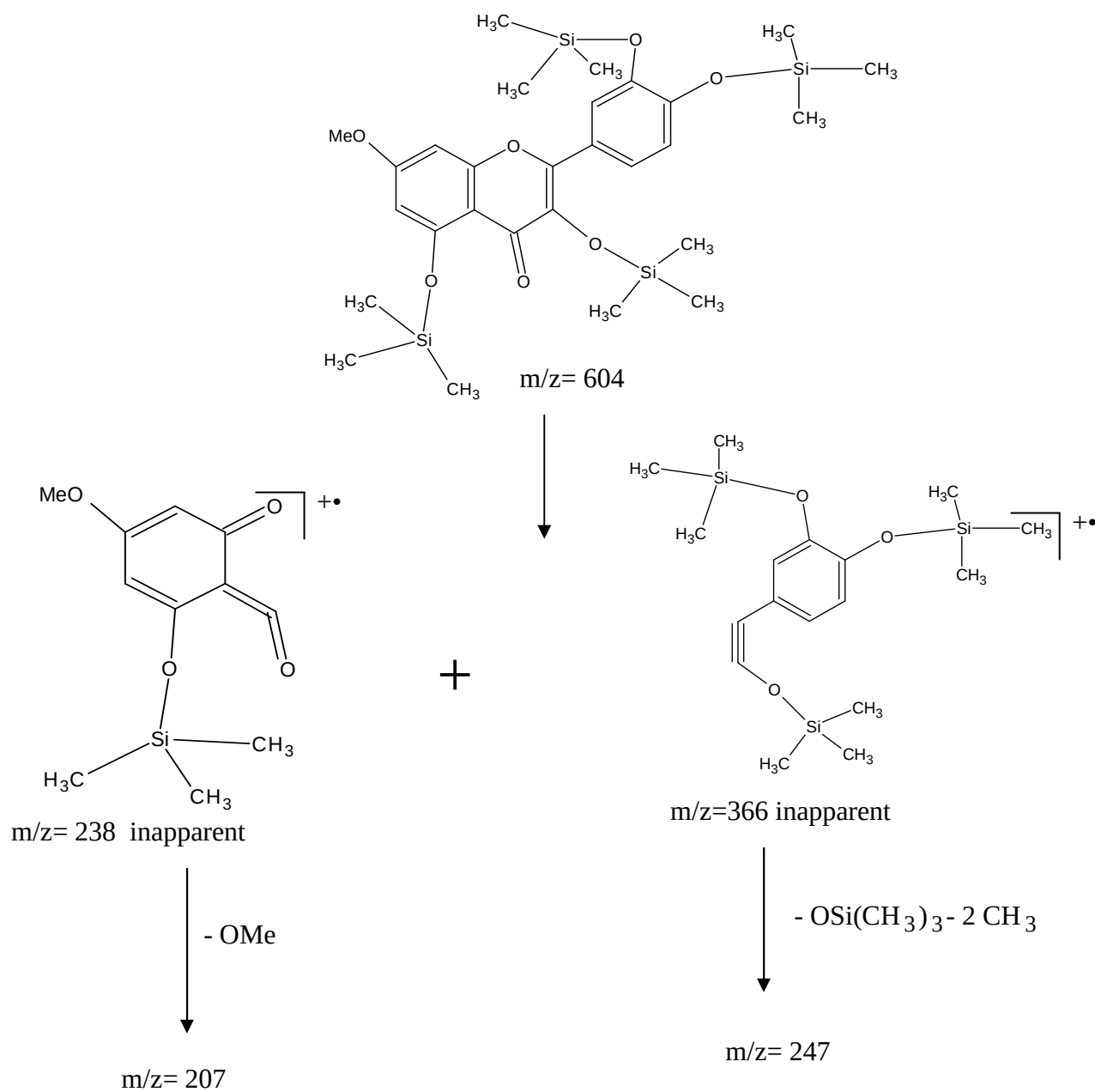


Fig. 22 : Schéma de fragmentation de composé quercetin methyl ether

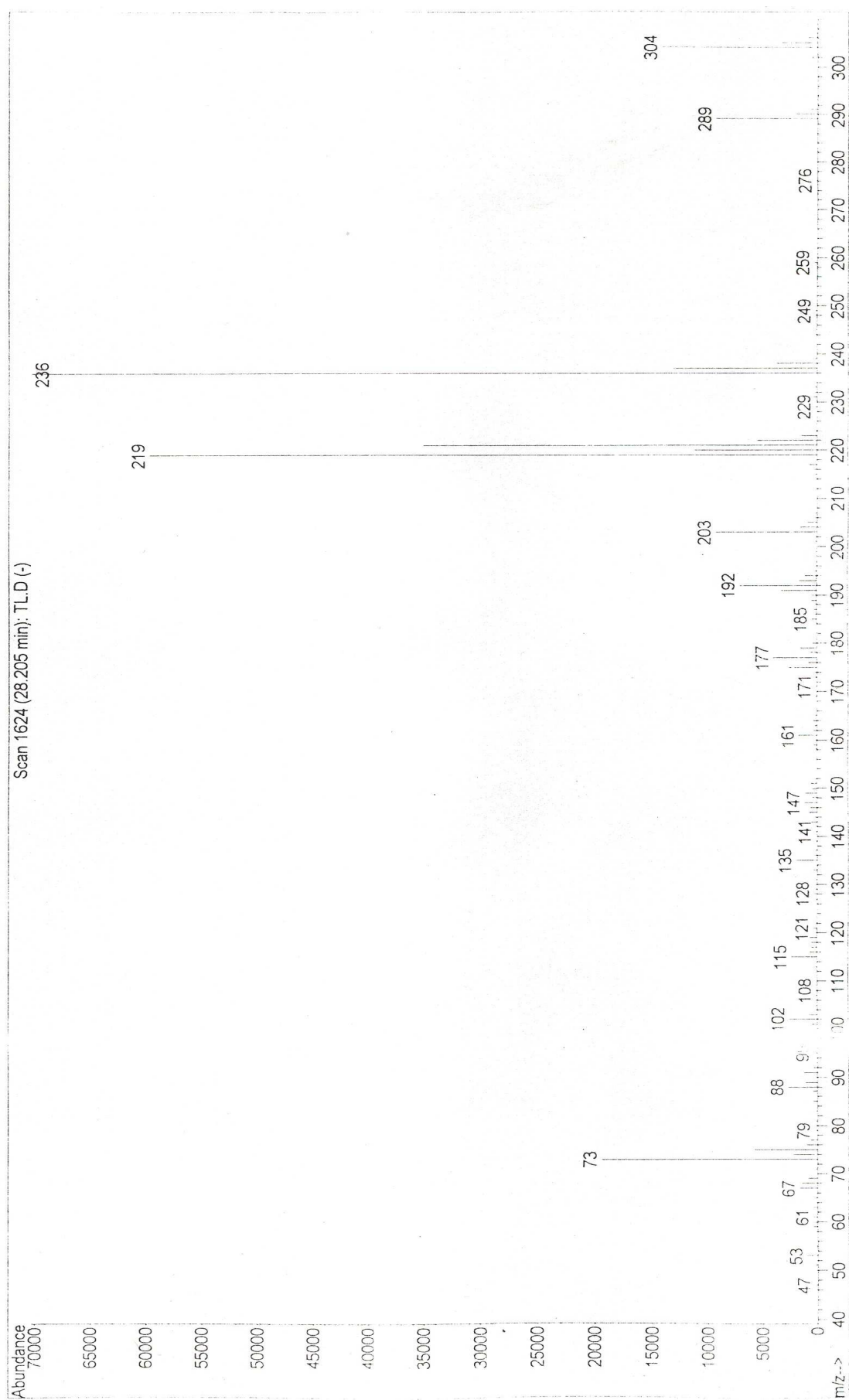


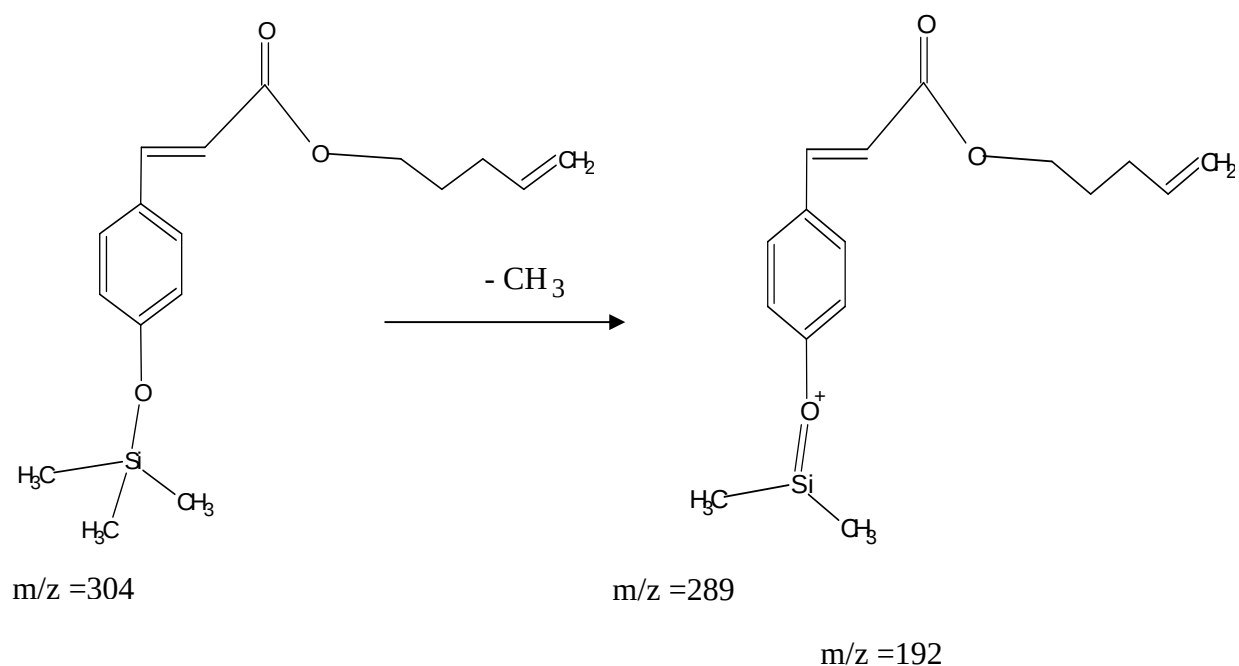
Fig 23 : Spectre de masse de la pentenyl p- coumarate

Le pic moléculaire correspond généralement au fragment le plus lourd, dans ce cas il s'agit de celui correspondant à $m/z = 304$ (23%).

Le fragment neutre perdu lors de la cassure qui génère le pic de base $m/z = 236$ (100%), présente la principale fragilité de la molécule il s'agit d'une perte du groupe pentenyl.

La fragmentation de $[M]^+\bullet$ montre un ion à $m/z = 289$ (13%) correspond à la perte d'un groupe méthyl et $m/z = 219$ (85%), indiquant la perte d'un pentenoxy.

L'ion $\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+\bullet$ fait apparaître le pic $m/z = 73$ (27%).



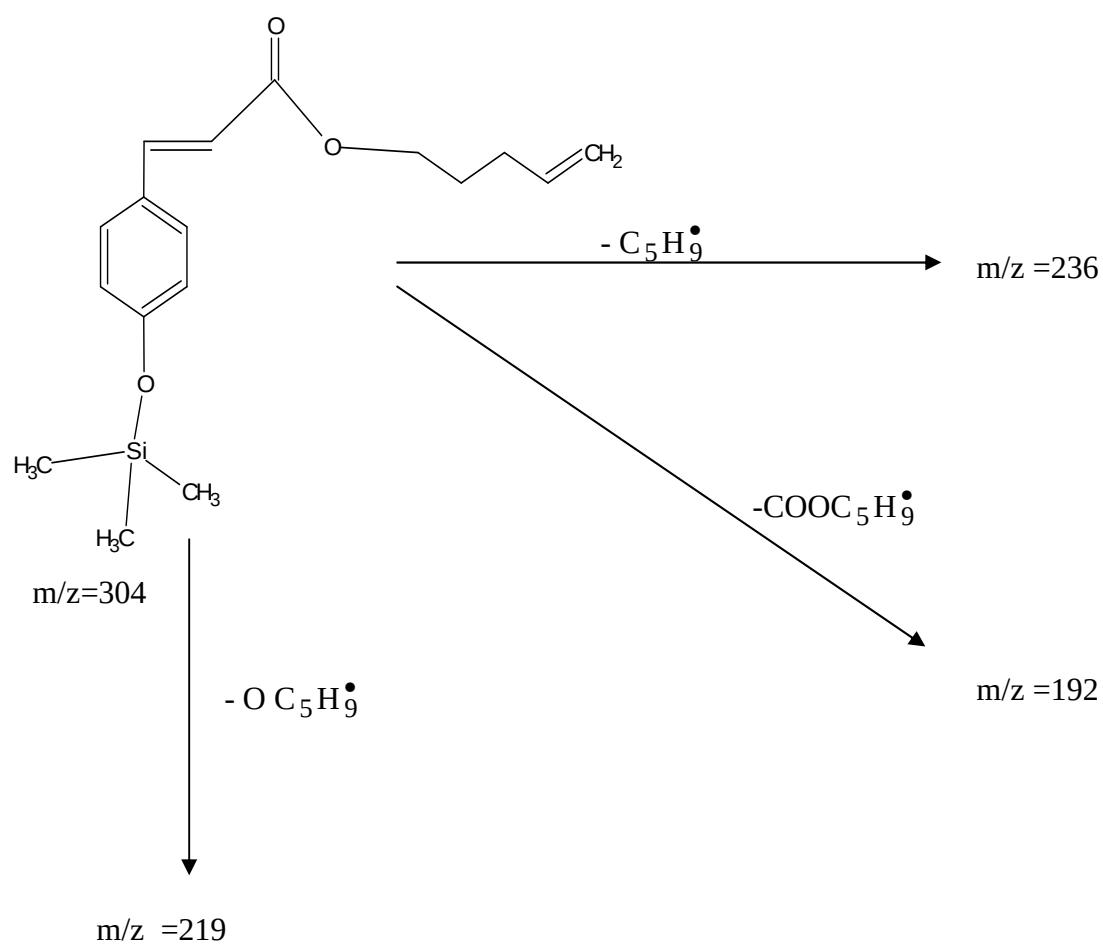


Fig. 24 : Schéma de fragmentation de composé pentenyl *p*-coumarate

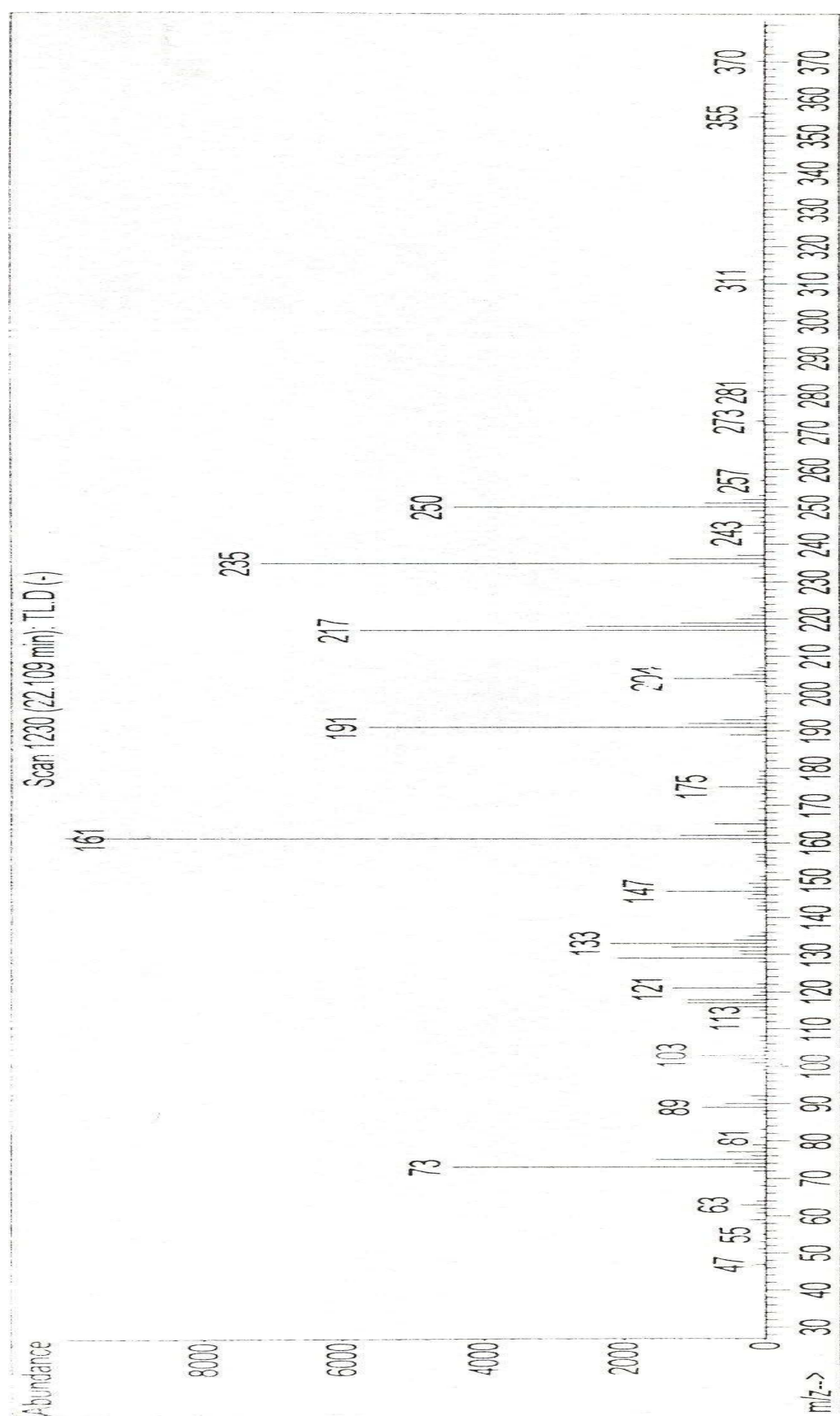


Fig. 25 : Spectre de masse de p-methoxy cinnamic acid

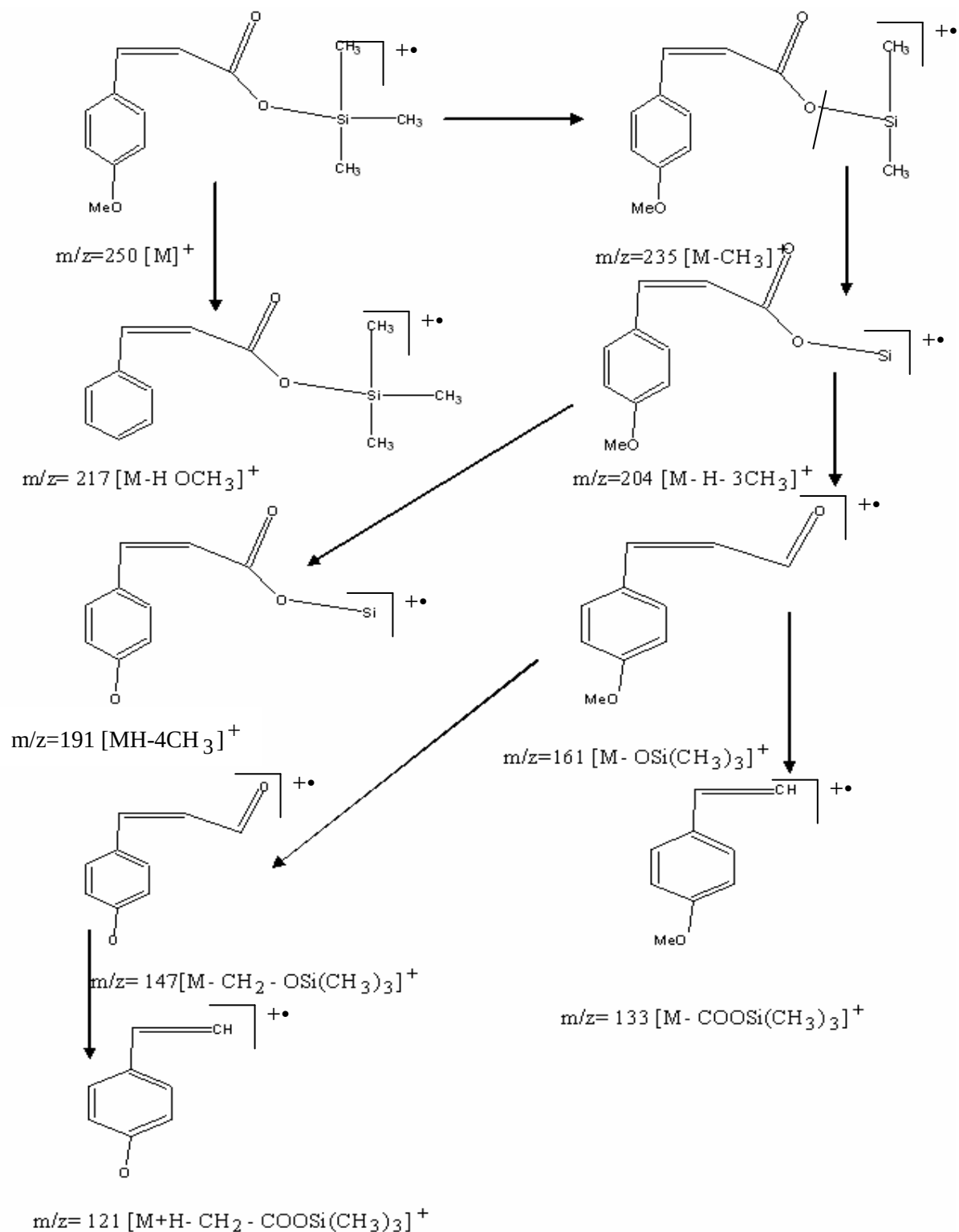


Fig. 26: Schéma de fragmentation de composé *p*-methoxy cinnamic acid

II-2-2 Discussion :

La méthode d'analyse que nous avons utilisé, nous a permis de connaître avec exactitude la composition chimique des quatre échantillons de la *propolis*, récoltés des différentes régions de l'Algérie. D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la *propolis* de Tlemcen est la plus riche en polyphénols (flavonoïdes, acide et esters phénoliques).

Nous remarquons aussi que les échantillons de Tlemcen, Guelma et M'sila, se ressemblent beaucoup en point de vue qualitatif, ce qui prouve qu'ils ont les mêmes sources végétales.

La *propolis* de la région de Tlemcen est similaire à la *propolis* standard de *peuplier Nigra*, la présence des flavonones (Pinocembrin, Pinostrobin ..), des flavones (Chrysin, Apeginin ...) et des flavonoïdes (galangin, Kaempferol, ...) avec des pourcentages élevés, est la preuve que cette *propolis* est d'origine de ce genre.

Et d'après l'étude faite par Bankova et autres^[20], où ils ont présenté les éléments de la *propolis* standard, et qui sont présentés dans le tableau suivant :

Composés	<i>Propolis</i> standard de <i>peuplier Nigra</i> (Min-Max) en %	Tl	Gl	Ms	To
Pinocembrin	4,2-12,4	5,9	6,9	9,5	0,2
Pinobanksin	1,7-6,2	3,9	3,0	3,5	0,6
Pinobanksin-O- acétate	3,7-12,0	7,4	5,9	4,4	0,2
Chrysin	5,9-12,2	7,5	6,9	1,9	0,4
Galangin	6,6-10,3	8,5	6,9	1,9	0,4
Pentenyl cafféate	0,7-7,5	4,7	2,1	1,8	0,3
Benzyl cafféate	1,7-6,5	4,9	1,4	1,2	1,2
Phenethyl cafféate	1,4-5,3	0,9	1,7	0,9	0,2
Diterpenic acid	/	2,0	8,6	20,1	9,1

Tableau N°17 : Eléments standards de la *propolis* du *peuplier nigra*

Donc nous pouvons conclure que l'échantillon de Tlemcen a comme source principale le *Peuplier Nigra* avec la participation d'autres espèces.

La *propolis* de la région de Guelma est très similaire de point de vue qualitatif et quantitative à celle de Tlemcen, c'est à dire qu'ils ont la même origine végétale.

Le taux élevé des terpènes , signifie qu'il existe une autre source principale, qui peut être une autre espèce de peuplier comme le *Peuplier Italica*, l'*eucalyptus* ou des espèces d'*Araucaria* [66], sachant que la région de Guelma est connue par sa diversité florale .

La *propolis* de M'sila est peu similaire au deux premiers échantillons, sauf que les taux de la chrysin et la galangin sont inférieurs des taux habituelles de la *propolis* standard de *peuplier Nigra*, comme on remarque aussi un taux très élevé des terpènes (26,8 %).

Ces résultats sont similaires aux résultats publiés par Bankova et le Professeur SAADI Houcine, qui ont étudié la *propolis* de la région méditerranéenne, ils ont constaté que la *propolis* algérienne contient un taux élevé en terpènes [22].

La *propolis* de Tizi-Ouzou est très différente aux précédentes, elle ne contient presque ni flavonoides, ni esters (2,6% et 3,9 % respectivement), ce qui confirme qu'elle n'est pas originaire de *Peuplier Nigra* , d'ailleurs d'après la flore de site de prélèvement, on constate l'absence totale de cette espèce.

Le taux élevé de l'acide Isoferulique (6,7 %) est peut être justifié par la présence de *Peuplier trémula* ou du *peuplier Italica*. Les bourgeons de cette espèce ont fait l'objet des investigations par Bankova, ces analyses ont montré que les bourgeons du *peuplier trémula* contiennent 37 % d'acide ferulique et celles du *peuplier Italica* contiennent 4% de l'acide Isoferulique [16] .

Les deux composés non identifiés de cette *propolis* feront l'objet des recherches à l'avenir pour permettre de mieux connaître leurs structures chimiques.

Enfin, nous pouvons conclure que notre étude confirme les études antérieures sur la *propolis*, et confirme aussi sa richesse en polyphénols, ainsi que son origine qui s'agit de différentes espèces du peuplier.

II-3 Effet antioxydant

L'effet antioxydant des extraits de la *propolis*, récoltés au niveau des différentes régions, est évalué par mesure de la chimiluminescence de luminol induite chez les neutrophiles humains, en utilisant Luminometre Microlumat LB 96V (EG1 and G.Berthold Wildbad, Germany). 4×10^5 de neutrophiles / puits sont incubés en présence d'une gamme de concentration de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ des extraits de la *propolis* avec Luminol (10^{-5} M) dans le tampon de Hanks pour 1,30 min à 37°C, avant l'injection de 50 μl de fMLP (1 μM) ou de PMA (100 nM). Il est à noter que l'activation des neutrophiles par fMLP exige la présence de la Cytochalasin B (10 μM). Les résultats sont comparés au contrôle sans extrait de la *propolis* qui représente 100 % de la luminescence. La spécificité de l'oxydation de luminol est vérifiée par la superoxyde dismutase (100 U/ml).

II-3-1 Isolement et Cytotoxicité des PMNs humains

La méthode d'isolement utilisée a permis d'obtenir un grand nombre de PMNs, environ 30×10^6 cellules par 10 ml de sang prélevé d'un sujet sain non fumeur.

La viabilité des PMNs isolés est estimée à plus de 95 % par le test d'exclusion au bleu trypan, dont 95% des cellules sont des PMNs.

Cytotoxicité des PMNs :

Le test d'exclusion au bleu trypan est utilisé pour évaluer l'effet cytotoxique des extraits objet de cette étude.

L'incubation des PMNs isolés avec des concentrations de propolis allant jusqu'à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour les quatre échantillons, a montré que le taux de viabilité est environ 95 %, par comparaison avec les cellules non traitées, ce qui indique que la propolis n'a exercé aucun effet cytotoxique envers les PMNs humains.

La figure (Fig. 27) montre la cytotoxicité des extraits de propolis sur les PMNs humains

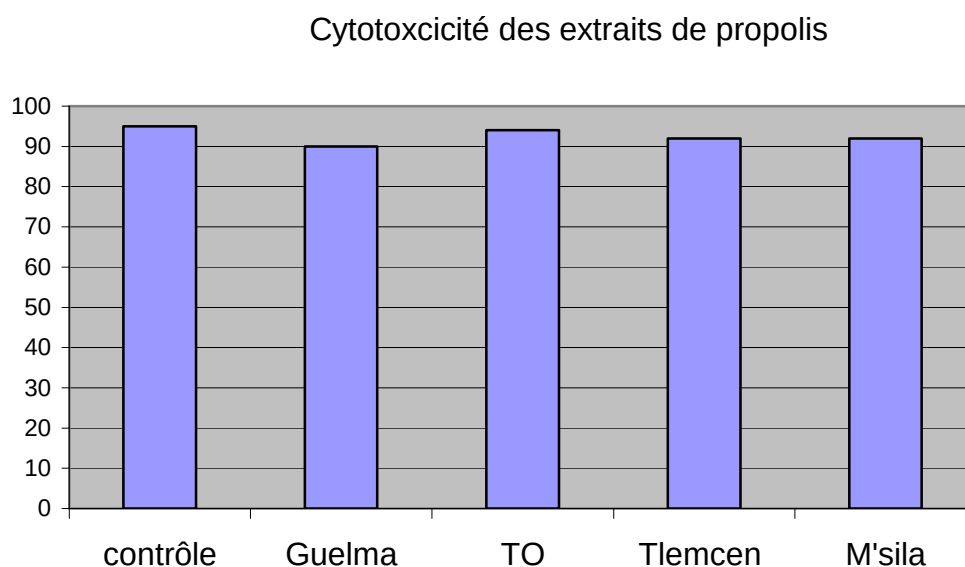


Fig. 27 : Evaluation de la cytotoxicité des extraits de propolis par le bleu trypan

PMNs (3×10^6 cellules / ml) sont incubés à 37°C pendant 30 min en absence et en présence des extraits de propolis (100µg/ml). Puis, la viabilité cellulaire est évaluée par le teste d'exclusion au bleu de trypan.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en référence à un témoin non traité

II-3-2 Stimulation par fMLP :

II-3-2-1 Résultats :

L'injection de la propolis à différentes concentrations dans une solution qui contient les PMNs stimulés par le fMLP nous a donné les résultats suivants :

<i>Propolis</i>	GUELMA (%)	Tizi-ouzou (%)	TLEMCEN (%)	M'SILA (%)
0 µg/ml	0	0	0	0
1 µg/ml	7	5	30	20
2,5 µg/ml	38	27	89	67
5 µg/ml	83	54	98	84
10 µg/ml	95	82	99	98

Tableau N° 18 : L'inhibition de la chimiluminescence en pourcentage

Pour bien présenter ces résultats nous avons présenté le diagrammes et les histogrammes suivants :

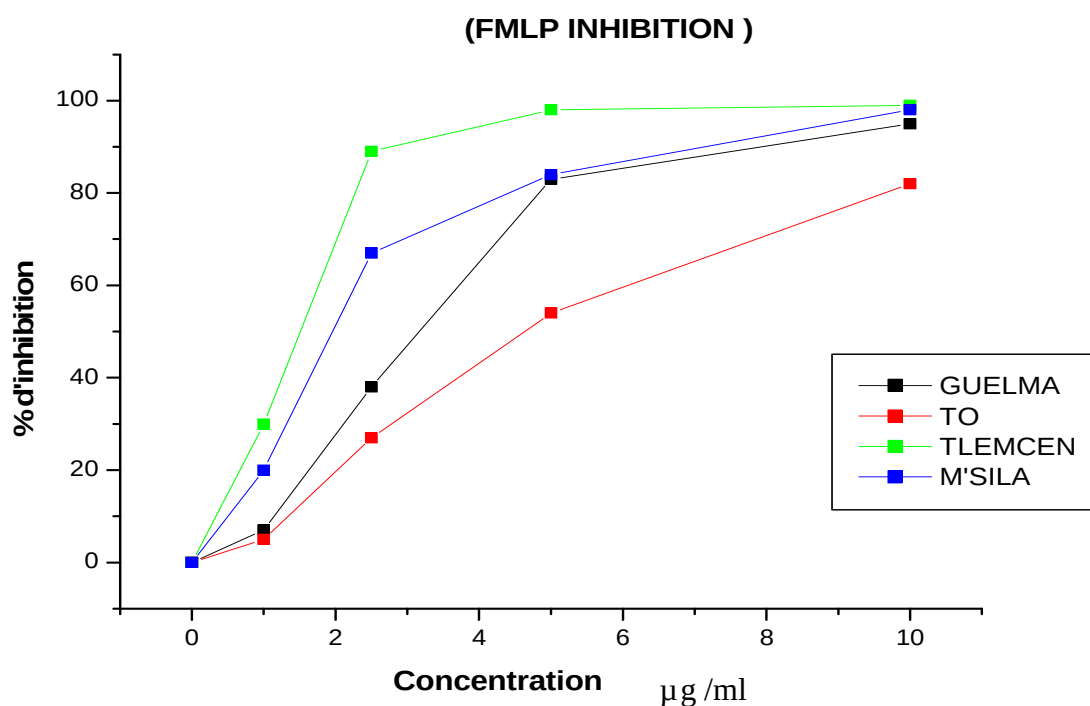


Fig 28: Profil d'inhibition de la chimiluminescence de luminol chez les neutrophiles humains stimulés par fMLP. Les neutrophiles sont incubés en présence de différentes concentrations de l'extrait de la *propolis* récolté de 04 régions Guelma, Tizi-Ouzou, Tlemcen et M'sila (1-10 µg /ml)

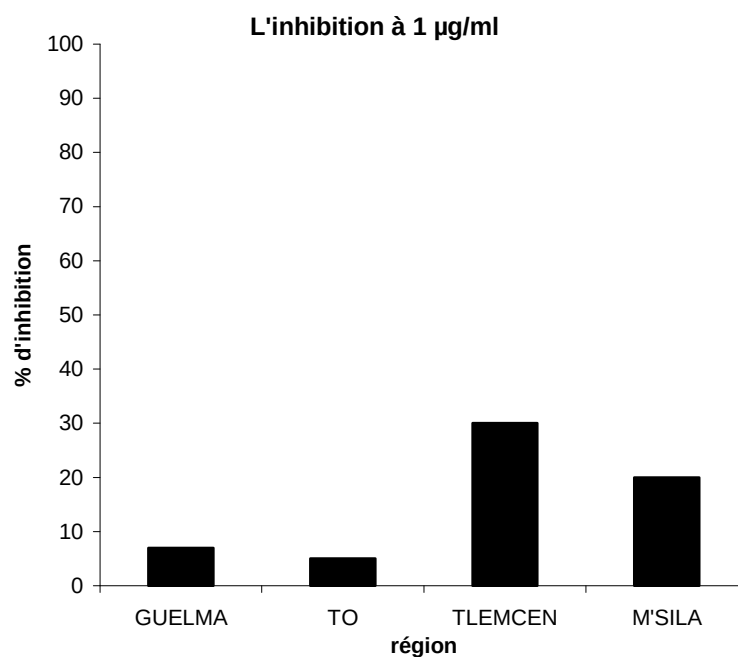


Fig. 30 Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par fMLP. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (1 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de fMLP (1 µM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 15 min après injection de fMLP

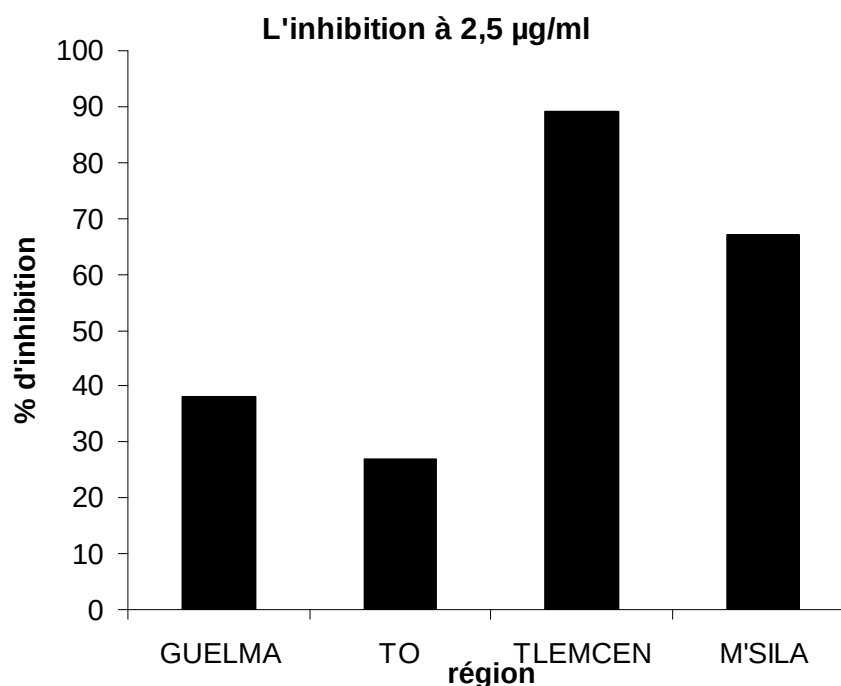


Fig. 31 Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par fMLP. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (2,5 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de fMLP (1 µM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 15 min après injection de fMLP

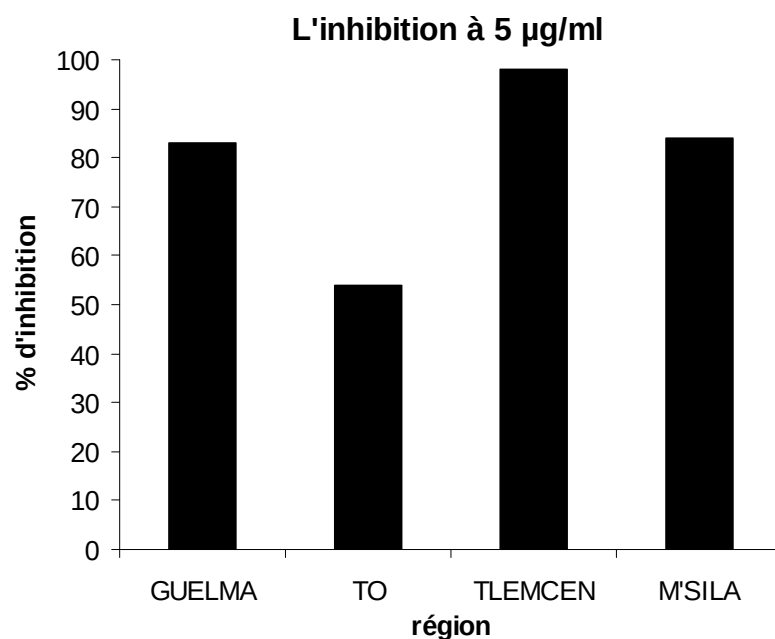


Fig. 32 Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par fMLP. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (5 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de fMLP (1 µM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 15 min après injection de fMLP

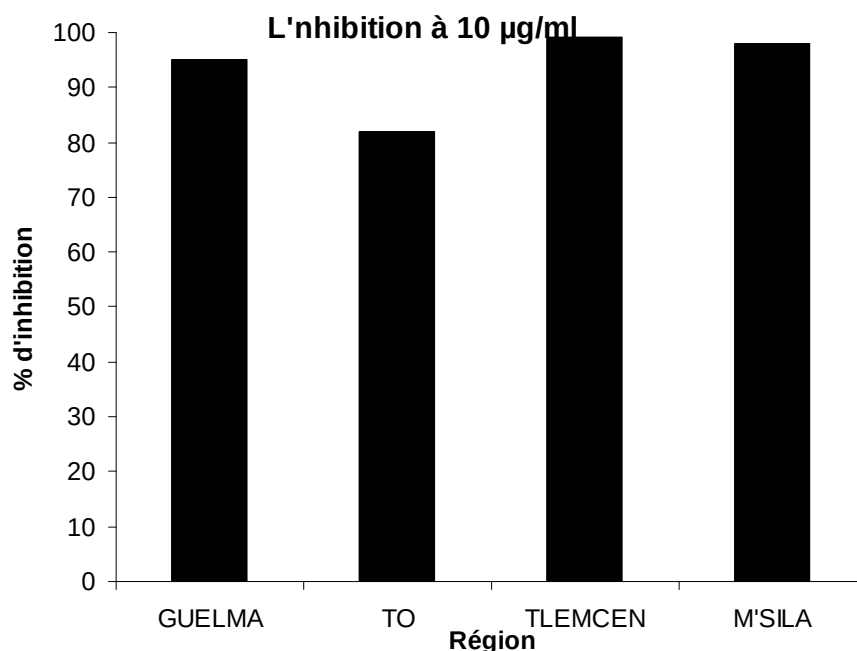


Fig. 33 Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par fMLP. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (10 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de fMLP (1 µM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 15 min après injection de fMLP

II-3-2-2 Discussion :

Pour la concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, on remarque que tous les échantillons ont des différents effets, avec des degrés d'inhibition très variés. On voit clairement que l'échantillon de Tlemcen a le meilleur effet (30%) d'inhibition, puis l'échantillon de M'sila (20%), les deux autres échantillons ont des faibles pourcentages : 5% et 7% pour Tizi-ouzou et Guelma respectivement.

L'inhibition a gardé la même cadence, en augmentant les concentrations de la *propolis* allant jusqu'à 10 $\mu\text{g/ml}$, où on a eu des résultats très satisfaisants : 99 % pour Tlemcen, 98 % pour M'sila, et 95% ,82 % respectivement pour Guelma et Tizi-Ouzou.

II-3-3 Stimulation par PMA

II-3-3-1 Résultats :

Pour ce mode de stimulation des PMNs ou seul la protéine responsable à la génération des radicaux libres est activée, nous avons eu les résultats suivants (Tableau N° 19) :

<i>Propolis</i>	GUELMA (%)	TiziOouzou (%)	TLEMCEN (%)	M'SILA (%)
0 $\mu\text{g/ml}$	0	0	0	0
1 $\mu\text{g/ml}$	1	-63	52	-25
2,5 $\mu\text{g/ml}$	39	-27	65	-9
5 $\mu\text{g/ml}$	74	9	88	32
10 $\mu\text{g/ml}$	89	52	96	65

Tableau N° 19 : L'inhibition de la chimiluminescence en pourcentage

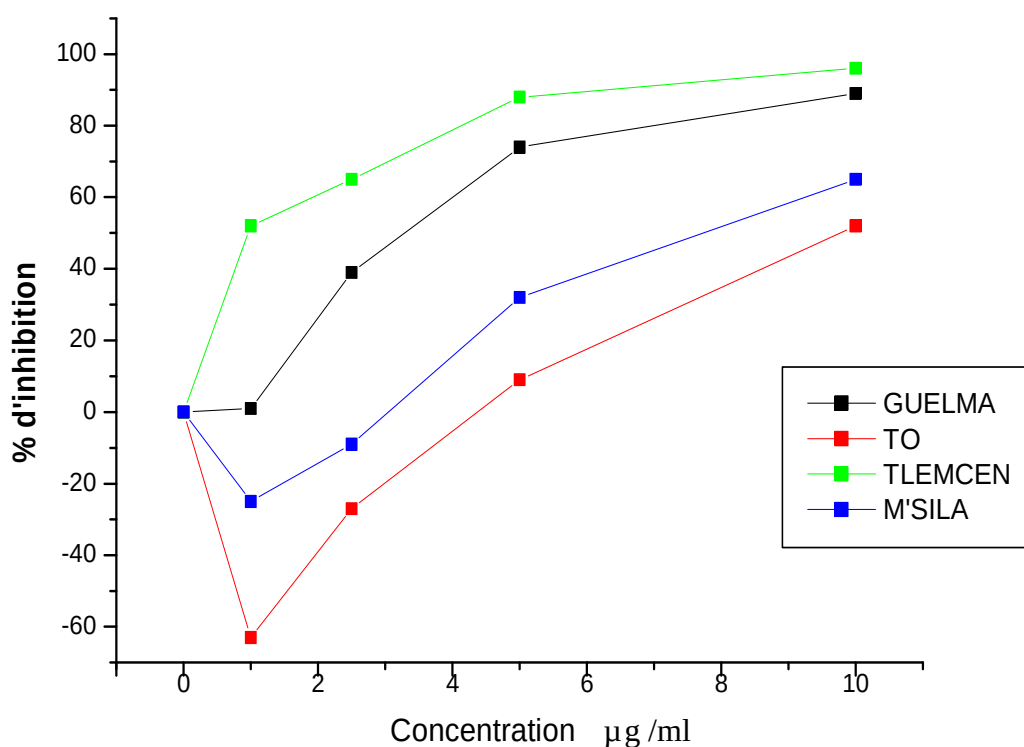


Fig. 34 : Profil d'inhibition de la chimiluminescence de luminol chez les neutrophiles humains stimulés par PMA. Les neutrophiles sont incubés en présence de différentes concentrations l'extrait de la propolis récolté de 04 régions Guelma, Tizi-Ouzou, Tlemcen et M'sila (1-10 $\mu\text{g/ml}$)

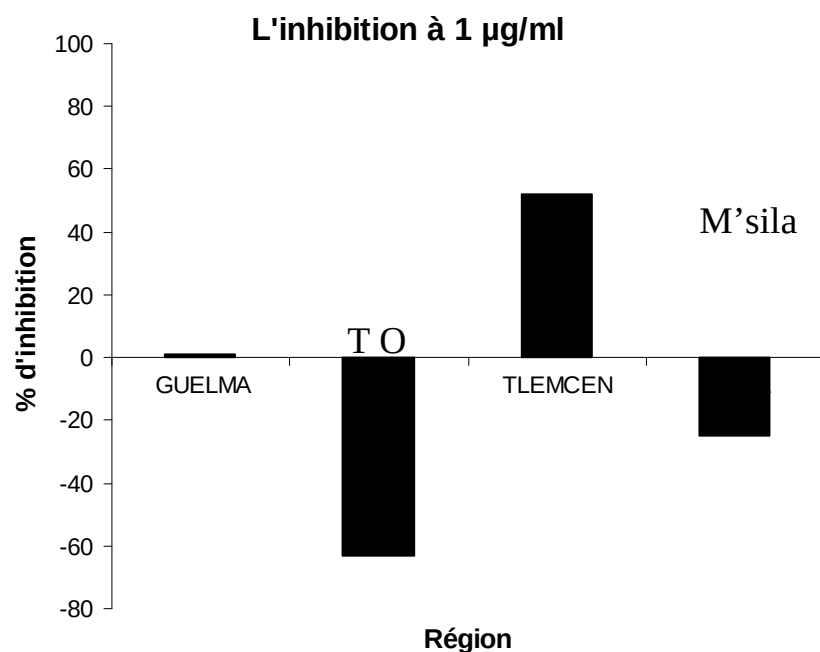


Fig. 36. Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par PMA. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (1 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de PMA (100 nM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 25 min après injection de PMA

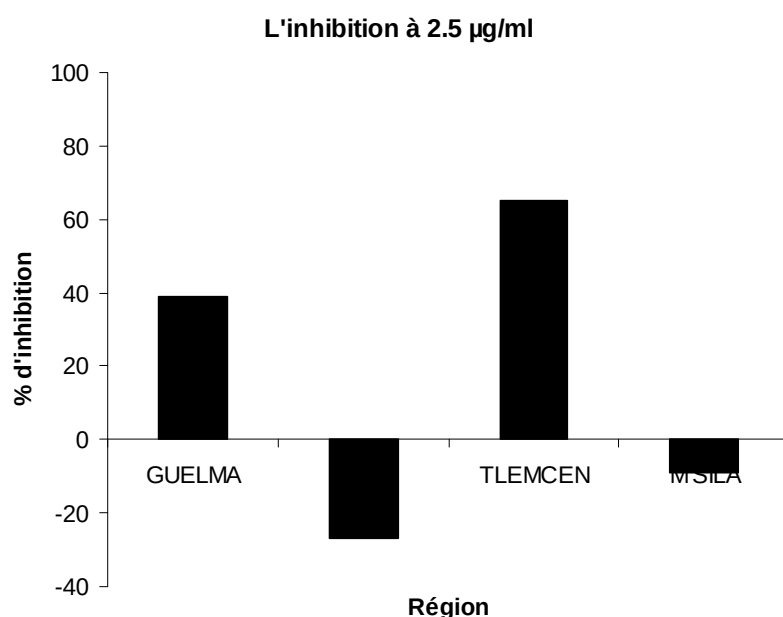


Fig. 37 Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par PMA. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (2,5 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de PMA (100 nM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 25 min après injection de PMA

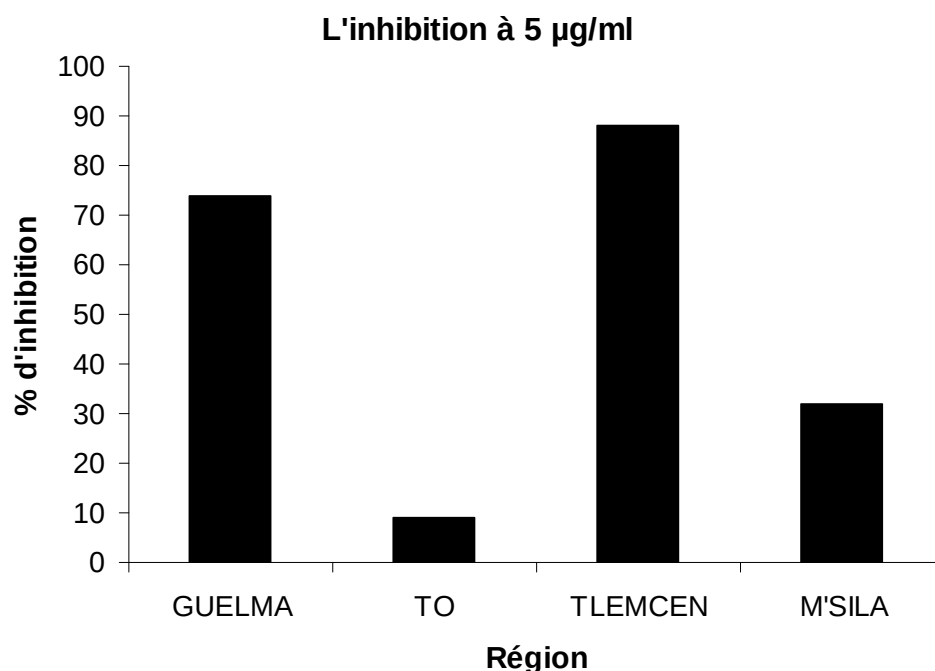


Fig. 38 : Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par PMA. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (5 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de PMA (100 nM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 25 min après injection de PMA

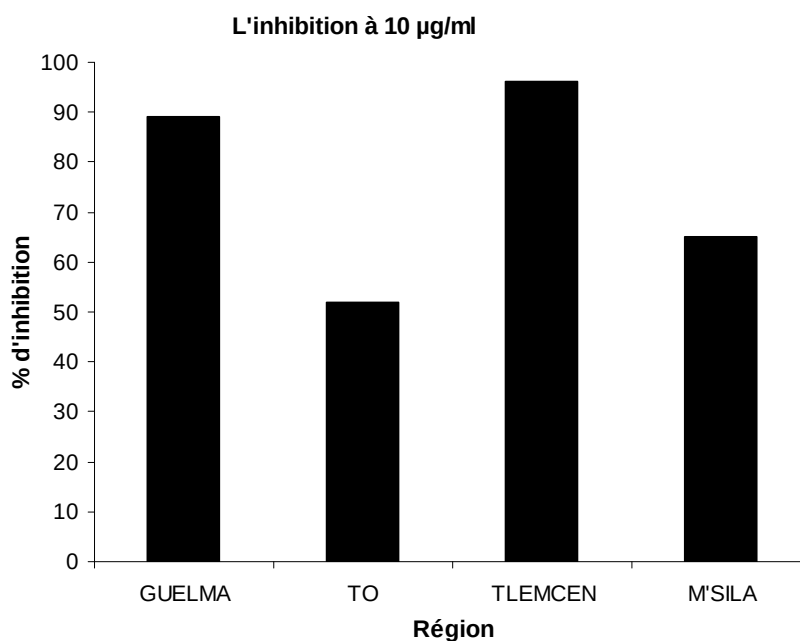


Fig. 39 : Effet des extraits de la *propolis* sur la chimiluminescence de luminol induite par l'anion superoxyde généré par les neutrophiles humains stimulés par PMA. 4×10^5 de neutrophiles humains sont incubés en présence des extraits de la *propolis* (10 µg/ml) avec luminol (10 µM) dans le tampon de Hanks. La chimiluminescence est enregistrée après injection de 50 µl de PMA (100 nM). Luminescence totale est déterminée comme l'intégrale de 25 min après injection de PMA

II-3-3-2 Discussion

La première remarque que nous pouvons retirer, est que la *propolis* réduit significativement et de manière dose dépendante la luminescence des PMNs stimulés par PMA, c'est à dire que cette inhibition est en fonction de la concentration des extraits de la propolis.

La deuxième remarque, c'est que à faibles concentrations, les extraits de la *propolis* ont des effets pro-oxydants, c'est à dire qu'ils augmentent la luminescence, ce qui reflète l'influence des flavonoides, qui ont le même effet prooxydent à faibles concentrations.

II-3-4 Calcule de IC₅₀

Pour calculer le IC₅₀, on détermine l'équation de la droite de régression pour chaque courbe et on calcule pour une inhibition de 50 % la concentration correspondante.

La droite de régression pour l'échantillon de Tlemcen est montrée sur la Fig. 40 :

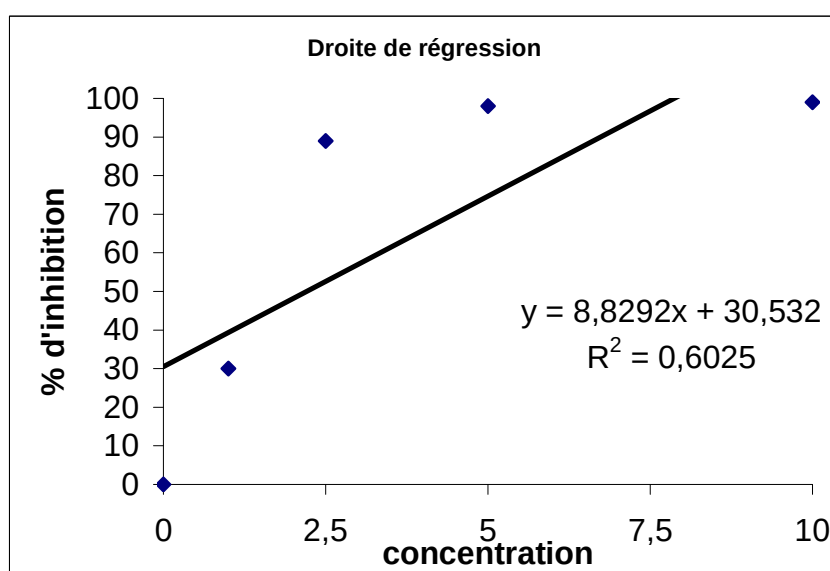


Fig. 40: Droite de régression pour l'échantillon de Tlemcen

Le IC₅₀ de l'échantillon de Tlemcen est calculé à partir de l'équation de la droite de régression déterminée par ordinateur :

$$IC_{50} = \frac{50 - 30,532}{8,8292} = 2,20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

On donne les valeurs des IC₅₀ des 04 échantillons de propolis (Tableau N° 20)

Tableau N°20 : Les concentrations d'inhibition à 50% de la luminescence des quatre échantillons pour les deux modes de stimulation :

La région	fMLP	PMA
Guelma	4,35	4,68
TiziOzou	5,63	10,80
Tlemcen	2,20	2,40
M'sila	3,29	8,28

Tableau N°20 : IC₅₀ (en µg/ml) des échantillons de propolis

II-3-5 Discussion de l'activité antioxydante :

Dans la présente étude, nous pouvons conclure que les extraits éthanoliques de la *propolis* testés, ont exercé aucun effet cytotoxique envers les PMNs humains, donc l'utilisation de cette matière pour des intérêts médicales n'a aucun effet toxique sur les être humains, cette conclusion est approuvée par des études antérieure sur l'utilisation de la propolis *in vivo*.

Nous remarquons aussi que soit pour la stimulation par PMA ou par fMLP, des concentrations faibles de la *propolis* ont montré un effet pro-oxydent. C'est à dire que les éléments qui existe dans son contenu ont un effet pro-oxydent. Cette remarque été déjà constatée dans des études faites sur les flavonoides^{[67] [68]}.

Et autant qu'on augmente la concentration, l'effet antioxydant s'améliore jusqu'à l'obtention des résultats très satisfaisants, alors on peut conclure que l'influence se fait de manière dose - dépendent.

Nous pouvons aussi dire que la *propolis* a un effet inhibiteur et scavenger au même temps, c'est à dire que les composés contenus dans la *propolis* peuvent intervenir pendant la réaction inflammatoire, comme des inhibiteurs des enzymes responsables de $O_2^{\bullet-}$, comme ils peuvent piéger les radicaux libres générés (produits de la réaction inflammatoire).

Car la stimulation des neutrophiles humains par le fMLP excite un récepteur qui se trouve sur la membrane du neutrophile, qui crée un signal, ce dernier est l'origine de toute une cascade de réactions intracellulaires, qui se termine par la génération de la superoxyde dû à l'activation de la NADPH oxydase.

Par contre la stimulation par PMA intervient directement au niveau de la protéine (PI3 Kénase) cette dernière, active la NADPH oxydase qui par suite génère de la superoxyde.

Donc, d'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que les deux échantillons de la propolis de M'sila et de Tizi-Ouzou ont prouvé que l'effet inhibiteur, car ils ont montré à la même concentration un effet positif dans la stimulation par fMLP et un effet négatif pour la stimulation par PMA, ce qui implique que à 1 µg/ml et à 2,5 µg/ml, ces *propolis* n'ont pas pu piéger les radicaux libres, mais ils ont bloqué la cascade des réactions qui les génèrent.

Mais à partir de 5 µg/ml, le pouvoir de piéger les radicaux libres est apparu, et ces mêmes échantillons ont montré un effet scavenger, cela semble logique car les flavonoides ont cette propriété, elles exercent un effet prooxydant à faibles concentrations puis à partir d'un certain seuil, l'effet positif commence à apparaître.

Pour les deux autres échantillons (de Tlemcen et de Guelma) nous constatons qu'ils ont le double effet inhibiteur et scavenger, car pour les deux modes de stimulation ont montré un effet positif.

Les différences marquées entre les effets anti-oxydants, des quatre échantillons de la *propolis*, dépendent de leurs compositions chimiques.

L'effet brillant de l'échantillon de Tlemcen est dû à sa concentration très élevée en flavonoides et en esters d'acides phénoliques (42,30 et 17,20 % respectivement).

D'après les études de Dragon et autres^[67], Paul Cos et autres^[68], la galangin, la quercetin, le kaempferol et la chrysin prouvent une grande capacité d'inhibition même à faibles concentrations (leurs IC₅₀ sont respectivement 1,80 ; 2,62 ; 1,06 et 0,84 µM/ml), ces éléments ont été identifiés dans la *propolis* des quatre régions mais à différentes concentrations, ce qui reflète leurs activités antioxydantes.

Aussi d'après les résultats obtenus par Takema et autres^[26] qui ont étudié l'effet antioxydant de plusieurs composés phénoliques de la *propolis* de Netherland, ils ont trouvé que les dérivés de l'acide caféique tel que Benzyl caffeate, cinamyl caffeate, pentenyl caffeate et principalement le phenethyl caffeate (CAPE : caffeic acid phenethyl ester) ont des effets très remarquables sur le piégeage des radicaux libres, comme ils ont démontré qu'elle existe une synergie entre ces composés.

Le grand effet antioxydant de l'échantillon de M'sila, qui est supérieur à celui de Guelma pour la stimulation par fMLP peut être justifié par la grande présence de la Pinocembrin (9,5 %), sachant qu'elle a un grand effet inhibiteur (Paul Cos), ou bien il est dû au taux importants des terpènes malgré que leurs effets inhibiteur n'a pas été encore démontré.

Mais à la concentration de 5 µg/ml les pourcentages d'inhibition de l'échantillon de Guelma et celui de M'sila sont 83% et 84 % respectivement, cela est peut être expliqué par la présence de l'effet synergique entre les flavonoides de la *propolis* de Guelma.

L'effet modeste de la propolis de Tizi-Ouzou, qui n'est pas été prévu, ne peut être dû aux faibles concentrations des flavonoides et des esters, la seule explication c'est que cet effet est dû au deux composés non identifiés dans cet échantillon. Cela demande un travail supplémentaire pour le démontrer.

MATERIEL ET METHODES :

III-1 Récolte :

L'étude phytochimique est effectuée sur la propolis prélevée des ruches des différentes régions de l'Algérie : Guelma (Est), Tizi-ouzou (Centre) Tlemcen (Ouest) et M'sila (Sud-est).

Le produit est stocké au réfrigérateur à une température de 5°C.

Tableau N°21 : Origine géographique et temps de collection des différents échantillons de propolis :

Echantillon	Région	Année
Tl	Tlemcen	Aout2002
Gl	Guelma	Septembre 2002
Ms	M'sila	Septembre 2003
To	Tizi-Ouzou	Juin 2002

III-2- Extraction :

La préparation de l'extrait de la propolis est réalisée à la température ambiante (macération).

Un gramme de chaque échantillon est coupé en petits morceaux, il est ensuite broyé et extrait dans un volume de 15 ml d'une solution éthanol/eau (7/3 : v/v) pendant 24 h.

Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Après récupération des trois filtrats, une évaporation sous vide est réalisée (Rota vapeur) à 70 °C, juste après les résidus obtenus de chaque échantillon sont pesés. La figure (*Fig 41*) illustre les différentes étapes de la préparation de l'extrait éthanolique

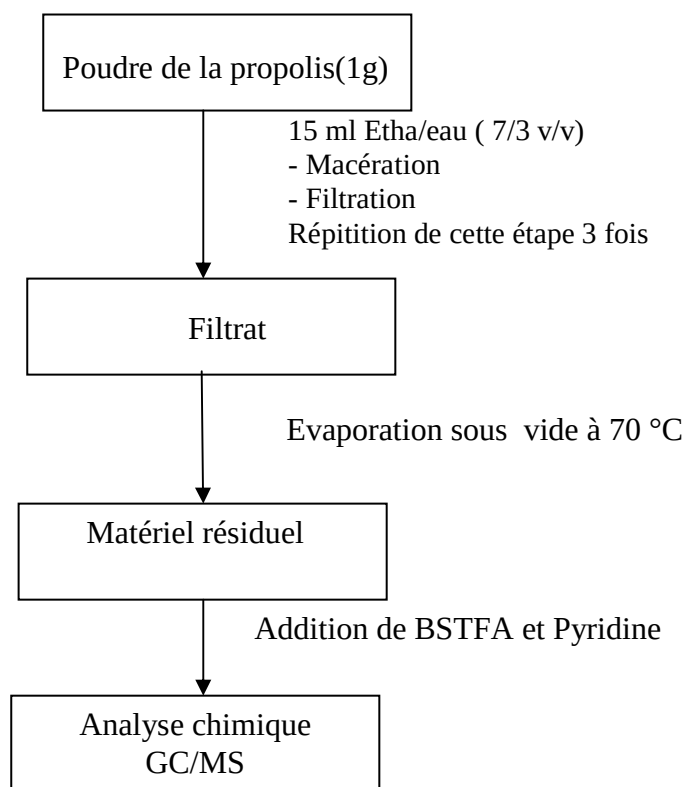


Fig. 41 : Etapes principales de la préparation de l'extrait de la propolis

III-3 Analyse chimique (GC/MS)

La technique gaz chromatographie masse spectrométrie (GC/MS) est considérée la méthode la plus effective dans la séparation, la détection et la caractérisation des composés dans les mélanges organiques complexes, son avantage est d'avoir la capacité de déterminer les structures complètes sans avoir besoin d'autres méthodes physicochimiques.

Environ 5 mg de résidu de chaque échantillon est préparé pour l'utiliser dans la chromatographie par GC/MS.

III-3-1 Réactifs :

- 50 µl de Bis-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (BSTFA) est utilisé comme un réactif de silylation dans le but de stabiliser les molécules à hautes températures
- 75 µl de la Pyridine

III-3-2 Description de l'appareil :

Environ 5 mg de résidu de chaque échantillon a été préparé pour l'utiliser dans la chromatographie par dérivation. Pour cela on le fait dissoudre dans 75µl de la pyridine plus 50 µl de BSTFA, chauffé jusqu'à 80°C pendant 20 minutes

L'analyse a été réalisée avec un appareil de chromatographie gazeuse HP gaz chromatographe 5890 série II, couplé à un spectromètre de masse HP 5972. Une colonne ID SPB.1 (30m x 0.25 mm) et un film d'une épaisseur de 25µm), employée pour les analyses des échantillons préparés.

Les injections ont été effectuées avec l'Hélium comme gaz porteur ; la vitesse est de 35cm /min , la température est programmée entre 100 et 300°C, le programme de température a été appliqué à l'ordre de 5 °C/min , la température de l'injecteur était de 300°C .

Identification des produits :

L'identification a été accomplie, en utilisant des banques des données informatisées, en incorporant des spectres de masses, la majorité des composés ont été identifiés par comparaison avec les pics standards (temps de rétention (R_t), et masse spectrale (MS)).

Dans quelque cas, quand les spectres identiques sont confondus, le type structurel des composés correspondants été proposé sur les bases spectrales de leurs fragmentations en masse.

On donne les fragments obtenus des quatre composés, avec leurs pourcentages après l'interprétation des spectres de masse :

La Sakuranatin

$m/z=430$ (5%) $[M]^+$, $m/z= 415$ (15%) $[M-CH_3]^+$, $m/z= 369$ (3 %) $[M-H-4CH_3]^+$, $m/z=311$ (100%) $[M-2CH_3-OSi(CH_3)_3]^+$, $m/z=238$ (27%) $[RDA (1)]^+$, $m/z=223$ (5%) $[RDA (1) -CH_3]^+$, $m/z=210$ (3%) $[RDA (1)-CO]^+$, $m/z=192$ (99%) $[RDA (2)]^+$, $m/z=177$ (14%) $[RDA (2)-CH_3]^+$, $m/z=73$ (36 %) $[SiCH_3]^+$

Quercetin Méthyl ether

$m/z=589$ (100 %) $[M-CH_3]^+$, $m/z= 575$ (13%) $[M-2CH_3]^+$, $m/z= 559$ (16%) $[M-3CH_3]^+$, $m/z= 531$ (19 %) $[M-3(CH_3)-CO]^+$ $m/z= 517$ (15%) $[M-OSi(CH_3)]^+$, $m/z=247$ (13%) $[RDA (2)-Si(CH_3)_3-2CH_3]^+$, $m/z=207$ (15%) $[(1)-OCH_3]^+$, $m/z=189$ (6%) $[RDA (2)-2OSi(CH_3)_3]^+$, $m/z= 147$ (6%) $[(2)-3Si(CH_3)_3]^+$, $m/z =73$ (45%) $[SiCH_3]^+$.

Pentenyl p-coumarate :

La fragmentation de $[M^{\bullet+}]$ ramène aux résultats suivants :

$m/z = 304$ (23%) $[M-H]^+$, $m/z = 289$ (13%) $[M-H-CH_3]^+$, $m/z = 236$ (100 %) $[M-C_5H_9]^+$
 $m/z = 219$ (85%) $[M-C_5H_9O]^+$, $m/z = 192$ (10%) $[M-C_5H_9COO]^+$, $m/z = 73$ (27%)
 $[SiCH_3]^+$

p-méthoxy cinnamic acid:

La fragmentation de $[M]^{\bullet+}$ ramène aux résultats suivants :

$m/z = 250$ (43%) $[M]^+$, $m/z = 235$ (72%) $[M-CH_3]^+$, $m/z = 217$ (59 %) $[M-H-OCH_3]^+$,
 $m/z = 204$ (13%) $[M-H-3CH_3]^+$, $m/z = 191$ (56%) $[M-Si(CH_3)_3]$, $m/z = 147$ (15%) $[M-CH_2-Si(CH_3)_3]^+$,
 $m/z = 133$ (22%) $[M-COOSi(CH_3)_3]^+$, $m/z = 121$ (13%) $[M-CH_2-COOSi(CH_3)_3]^+$, $m/z = 73$ (44%) $[SiCH_3]^+$

III-4 Activité antioxydante :

L'effet antioxydant des extraits de la *propolis*, récoltée au niveau des différentes régions, est évalué par mesure de la chimiluminescence de luminol, induite chez les neutrophiles humains, en utilisant Luminometre Microlumat LB 96V (EG1 and G.Berthold Wildbad, Germany).

4×10^5 de neutrophiles/puits sont incubés en présence d'une gamme de concentration de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ des extraits de la *propolis* avec Luminol (10^{-5} M) dans le tampon de Hanks pour 1,30 min à 37°C avant l'injection de 50 μl de fMLP (1 μM) ou de PMA (100 nM).

Il est à noter que l'activation des neutrophiles par fMLP, exige la présence de la Cytochalasin B (10 μM). Les résultats sont comparés au contrôle sans extrait de la *propolis*, qui représente 100% de la luminescence. La spécificité de l'oxydation de luminol est vérifiée par la superoxyde dismutase (100 U/ml).

III-4-1 Préparation des échantillons de propolis :

Des solutions de *propolis* à 20% d'éthanol ont été préparées.

Pour tester l'activité antioxydante, on prépare des solutions de 1; 2,5; 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ dans le but de déterminer la concentration correspondante à 50% d'inhibition.

III-4-2 Isolation des neutrophiles :

Les PMNs humains sont isolés à partir de 10 ml de sang , contenant l'héparinate de lithium à une concentration finale de 5 U/ml de sang, prélevé d'un donneur sain non fumeur. Tout d'abord le sang est mélangé avec le dextrane 10% pour accélérer la sédimentation des globules rouges. Après une durée d'une heure, 2 ml de plasma sont récupérés dans un tube en polypropylène. Ensuite, 2ml d'Histopaque® (R-1077) sont ajoutés au fond du tube. Après une centrifugation à 1000 tours/min pendant 25 min, les cellules se séparent selon leurs densités, les globules rouges (GRs) et les PMNs ont été récupérés après leur sédimentation. Une hémolyse est réalisée pendant exactement une minute , par l'addition d'eau distillée fraîche, puis 5 ml de l'HBSS₁ sont ajoutés, suivie d'une centrifugation à 1000 tours/min pendant 10 min. Cette dernière étape est répétée trois fois. Enfin, le culot est récupéré dans 2 ml de l'HBSS₁ et gardé dans la glace jusqu'à son utilisation qui ne doit pas dépasser deux heures.

III-4-2-1 Comptage des PMNs

Le comptage des PMNs isolés est réalisé à l'aide d'une pipette « Potain », elle est graduée de 0 à 11. La suspension cellulaire est aspirée jusqu'à la graduation 1 ensuite, diluée par l'absorption de la solution Turk jusqu'à la graduation 11. Puis, la pipette Potain est appliquée contre une lamelle montée sur la cellule Malassez, qui va se remplir par capillarité. Enfin, le nombre des cellules est compté dans 100 carreaux. Le nombre réel de PMNs/ ml est estimé par la formule suivante :

$$N = n. 10. 1000$$

N : nombre total de PMNs par 1 ml de la suspension cellulaire.

n : nombre des PMNs comptés dans 100 carreaux.

10 : coefficient de dilution.

1000 : pour obtenir le nombre de PMNs/ml de la suspension cellulaire.

III-4-2-2 Viabilité des PMNs

La solution du bleu trypan est utilisée pour estimer la viabilité des PMNs humains isolés. C'est un colorant qui ne pénètre qu'à l'intérieure des cellules mortes, qui apparaissent sous microscope avec une coloration bleue et un aspect rond gonflé. En bref, 300 μ l de la suspension cellulaire sont incubés en présence d'une solution de l'extrait de la propolis à 20 μ g/ml pendant 10 minutes avec 300 μ l du bleu trypan. Les cellules mortes sont ensuite, comptées à l'aide d'une cellule de Malassez. La viabilité est estimée par le pourcentage des cellules vivantes par rapport au nombre total des cellules.

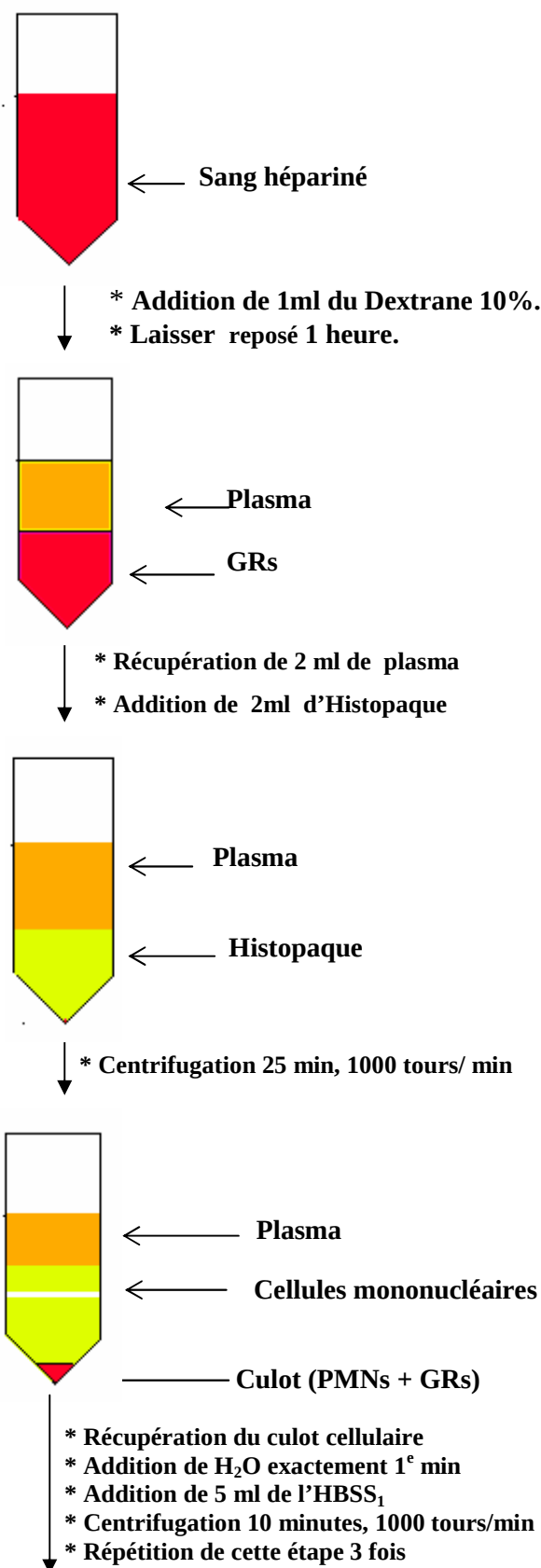
III-4-3 Solutions et réactifs utilisés :

1- La solution stock du luminol (5 mM) est préparée dans le tampon phosphate de sodium (10mM) contenant 0,14mM de NaCl. Le PH du mélange est ajusté à 12 avec de NaOH (1N) par agitation pendant plus de 15 min, jusqu'à la dissolution complète du luminol. Puis le PH est amené à 7,4 avec de HCl (1N). La solution de luminol est conservée à 4°C dans un flacon fumé pendant plus de 6 mois.

2- La solution stock de f-MLP (10^{-2} M), préparée dans Diméthylsulfoxyde (DMSO), est répartie en aliquots de 100 μ l et gardée à -25°C.

3-La solution stock de PMA (10^{-1} M) préparée dans le DMSO est répartie en aliquots et conservée -25°C.

4- La solution stock de cytochalasine B (10^{-2} M) préparée dans DMSO et conservée à -25°C.



Récupération des PMNs dans 2 ml de HBSS₁

Fig 42 : Etapes principales d'isolement des neutrophiles humains.

Conclusion générale

Notre étude confirme et argumente les résultats obtenus dans la plus part des investigations sur la propolis des différentes régions du monde, concernant sa composition chimique (acides et esters phénoliques, flavonoides) ou son activité biologique.

Notre étude a montré que la propolis algérienne a une composition chimique très variée, ce qui est en relation directe avec la diversité florale du pays, ceci sera comme une perspective pour faire un balayage sur tout le territoire algérien.

Le facteur temps de récolte n'est pas pris en considération dans notre étude car les quatre échantillons ont été récoltés dans la même période (automne).

L'absence des coumarines (et quelques autres polyphénols comme les anthocyanidines et les tannins) dans la propolis algérienne est attendus comme la démontré les études précédentes. Aussi la grande quantité des terpènes et leur variété affirment l'étude déjà faite par le professeur H. SAADI, leur origine et la détermination de leurs activités biologiques fera l'objet des recherches à l'avenir.

L'activité antioxydante de la *propolis* été très considérable, ce qui favorise son utilisation dans la médecine comme un anti-inflammatoire et antioxydant naturel très fort, disponible et sans aucun effet secondaire, d'ailleurs l'utilisation des deux mode de stimulation des neutrophiles humains (PMA et fMLP), montre que la propolis a un effet prépondérant, dans les différentes étapes de processus inflammatoire et au niveau du signal intracellulaire.

Nous pouvons espérer comme perspective le teste des composés de la propolis algérienne chacun d'eux seul après leur isolation, afin de connaître les éléments les plus actifs

Communication

Une partie des résultats de ce travail a été présentée sous forme de poster dans le premier congrès national de chimie, à l'université de M'sila (2004)

N. MOUDIR, H. DJELILI, L. SELLOUM, H. SAADI. Etude de l'effet antioxydant des extraits de propolis par chimiluminescence induite chez les neutrophiles activés. *1^{er} congrès national de chimie*, M'sila, Mai 9-10, 2004

Liste des abréviations

ANS	Anthocyanidin Synthase	GRs	Globules Rouges
APEDP	Aqueous Phase of Etheric Defatted <i>Propolis</i>	HBSS1	Hank's Balanced Salt Solution
BSTFA	Bis-(trimethyl-silyl)trifluoroacetamide	HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
CCM	Chromatographie sur Couche Mince	IC50	Concentration à 50 % d'Inhibition
CHI	la Chalcone Isomérase	IFS	IsoFlavone Synthase
CHKR	la Chalcone Ketide Réductase	IR	InfraRouge
CHS	la Chalcone Synthase	LAR	LeucoAnthocyanidin Reductase
CL	la Chimiluminescence du Luminol	MBC	Concentration Minimale Bactéricide
CPG	Chromatographie Phase Gazeuse	MIC	Concentration Minimale Inhibitrice
DFR	DihydroFlavonol4-Réductase	Ms	M'sila
DMSO	DiMéthylSulfOxyde	MS	Spectrométrie de Masse
EECP	Ethanolique Extract of Crude <i>Propolis</i>	MS-EI	Spectrométrie de Masse à Impact électronique
EEDP	Ethanollic Extract of Defatted <i>Propolis</i>	NVFEDP	Non Volatile Fraction of Etheric Defatted <i>Propolis</i>
EEP	Extrait éthanolique de la <i>propolis</i>	ODS	OctaDecylSilane
EI	Impact Electronique	PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
ES	Masse Electrospray	PNNs	PolymorphoNucléaire Neutrophiles
f MLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine	RDA	Retro Diels Alder
FAB	Bombardement Atomique Rapide	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
FGT	Flavonoid 3-O-glucosylTransferase	RMN-C13	Resonance Magnetique Nucleaire Carbone 13
FHT	Flavanone 3-Hydroxylase	RMN-H	Resonance Magnetique Nucleaire proton
FLS	Flavonol Synthase	RP-HPLC	Phase Renversée en Chromatographie Liquide Haute Performance
FNR	Flavanone 4-Reductase	Rt	Temps de Rétention
FNS I	Flavone Synthase I	TI	Tlemcen
FNS II	Flavone Synthase II	TMCS	TriMethylChloroSilane
GC/MS	Chromatographe phase Gazeuse combiné avec un Spectromètre de Masse	To	Tizi-ouzou
GI	Guelma	UV	UltraViolet
		VFEDP	Volatile Fraction of Etheric Defatted <i>Propolis</i>

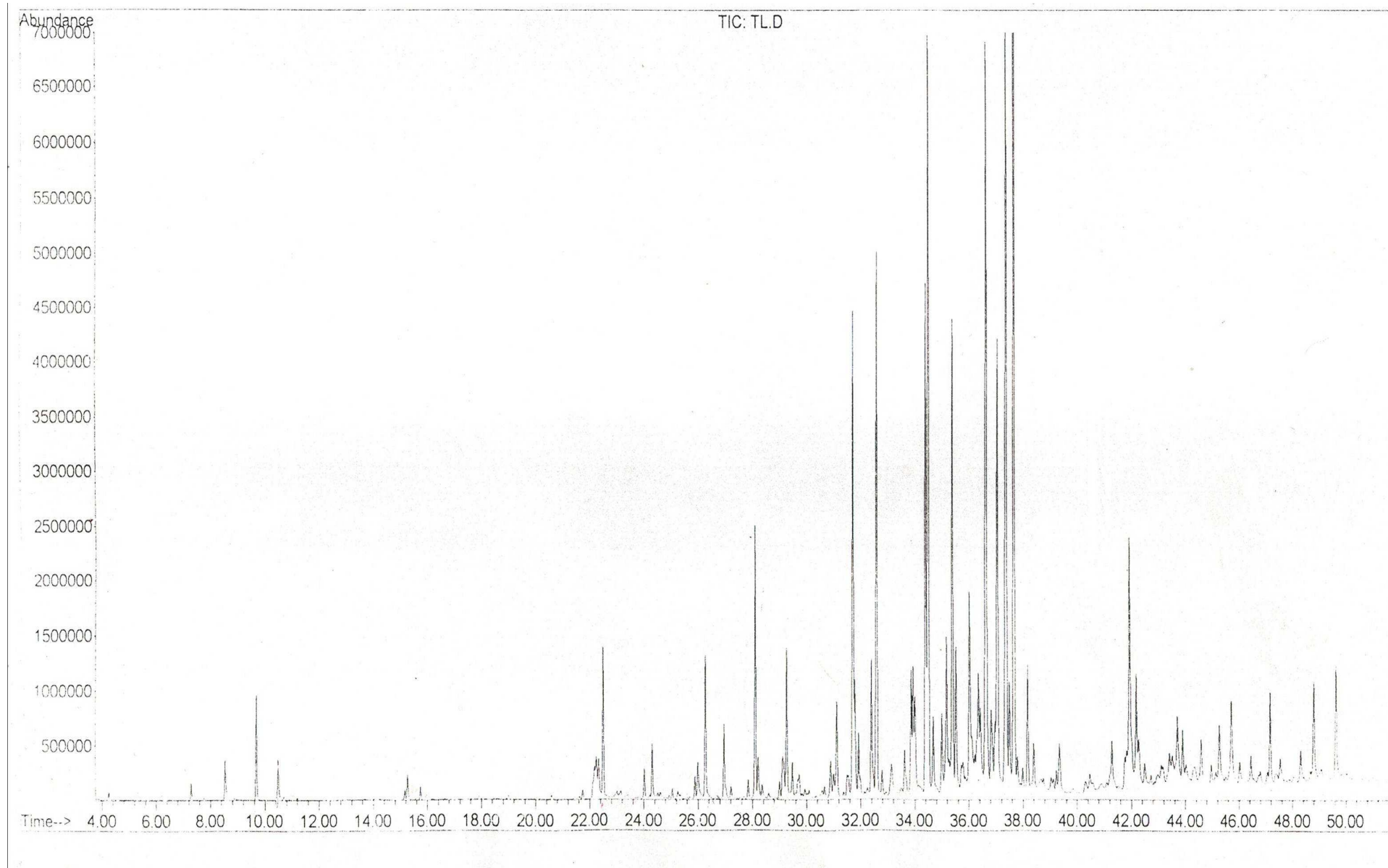


Fig 15 : Chromatogramme de l'échantillon de Tlemcen

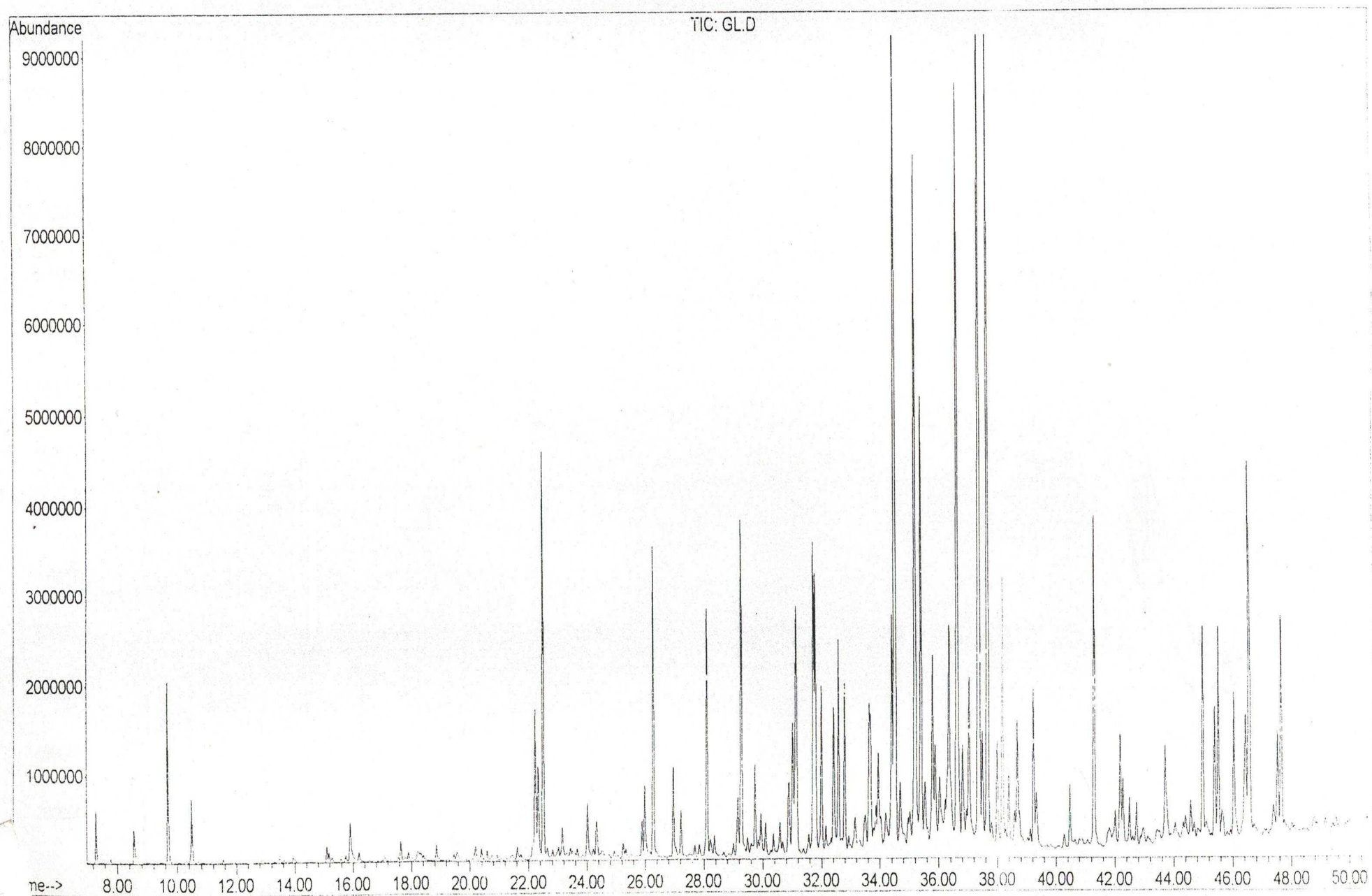


Fig 16: Chromatogramme de l'échantillon de Guelma

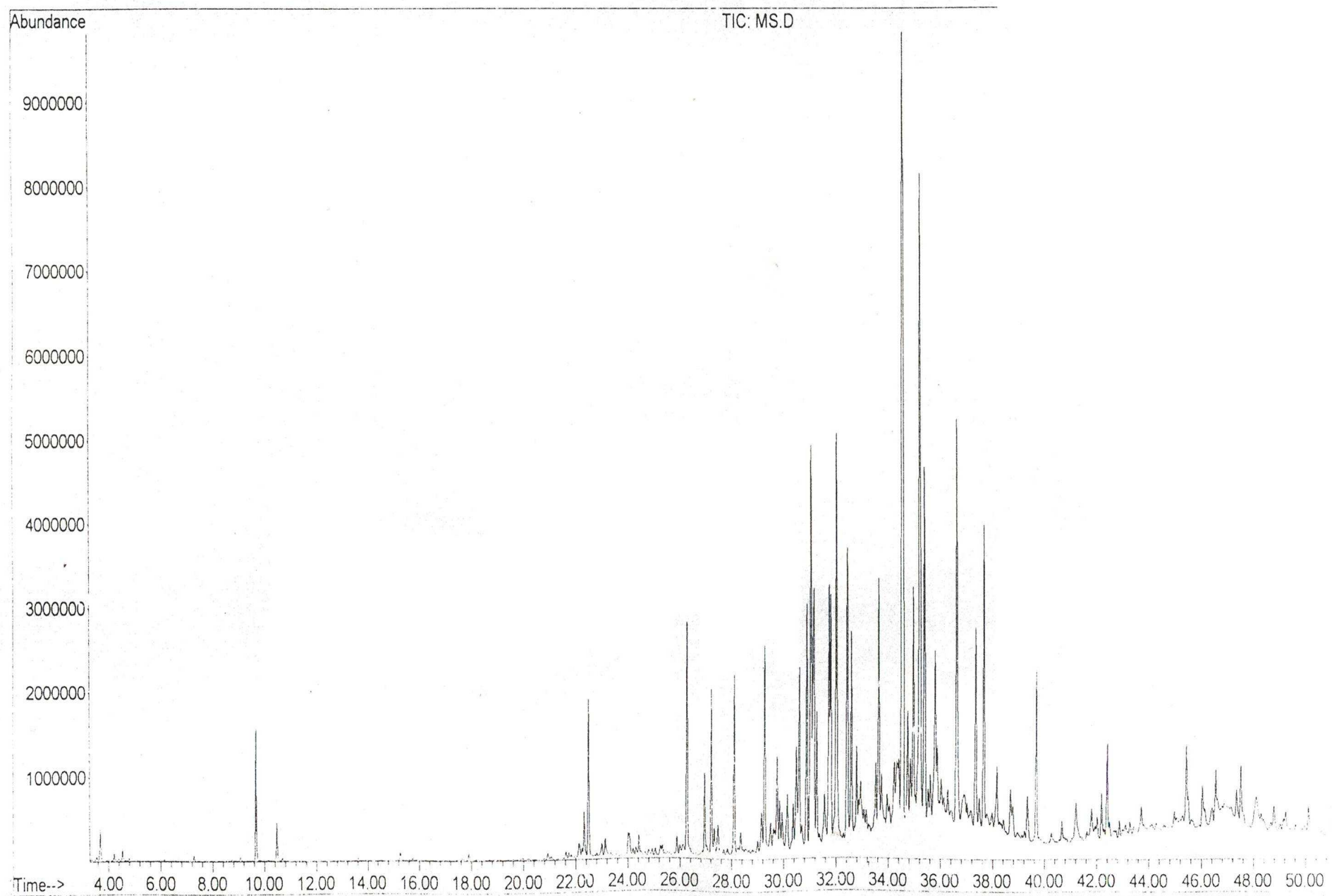


Fig 17: Chromatogramme de l'échantillon de M'sila

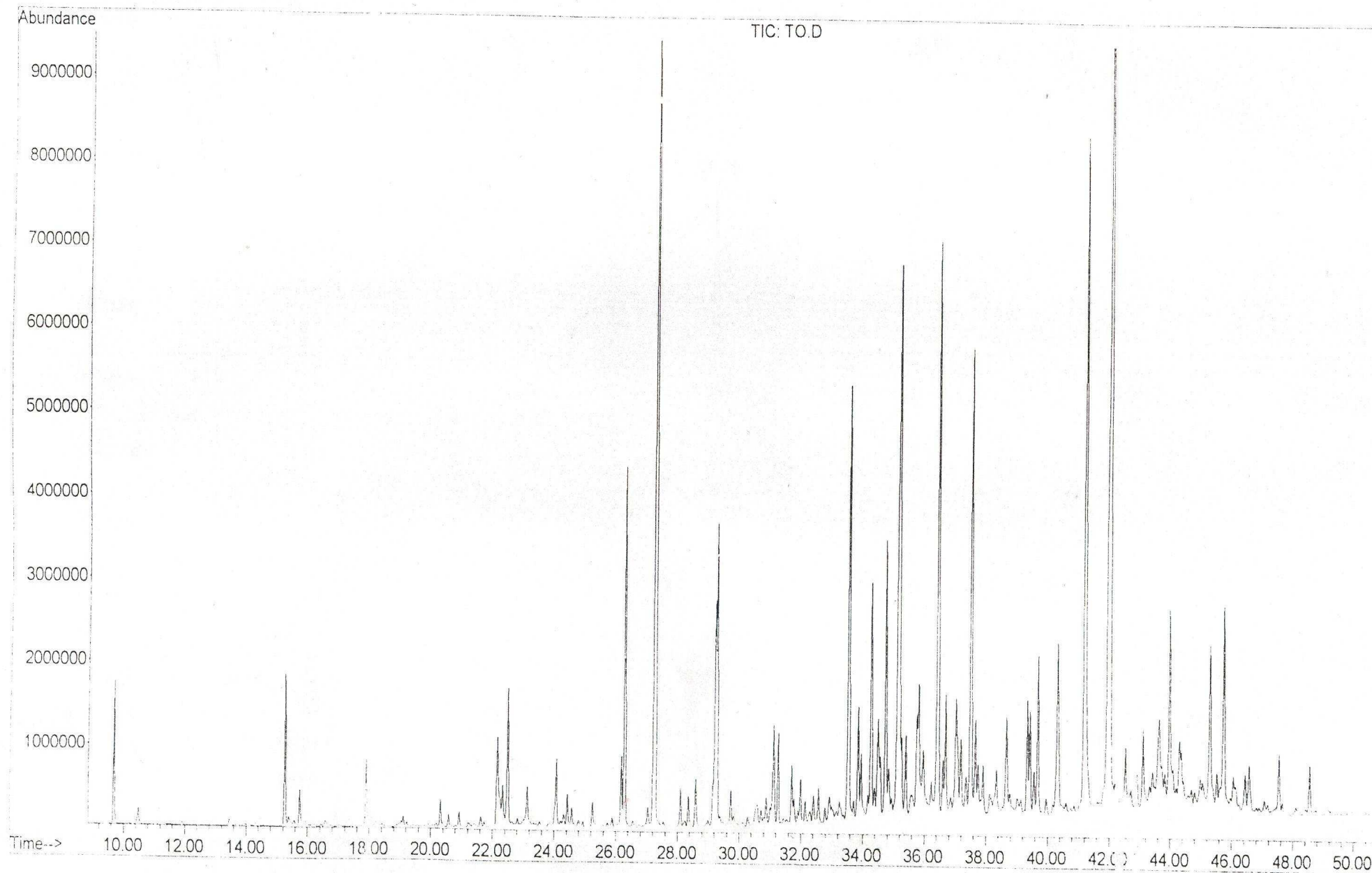
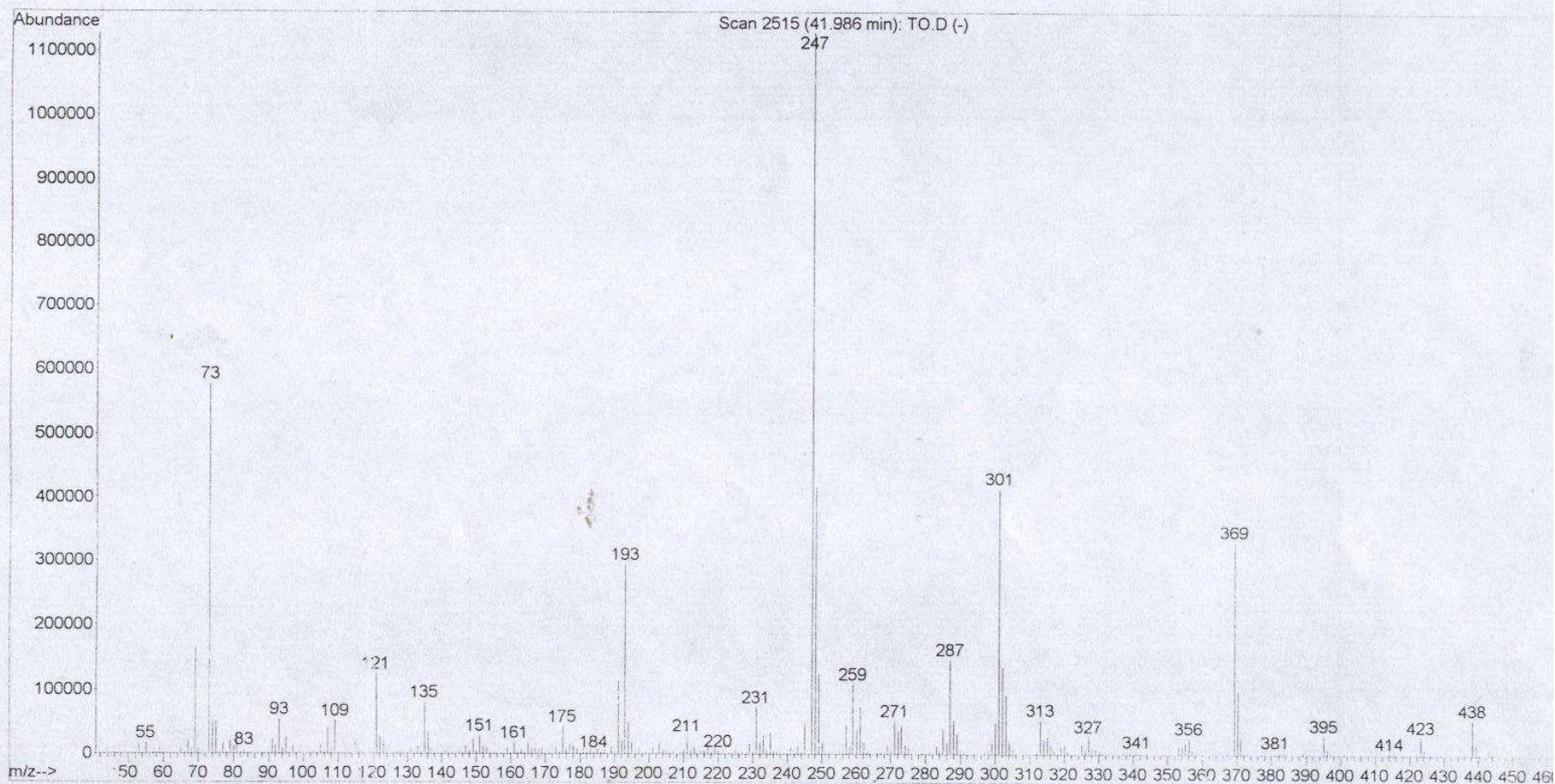
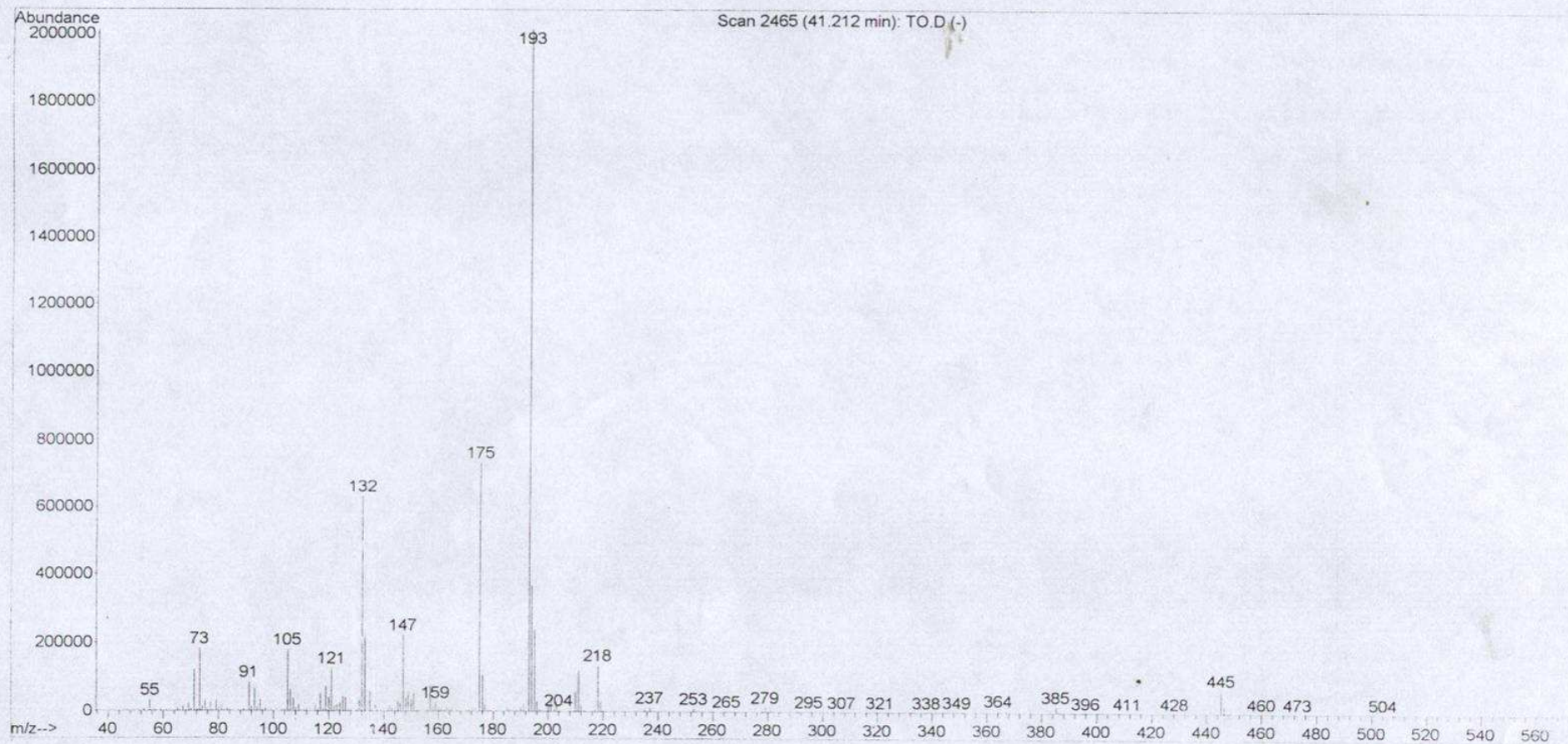


Fig 18 : Chromatogramme de l'échantillon de Tizi-Ouzou

File : C:\HPCHEM\1\DATA\TO.D
Operator : Di
Acquired : 19 Apr 2004 14:46 using AcqMethod BANKOVA
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: TO/ 70eV
Misc Info : V.Bankova
Vial Number: 1



File : C:\HPCHEM\1\DATA\TO.D
Operator : Di
Acquired : 19 Apr 2004 14:46 using AcqMethod BANKOVA
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: TO/ 70eV
Misc Info : V.Bankova
Vial Number: 1



Bibliographie

- [1] F. Alexandare , *Apiculture Aujourd'hui* ,Eds. Rustica, Paris (1984).
- [2] C. Alin, *Le rucher de rapport et les produits de la ruche*, Eds. La renaissance, France (1996).
- [3] M. P. Jean, *Le guide pratique d'apiculture*, Eds. Edisud. France (1999).
- [4] A. Raoul, *La route du miel :le grand livre des abeilles et de l'apiculture*, Eds. Nathan (1992).
- [5] أحمد أبو شاور، موسوعة نحل العسل، دار أسامة للنشر و التوزيع، عمان (2003)
- [6] فائزة صالح عبد اللاه :منتجات نحل العسل قيمتها الغذائية والعلاجية ،المؤسسة العامة لمطابع الكتاب المدرسي، عدن(2000)
- [7] أحمد لطفي عبد السلام، *عسل النحل ومنتجاته* ، المكتبة الاكاديمية ، القاهرة (2000)
- [8] عبد الحميد عبد السلام أرحيم، *عسل النحل فوائد واستخدامات*، منشأة المعارف، الاسكندرية (2000)
- [9] محمد علي البني، *نحل العسل ومنتجاته*، الطبعة الرابعة، دار المعارف، القاهرة (1984)
- [10] محمد عباس عبد الطيف ، *عالم النحل* ، جامعة الاسكندرية (1994)
- [11] Y. Donadieux, *Les thérapeutiques naturelles : la propolis*, Eds. Technique et documentation Lavoisier, Paris (1981).
- [12] N.L. Marekov, V.S. Bankova, S.S. Popov, *Impact of science on society*; **136**, 369-373 (1984).
- [13] V .Bankova, G. Christov, G. Stoev, S.S .Popov, *J .Chromatography* ;**607**, 150-153 (1992).
- [14] V. Bankova, G. Christov, G. Stoev, S.S. Popov; *J. Chromatography*; **623**, 182-185(1992).
- [15] L. Zhou, J. Guo, J.Yu, *J. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*; **24 (3)**, 162-164 (1999).
- [16] V. Bankova, A. Dyulgerov, S .Popov ,L. Evstatieva, L. Kuleva,O. Pureb, Z . Zamjansan, *J. Apidologie*; **23**, 79-85 (1992).
- [17] N. Giuseqepina, M.C. Marcucci, S. Antonio, M.L.F. Salatino, *J. Braz.Chem. .Soc.*; **11(5)** , 453-457(2000).
- [18] M.C .Marcucci, F. Ferreres, A.R.Custodio, M.M.C. Ferreira, V.S.Bankova, C. Garcia-Viguera, W.A. Bretz ,*J. Z. Naturforsch.*; **55c**, 76-81 (2000) .
- [19] M.Velikova, V.Bankova, M.C.Marcucci, I. Tsvetkova, A.Z.Kujumgiev, *J. Z. Naturforsch.*; **55c**, 785-789 (2000).
- [20] V. Bankova, M. Popova, S. Bogdanov, A.G. Sabatini, *J. Z.Naturforsch.*; **57c**, 530-533 (2002).
- [21] V. Bankova, *the 37^{eme} Apimondia Congress*, South Africa (2002).
- [22] M. Velikova,V. Bankova, K. Sorkun, H. Saadi, I. Tsvetkova, A. Kujumgiev; *J. Z. Naturforsch.*; (**55c**) , 790-793 (2000).
- [23] K.Shigenori, H.Katsumi, K. Katsuko, I.Takeshi, H.Tomoko, N.Tsutomu, *J. Agric.Food Chem.*; **50(17)**, 4777-4782 (2002)
- [24] K.Murat ,K. Serdar , K. Semra, *J.Z. Naturforsch.*; **57 (c)** , 905-909 (2002) .

- [25] C.C.Chang, M.H.Yang, H.M.Wen, J.C .Chern, *J. Food and Drug Analysis*; **10(3)**, 178-182 (2002).
- [26] N. Takema, H.B.Arjun , T. Yasuhiro, M. Kiyoshi, M. Katsumichi , K. Shingetoshi , *J. Biol. Pharm. Bull.*; **26(4)** , 487-491 (2003).
- [27] N. Yanishlieva, E. Marinova, *C.R.Acad.Bulg.Sci.*; 71,31 (1986)
- [28]W. Krol, S. Scheller, Z. Czuba, T. Matsuno, G. Zydowicz, J. Shani, M. Mos, *J. Ethnopharmacology* ; **55 (1)**,19-25 (1996).
- [29] I.N.M. Maria, I .I. Maria, R.S.Antonio, A.V. Marta, *J. Ethnopharmacology*;**71**,109-114 (2000).
- [30] S.S.Yun, P. Eun-Hee, M.H. Gang, S.R. Young, M.K. Yong, J. Changbae, *J. Ethnopharmacology* ; **80**, 155-161(2002).
- [31] S.Ichikawa, K. Satoh, T. Tobe, I. Yasuda, F. Ushio, K. Matsumoto, K. Endo, C. Ookubo , *J. Redox. Rep.*; **7 (5)** , 347-350 (2002) .
- [32] R. Jussi-Pekka, thèse de doctorat, University of Helsinki, (2001).
- [33] J .Bruneton, *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales*, Eds. Technique et documentation Lavoisier, Paris (1999).
- [34] K. Robards, M. Antolovich, *J.Analyst.*; **122**,11–34(1997)
- [35] I. Budic-Leto,T. Lovric, *J. Food Technol. and Biotechnol.*; **40 (3)**, 221–225 (2002) .
- [36] M.C. Marjorie, *Clinical Microbiology Reviews*; **12(4)**, 564-582 (1999).
- [37] Ribereau- Gayon, P. *Les composes phénoliques des végétaux*, Dunod , Paris (1968) .
- [38] M.C.Martini, S.Monique, *Actifs et additifs en cosmétologie*, Eds. Technique et documentation Lavoisier ,Paris (1992).
- [39] R. O’Kennedy, R.D .Thornes, *Coumarins- Biology, Applications and Mode of Action*, Eds. John Wiley et Sons Ltd, Chichester(1997) .
- [40] J. R. S. Hoult, M. Paya , *J. Gen. Pharmacol.* ; **27**, 713-722 (1996).
- [41] O .Tiina , Thèse de doctorat,University of Helsinki, (2001).
- [42] J.E. Poulton, D.E. Mcree, E.E. Conn, *J. Plant Physiol.*; **65**, 171-175 (1980).
- [43] K.Rajnarayana, M. Sripalreddy, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna , *J. Indian of Pharmacology*; **(33)**, 2-16(2001) .
- [44] F.Gert, S. Martens, *J. Current Opinion in Biotechnology* ; **12** ,155-160 (2001)
- [45] G. Gorkmann, B. Dangelmayr, *J. Biochem. Genet.*; **18** , 519(1980)
- [46] M.Jay , *J. Z. Naturforsch.*; **38c** , 413 (1983) .
- [47] A. Sutter , *J. arch. Biochem. Biophys.*; **170**, 847 (1975).
- [48] J.Chopin, *Actualité de phytochimie fondamentale*, Eds . Masson, 119 (1966) .
- [49] D.R Browning , *chromatographie* , Eds . Masson (1971) .

- [50] R.A Anderson , J.A Sowers , *J. phytochemistry* ; **7**, 293-301 (1968) .
- [51] S. Hakkinen, Thèse de doctorat, université de Kuopio (2000)
- [52] N.D. Martini , Thèse de doctorat, université de Pretoria (2001).
- [53] T.J. Mabry, K.R Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoides*, Eds.,Springer- verlag , New york (1970) .
- [54] K.R Markham , *Technic of flavonoides identification* ,Eds .Academic press ,London (1982) .
- [55] J.B. Harbone, *phytochemical methods*, Eds . Chapman and Hall (1973)
- [56] I. Grosu, S. Mager, M, Darabantu , *Résonance Magnétique Nucléaire appliquée à l'analyse des composés organiques* , publication de l'université de Rouen (1999) .
- [57] J.R.E. Middleton, K. Chithan , C.T. Theoharis , *Pharmacol. rev.*; **52(4)**, 673-751(2000).
- [58] B. Halliwell, *J. Free Rad. Res. Comm.*; **9(1)**, 1 -32 (1990) .
- [59] C.A.Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, *J .Free Rad. Res.*; **22(4)** , 375-383 (1995) .
- [60] J.A.Vinson, Y.A.Dabbagh, M.M. Serry, J.Jang, *J. Agric. Food Chem.*; **43(11)**, 2800 - 2802 (1995).
- [61] E.N. Frankel, A.S. Meyer, *J. Sci. Food Agric.*, **80 (13)**, 1925-1941(2000).
- [62] N.Salah, N.J.Miller, G. Paganga, L.Tijburg, G.P. Bolwell, C. Rice-Evans, *J. Arch Biochem. Biophys.* ; **322(2)** , 339-346 (1995) .
- [63] F. Shahidi, P.K.J.P.D. Wanasundara, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*; **32(1)** , 67-103 (1992) .
- [64] B.J.F. Hudson, J.I. Lewis, *J. Food Chem.*; **10(1)** , 47-55 (1983) .
- [65] C.A.Rice-Evans, N.Miller, G. Paganga, *J.Free Radic.Biol. Med.*; **20(7)**, 933-956 (1996).
- [66] V.S. Bankova , S.L De Castro , M.C. Marcucci , *J. Apidologie* ; **31**, 3-15 (2000).
- [67] A.Dragan, D.A.Dusanka, B.Drago, T.Nenad, *J.Croatia Chemica. Acta.*; **76 (1)**, 55-61 (2002)
- [68] P. Cos, L. Ying, M. Calomme, J.P. Hu, K. Cimanga, B.V.Poel, L. Pieters, A.G .Vlietinck, D.V. Berghe, *J. Nat. Prod.*; **61**, 71-76 (1998)