

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



N° Ref :

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila
Institut des Sciences et de la Technologie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

En domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences biologiques

Spécialité: Biochimie appliquée

Thème :

**Etude de l'activité antibactérienne des huiles
essentielles de la propolis de l'Est Algérien**

Préparée par : MERABET Khadidja

Devant le jury composé de:

Présidente : M ^{elle} BOUCHEKRIT MOUFIDA	MCB	Centre Universitaire de Mila
Examineur: M ^r BOUBENDIR Abdelhafid	MCA	Centre Universitaire de Mila
Promoteur : M ^r BOUTELLAA Saber	MCB	Centre Universitaire de Mila

Année Universitaire: 2021/2022

Remerciement

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Les cinq années de maîtrise nous a permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple.

En effet, ce parcours ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donnée la santé et la volonté et la foi d'entamer et de terminer ce mémoire.

J'adresse mes profonds remerciements à tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire de fin d'études et ceux qui nous ont aidé de près ou de loin.

Tout l'honneur et toutes nos reconnaissances vont à mes chers parents pour leurs encouragements leur bienveillance durant tout notre cursus.

*je remercie vont particulièrement à mon promoteur **Boutellaa Saber** et j'exprime ma profonde gratitude pour lui avoir accordé toute sa confiance que je suis qualifié pour cette recherche et que je peux la mener à bien de toutes mes forces, pour son grande disponibilité et son encadrement et ses précieux conseils et son assistance dans le temps qu' il consacré pour réaliser ce que nous avons réalisé.*

Je remercie aussi les membres du jury :

Madame BOUCHEKRIT MOUFIDA nous sommes très honorés que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de nos sincères remerciements et soyez assurée de notre profonde gratitude.

*Mr. **Abdelhafid Boubendir** Merci pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, pour l'intérêt que vous portez à notre travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.*

*Nous remercions également le professeur **Bounamous Azeddine** pour sa contribution et son aide à propos desquelles il m'a ouvert les portes de laboratoire des sciences nature et des matériaux et mon exploitation de ses matériaux.*

Dedicace

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...*

Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce mémoire à:

Mon Père

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur.

Ma mère

Aux personnes qui m'ont énormément aidée et Pour leur soutien morale et leurs sacrifices le long de ma formation.

Ma jumeau

qui m'a toujours aidé dans mes trébuchements, m'a écouté dans ma détresse, m'a soutenu et encouragé tout au long de mon parcours, et a toujours été là pour moi, où nous avons passé notre vie universitaire ensemble, cherchant à chasser son excellence.

Mes très chers Soeurs

Mon seul frère

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال الله تعالى ﴿وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (68) ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69)﴾ سورة النحل (68-69)

« O Prophète, ton Seigneur à inspiré aux abeilles leur mode de vie et leurs moyens de subsistance. Il leur à inspiré de prendre les cavernes des montagnes, les cavités des arbres et les treilles pour demeures (68). –Puis Allah- qu'Il soit exalté-leur a inspiré de se nourrir de tous les fruits des arbres et des plantes ; Il leur a rendu disponibles, à cette fin, des moyens que leur Seigneur leur avait préparés et rendu faciles. De leurs estomacs sort un liquide de différentes couleurs, qui apporte une guérison pour les hommes. Il y a dans cette chose merveilleuse des preuves évidente de l'existence d'un Créateur Tout-Puissant et Sage, pour un peuple qui réfléchit peu en tirer profit et gagner ainsi un bonheur permanent (69) »

(Sourate El Nahl verset 68-69).

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralités sur la propolis et les huiles essentielles

1.	Définition de la propolis.....	5
1.1.	Historique de la propolis.....	5
1.2.	Origine botanique	6
1.3.	Composition de propolis.....	7
1.4.	Récolte de la propolis par l'homme.....	10
1.5.	Propriétés physico-chimiques de la propolis	11
1.6.	Utilisation par l'abeille	12
1.7.	Utilisation de la propolis par l'homme	12
1.7.1.	La médecine.....	12
1.7.2.	La cosmétique.....	12
1.8.	Propriétés biologiques de la propolis.....	12
1.8.1.	Propriétés antibactérienne.....	12
1.8.2.	Propriétés anti-inflammatoires	13
1.8.3.	Activité antivirale	13
1.8.4.	Propriétés antifongique.....	14
1.8.5.	Propriétés anti-oxydante	14
2.	Les huiles essentielles	15
2.1.	Définition des huiles essentielles.....	15
2.2.	Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	15
2.3.	Les composition chimiques des huiles essentielles	15
2.3.1.	Les composition chimiques des huiles essentielles de la propolis	15
2.4.	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	22

Table des matières

2.5.	Méthodes d'extraction des huiles essentielles	22
2.6.	Utilisation des huiles essentielles :	23
2.7.	Les activités biologiques des huiles essentielles :	23
2.7.1.	L'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis	24

Chapitre II : Antibiothérapie et la résistance bactérienne

1.	Antibiothérapie.....	28
1.1.	Définition des Antibiotiques	28
1.2.	Classification des antibiotiques	28
1.2.1.	Classification des antibiotiques selon leur origine	28
1.2.2.	Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne.....	29
1.2.3.	Classification selon la nature chimique	29
1.2.4.	Classification des antibiotiques selon leur spectre d'activité	29
1.2.5.	Classification des antibiotiques selon l'effet	29
1.3.	Mode d'action des antibiotiques	30
2.	Résistance aux antibiotiques	30
2.1.	Définition de la résistance aux antibiotiques	30
2.2.	Les types de résistance.....	31
2.2.1.	Résistance innée	31
2.2.2.	Résistance acquise	31
2.3.	Mécanisme de résistance	32
2.3.1.	Modification enzymatique.....	32
2.3.2.	Modification de perméabilité membranaire	32
2.3.3.	Modification et remplacement de la cible	34
2.3.4.	Pompes à efflux	34

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1.	Matériel	38
1.1.	Matériel technique :	38
1.2.	Matériel végétal :	39
1.3.	Présentation géographique de la zone de prélèvement de la propolis	39

Table des matières

1.4.	Matériel microbiologique.....	40
1.4.1.	Les souches bactériennes étudiées.....	40
1.4.2.	Antibiotiques	41
1.4.3.	Les milieux de culture	42
2.	Méthode.....	42
2.1.	Broyage de propolis	42
2.2.	Extraction des huiles essentielles.....	43
2.3.	Extraction par solvants (CHCL ₃ , hexane).....	43
2.4.	Détermination des rendements d'extraction	45
2.5.	Dosage des polyphénols totaux.....	46
2.6.	Dosage des flavonoïdes totaux des extraits (CHCL ₃ , Hex)	46
2.7.	Etude qualitative par CCM des extraits CHCL ₃ et Hex	47
2.7.1.	Principe de CCM	47
2.7.2.	Le choix de la phase mobile	47
2.7.3.	Préparation de concentration de l'extrait.....	47
2.7.4.	Révélation.....	48
2.8.	Etude de l'activité antibactérienne.....	48
2.8.1.	Préparation des milieux de culture	48
2.9.	Préparation d'eau physiologique	49
2.10.	Préparation des disques d'aromatogramme	50
2.11.	Stérilisation du matériel	50
2.12.	Préparation des concentrations des extraits et des huiles essentielles (20mg/ml ,100mg/ml, 10mg/ml)	50
2.13.	Teste d'antibiogramme et aromatogramme	51
2.13.1.	Préparation des boîtes de pétri (coulage).....	51
2.13.2.	Repiquage des souches bactériennes	52
2.13.3.	Préparation des suspensions bactériennes	53
2.13.4.	Écouvillonnage (ensemencement bactérienne)	53
2.13.5.	Dépôt des disques et injection des extraits et d'huile essentielle	54
2.13.6.	Incubation et lecture des résultats.....	54

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction	57
2. Teneurs en Polyphénols totaux	59
3. Teneurs en flavonoïdes.....	60
4. Etude qualitative par CCM des extraits CHCl ₃ et Hex.....	63
5. Etude de l'activité antibactérienne	66
5.1. Les huiles essentielles	66
5.2. Extraits CHCl ₃ et n-hexane.....	69
5.3. Association HE/ATB	75
5.4. Association extrait/ATB	76
Conclusion.....	87
Références bibliographiques.....	88
Annexes	99

Résumé

Le but de cette étude est l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et extraits de propolis de deux différentes régions de l'Est Algérien, et la détermination de leur effet synergétique avec les antibiotiques. L'analyse quantitative des extraits *n*-hex et CHCL₃ présente des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes, qui sont confirmés qualitativement par la technique de CCM de l'extrait CHCL₃, qui a révélé la détection des flavonoïdes, acides phénoliques et composés terpeniques. L'activité antibactérienne mesuré par la méthode de diffusion sur gélose, montre que HE1(Guelma), HE2 (Mila) et les extraits *n*-Hex et CHCl₃ ont exercés un effet antibactérien important contre *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738 à la concentration 10mg/ml. La combinaison de chaque HE1, extrait CHCL₃, avec les antibiotiques d'AMP₁₀, CZ₃₀, GEN₁₀ est améliorée l'effet antibactérien qui a exercé sur ces derniers souches, par contre la combinaison de chaque HE2, extrait de *n*-Hex avec les mêmes antibiotiques n'augmentent pas son effet cote les mêmes souches étudiées à l'exception de *Bacillus cereus* ATCC10876. Les huiles essentielles et les extraits de propolis sont des produits naturels, qui peuvent réduire l'apparition de la résistance bactérienne aux antibiotiques et leurs effets indésirables associés.

Mots clés: Propolis, huiles essentielles, polyphénols, antibiotiques, activité antibactérienne, synergie.

Abstract :

The purpose of this study is to evaluate the antibacterial activity of essential oils and propolis extracts from two different regions of eastern Algeria, and to determine their synergistic effect with antibiotics. The quantitative analysis of the n-hex and CHCL₃ extracts presents polyphenol and flavonoid contents, which are qualitatively confirmed by the CCM technique of the CHCL₃ extract, which revealed the detection of flavonoids, phenolic acids and terpenic compounds.

The antibacterial activity measured by the agar diffusion method, shows that HE1(Guelma), HE2 (Mila) and the extracts n-Hex and CHCl₃ exerted an important antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738 at the concentration 10mg/ml. The combination of each HE1, extract CHCL₃, with the antibiotics of AMP10, CZ30, GEN10 is enhanced the antibacterial effect that exerted on these last strains, on the other hand the combination of each HE2, extract of n-Hex with the same antibiotics do not increase its effect cutter the same strains studied with the exception of *Bacillus cereus* ATCC10876. Essential oils and propolis extracts are natural products, which can reduce the onset of bacterial resistance to antibiotics and their associated adverse effects.

Keywords: Propolis, essential oils, polyphenols, antibiotics, antibacterial activity, synergy

الملخص:

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية ومستخلصات البروبوليس من منطقتين مختلفتين في شرق الجزائر، وتحديد تأثيرها التآزري مع المضادات الحيوية. التحليل الكمي لمستخلصات n-hex و CHCL3 يقدم محتويات البوليفينول والفلافونويد، والتي يتم تأكيدها نوعيا من خلال تقنية CCM لاستخراج CHCL3، والتي كشفت عن اكتشاف الفلافونويدات والأحماض الفينولية والمركبات التربينية.

النشاط المضاد للبكتيريا التي تقاس طريقة نشر أجار، وبيبين أن HE1 (Guelma)، HE2 (ميلا) ومستخلصات ن هيكس وCHCL3 تمارس تأثير مضاد للبكتيريا الهامة ضد البراز المكورات المعوية C110414، عصيات cereus ATCC10876، Escherichia coli ATCC9738 في تركيز 10mg/ml. مزيج من كل HE1، استخراج CHCL3، مع المضادات الحيوية من AMP10، CZ30، GEN10 هو تعزيز تأثير مضاد للبكتيريا التي تمارس على هذه السلالات الأخيرة، من ناحية أخرى مزيج من كل HE2، استخراج ن هيكس مع نفس المضادات الحيوية لا تزيد من تأثيرها القاطع نفس السلالات درس باستثناء عصيات cereus ATCC10876. الزيوت الأساسية ومستخلصات البروبوليس هي منتجات طبيعية، والتي يمكن أن تقلل من ظهور المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية وأثارها الضارة المرتبطة بها.

الكلمات الرئيسية: بروبوليس، الزيوت الأساسية، البوليفينول، المضادات الحيوية، النشاط المضاد للبكتيريا، التآزر.

Liste des abréviations

HE : Huile essentielle

CHCL₃ : Chloroforme.

n-Hex : n-Hexane.

ATB : Antibiotique.

AMP₁₀ : Ampicilline.

CZ₃₀ : Céphazoline.

IPM₁₀ : Imipinèm.

AK₁₀ : Amikacine.

GEN₁₀ : Gentamicine.

C₃₀ : Cloramfinécol.

CMI : Concentration minimal inhibitrice.

ZI : Zone d'inhibition.

DI : Diamètre d'inhibition.

BRM : Bactérie multi résistance.

SARM : Staphylococcus résistance à la métiline.

LSNM : Laboratoire des sciences naturelles et des matériaux.

LSNV : Laboratoire des sciences de la nature et de vie.

ATCC : American Type de Culture Collection.

GN : Gélose nutritif.

BN : Bouillon nutritif.

MH : Mueller Hinton.

MOH : Méthanol.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DCM : Dichlorométhane.

CCM : Cromatographie sur Couche Mince.

GCMS : Cromatographie en phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Liste des figures:

Figure N° 1: Différentes couleurs de la propolis.....	5
Figure N° 2: Quelques sources de la propolis.	7
Figure N° 3: Proportions des compositions de la propolis.....	7
Figure N° 4: Récolte de la propolis par grattage	10
Figure N° 5: Récolte de la propolis par l'utilisation des grilles	11
Figure N° 6: Paroi bactérienne	33
Figure N° 7: Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques.....	35
Figure N° 8: Echantillon de propolis.....	39
Figure N° 9: Situation géographique de Terrai Beinen (El Gharbia et Semta), la Wilaya de Mila (Google earth)	40
Figure N° 10: Situation géographique de la Wilaya de Guelma (Google earth).....	40
Figure N° 11: Broyage de propolis.....	42
Figure N° 12: Montage de l'hydrodistillation	43
Figure N° 13: Huile essentielle extraite de.....	43
Figure N° 14: Pesage de propolis	44
Figure N° 15: Mélange des extraits de propolis	44
Figure N° 16: Macération des extraits.....	44
Figure N° 17: Filtration des extraits	45
Figure N° 18: Evaporation des extraits	45
Figure N° 19: Grattage des extraits	45
Figure N° 20: Conservation des extraits.....	45
Figure N° 21: Préparation de milieu GN.....	48
Figure N° 22: Préparation de milieu MH	49
Figure N° 23: Préparation de l'eau physiologique.	49
Figure N° 24: La préparation des concentrations des CHCL ₃ , Hex, HE.....	51
Figure N° 25: coulage des milieux de culture	52
Figure N° 26: Séchage des milieux de Culture	51
Figure N° 27: Repiquage des souches bactériennes dans GN et BN	52
Figure N° 28: quelques souches bactériennes jeunes	52
Figure N° 29: Préparation de suspension bactérienne.....	53
Figure N° 30: Dépôt des disques vierge	54
Figure N° 31: Injection des extraits, HE	54

Figure N° 32: mesure le diamètre d'inhibition par le pied à coulisse	55
Figure N° 33: représentation graphique des rendements des HE et des extraits de la propolis.....	57
Figure N° 34: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	59
Figure N° 35: Courbe d'étalonnage de la quercetine	61
Figure N° 36: (A) : révélation des composés de l'extarit CHCL3 sous la lumière UV 365nm ; (B) : révélation des composés de l'extarit CHCL3 sous la lumière UV 254nm...	65
Figure N° 37: Histogramme des les diamètres d'inhibition des deux concentrations d'HE1 et des antibiotiques.	67
Figure N° 38: Histogramme des diamètres d'inhibition de chaque HE1, HE2 à une concentration de 10mg/ml.	68
Figure N° 39: Histogrammes de l'effet antibactérien de CHCL3 et n-hexne à une concentration de 100 mg/ml	70
Figure N° 40: Histogrammes de l'effet antibactérien de CHCL3 et n-hexne à une concentration de 10 mg/ml	71
Figure N° 41: les Histogrammes des les diamètres d'inhibition des deux concentrations de CHCL3 et des antibiotiques.....	72
Figure N° 42: les Histogrammes des les diamètres d'inhibition des deux concentrations de n-hexane et des antibiotiques.....	74
Figure N° 43: Histogrammes des diamètres d'inhibition de l'association HE/ATB	75
Figure N° 44: Diagrammes représentent les diamètres d'inhibition de CHCL3 (10mg/ml), n-hexane (10mg/ml), les ATB et de l'association ATB-CHCL, ATB-Hex (synergie) exprimés en mm.	77
Figure N° 45: Zones d'inhibition des quelque souches bactériennes testés par HE1 (20mg/ml), les extraits de CHCL3 et n-hexane (100mg/ml).....	78
Figure N° 46: Zones d'inhibition des quelque souches bactériennes testés par HE1, les extraits de CHCL3 et n-hexane à une concentration de 10mg/ml.....	79
Figure N° 47: Les zones d'inhibition de HE2, n-hexane, ATB seul et leurs synergies avec l'ATB.....	79
Figure N° 48: Les zones d'inhibition de HE1, CHCL3, ATB seul et leurs synergies avec l'ATB.....	80
Figure N° 49: Les appareillages	100

Liste des tableaux :

Tableau N° 1 : Origine de la propolis	6
Tableau N° 2: Composition chimique de la propolis.....	8
Tableau N° 3: Les compositions chimiques majeures des huiles essentielles responsables à l'activité antibactérienne de la propolis récoltées par différentes pays de monde.	16
Tableau N° 4: l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis de certaines pays de monde	24
Tableau N° 5: l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis de certaines pays de monde (CMI=mm).....	26
Tableau N° 6: Verrières et accessoires.....	38
Tableau N° 7: produits chimiques et réactif.....	38
Tableau N° 8: Information géographique des régions de prélèvement de propolis.....	39
Tableau N° 9: les différentes souches testées dans l'activité antibactérienne.	41
Tableau N° 10: Caractéristiques des antibiotiques utilisés.	41
Tableau N° 11 : La dose des polyphénols totaux dans chaque extrait brut de la propolis.	59
Tableau N° 12 : La dose des flavonoïdes dans chaque extrait brut de la propolis.....	61
Tableau N° 13 : Composés phénoliques identifiés par CCM dans l'extrait CHCl ₃	63
Tableau N°14 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) d'HE1 (20mg /ml, 10mg/ml), des différentes antibiotiques utilisées pour chaque souche bactérienne.....	67
Tableau N°15 : Diamètres d'inhibition de l'HE1et l'HE2 à la concentration 10mg/ml, exprimés en mm.	68
Tableau N°16 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de CHCl ₃ , <i>n</i> -Hex à une concentration 100mg/ml et des antibiotiques.	69
Tableau N°17 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de CHCl ₃ , <i>n</i> -hexane à une concentration 10mg/ml et des antibiotique.....	70
Tableau N°18 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) de CHCl ₃ (100mg /ml, 10mg/ml), testées pour chaque souche bactérienne.....	72
Tableau N°19 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) de <i>n</i> -hexane (100mg /ml, 10mg/ml), testées pour chaque souche bactérienne.....	73
Tableau N°20 : Diamètres d'inhibition de l'association HE/ATB.....	75
Tableau N°21 : Diamètres d'inhibition de CHCl ₃ (10mg/ml), <i>n</i> -hexane (10mg/ml), les ATB et de l'association ATB-CHCl ₃ , ATB-Hex (synergie) exprimés en mm.	76

Introduction

Introduction

Après l'âge d'ore a été marqué par l'abondance de la recherche scientifique et des découvertes dans le domaine de la médecine et de la pharmacie, où de nouvelles molécules appelées antibiotiques ont été fabriquées, ce qui a été considéré comme une révolution médicale et un miracle réel et efficace pour traiter diverses maladies bactériennes à l'époque, récemment une antibiorésistance est émergé qui a contribué à la renaissance et à la propagation de ces maladies en raison de l'utilisation irrationnelle et excessive d'agents antibactériens d'origine chimiques. Bien qu'en 1945 Alexander Fleming, le premier découvreur de la pénicilline comme premier antibiotique, ait mis en garde contre les dangers liés à l'utilisation extensive de sa découverte, il considérait que « l'homme inconscient qui joue avec la pénicilline set moralement responsable de la mort de ceux qui succombent aux coups d'un organisme résistant » (**Flemin, 1945**).

En raison de ce danger, qui est devenu l'une des causes principales de mortalité dans le monde. Les scientifiques ont eu recours à l'étude et à l'évaluation de la propriété thérapeutique et de l'efficacité de l'activité antibactérienne des produits naturelles, notamment les produits de la ruche, en particulier la propolis d'abeille.

La propolis est une matière résineuse hautement agglutinante, de compositions chimique complexe, elle est collecter par les abeilles sur différentes plante et modifiée par leur sécrétions salivaires, pour protéger la ruche des facteurs environnementaux difficiles et empêche les différentes infections microbiennes. De nombreux études révèlent que certains compositions de la propolis principalement les flavonoïdes, polyphénols (**Grecka et al, 2019**), présentent des activités biologique important, tel que activité antibactérienne, antioxydant, anti-inflammatoires, antivirales, antitumorales, antifongiques, antiprotozoaires et immunodultrices (**Oliveira et al, 2010**).

Bien étendu, la spécificité de la flore au site de collecte détermine la composition chimique de la propolis, y compris les compositions volatiles (**Bankova et al 2014**). Plusieurs huiles essentielles de la propolis ont été analysées et des substances chimiques comme les terpénoïdes, les alcaloïdes, les aldéhydes, les hydrocarbures et les cétones aliphatiques ont été signalé (**Clair, Peyron, 1981 ; Pino et al, 2006**).

Par conséquent, notre étude vise à étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits chloroforme (CHCl₃) et *n*-hexane (Hex) de propolis récoltées de

l'Est Algérien, dont les composants peuvent être exploités comme alternatives aux composés chimiques.

Pour atteindre ce but, nous suivons les étapes suivantes :

- L'extraction des huiles essentielles.
- La préparation des extraits bruts.
- La CCM de l'extrait CHCl_3 .
- Détermination de la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes dans les extraits CHCl_3 et Hex.
- Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits par la méthode de diffusion sur gélose.
- L'étude de l'effet synergisme des huiles essentielles des extraits avec les antibiotiques.

Notre étude comporte deux grandes parties, dont :

La première constitue la synthèse bibliographique, elle est divisée en deux chapitres :

- ✓ Le premier chapitre contient généralité sur la propolis.
- ✓ Le deuxième chapitre consacré pour l'antibiothérapie et la résistance bactérienne.

La partie expérimentale se divise en deux grands chapitres:

- ✓ Le premier représente les matériels et les méthodes utilisées.
- ✓ Le deuxième représente les différents résultats obtenus dans notre étude et leur discussion.

Partie bibliographique

Chapitre I:

*Généralité sur la propolis
et les huiles essentielles*

1. Définition de la propolis

La propolis est une substance résineuse très agglutinante produite par les abeilles à partir de différentes parties des plantes, telles que les feuilles, les bourgeons, les gencives, les fleurs, l'écorce et les exsudats résineux, auxquels les abeilles ajoutent des enzymes salivaires, de la cire et du pollen. Sa couleur varie en fonction de la nature d'origine botanique. De manière caractéristique, elle a une odeur aromatique et agréable. En ce qui concerne son étymologie, le mot propolis vient du grec et signifie « pro » = défense, et « polis » = ville. Les abeilles utilisent la propolis pour défendre la ruche, pour sceller les trous et les fissures, pour embaumer les envahisseurs morts en empêchant leur décomposition et leurs maladies et pour réguler la température interne (**Ripari et al, 2021**).



Figure N° 1: Différentes couleurs de la propolis (**Site web 4**).

1.1. Historique de la propolis

De nombreux enregistrements montrent que la propolis a été utilisée par les anciens Égyptiens, Perses et Romains. En 460–377 avant JC, Hippocrate favorisé l'utilisation de la propolis pour soigner les plaies externes et internes et ulcères. Au XVIIe siècle, la propolis a été utilisée comme ingrédient majeur des onguents de guérison.

Le développement de la recherche sur la propolis est strictement lié au développement de la chimie et de la composition chimique de la propolis qui a été déterminée aux XIXe et XXe siècles. Cependant, il est seulement au cours des cinquante dernières années que les scientifiques ont prouvé que la propolis est une substance médicale active et importante dans plusieurs domaines médicaux (**Oryan et al, 2018**).

1.2. Origine botanique

Il a été bien démontré que la présence de plantes spécifiques dans une région géographique donnée, est l'origine d'une préférence constante et sans ambiguïté pour la fabrication de la propolis. Ainsi les différents types de propolis sont dus à leurs différentes composantes qui sont contrôlées par le facteur géographique. (Letullier et al, 2019).

Tableau N° 1 : Origine de la propolis

Région géographique	Espèce	Référence
Albanie	<i>Populus alba.</i>	(Meto et al ,2020).
Brésil	<i>Dalbergiae castophyllum , Baccharis dracunculifolia, Betula verrucosa</i>	(Neto et al, 2017 ; Rodrigues et al, 2019).
Pologne	<i>Populus sp.</i>	(Przybylek et Karpinski, 2019).
Turquie	<i>Populus nigra</i>	(Degirmencioglu et al , 2019).
Cuba, Venezuela	<i>Clusia rosea</i>	(Cardinault et al, 2012).
Nord de la Russie	<i>Betula verrucosa</i>	(Cardinault et al, 2012).

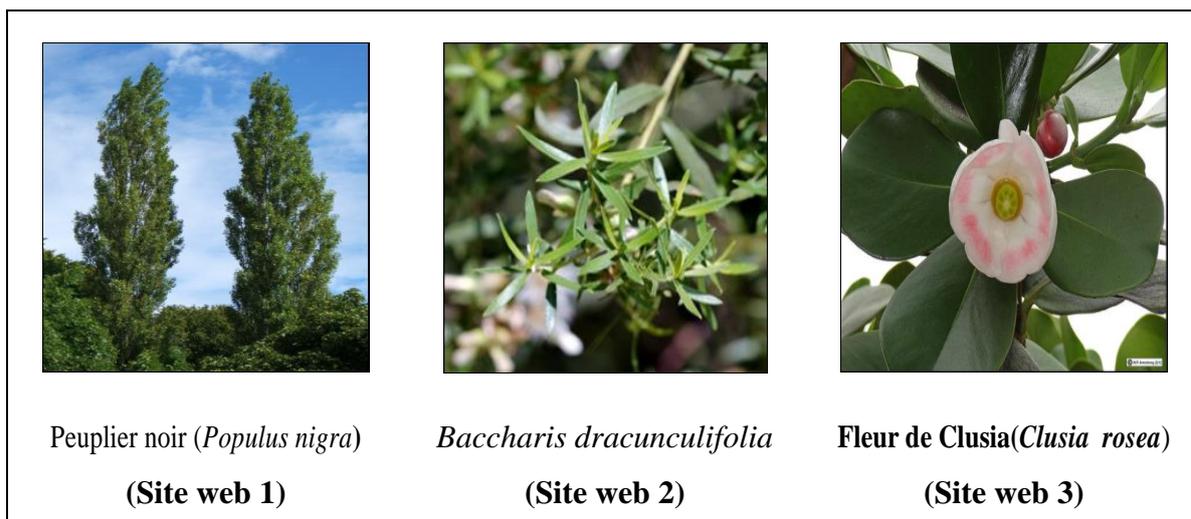


Figure N° 2: Quelques sources de la propolis.

1.3. Composition de propolis

Sa composition est très complexe et variable, en fonction de nombreux facteurs tels que l'origine géographique, les types de sources végétales, les espèces d'abeilles, le temps et la saison de collecte, et des facteurs post-récolte tels que les méthodes d'extraction. La propolis est constituée de nombreux composants actifs, à savoir des résines (50 %), des cires (30 %), des huiles essentielles (10 %), du pollen (5 %) et d'autres composés organiques (5 %), notamment des minéraux, (fer, calcium, zinc, cuivre, manganèse) et des vitamines (C, E et du groupe B) (Esposito et al, 2021).

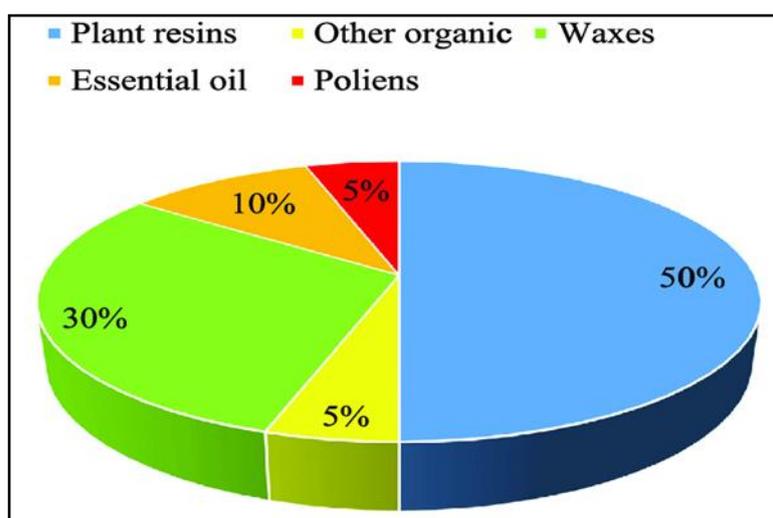


Figure N° 3: Proportions des compositions de la propolis (Przybyłek et Karpin' ski, 2019).

Tableau N° 2: Composition chimique de la propolis.

Origine	Extrait	Composés	Références
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	EtOH 70%	<p>Flavonoïdes :</p> <p>Osthole.</p> <p>Chalcone de pinostrobin.</p> <p>2',4',6'-Trihydroxy chalcone.</p> <p>2-(1-(2-Méthylcortonyloxy)-1-méthylethyl)-8-oxo-1,2-dihydrofurano[2,3-<i>H</i>]2<i>H</i>-chromène.</p> <p>3-Méthyl-but-2-énoicacide, 2,2-diméthyl-8-oxo-3,4-dihydro-2<i>H</i>,8<i>H</i>-pyrano[3,2-<i>g</i>]chromen-3-yl ester.</p>	(Houshang et al, 2018).
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	EtOH 70%	<p>Terpènes :</p> <p>2<i>H</i>-Cyclopentacyclooctène, 4,5,6,7,8,9-hexahydro-1,2,2,3-tetraméthyl.</p> <p>Germanicol.</p> <p>Diméthyl-1,3,5,6-tetraméthyl-[1,3-(13<i>C</i>2)]bicyclo[5.5.0]dodéca-1,3,5,6,8,10-hexaène-9,10-dicarboxylate.</p> <p>Spiro[benzo[<i>a</i>]cyclopenta[3,4]cyclobuta[1,2-<i>c</i>]cycloheptène-8(5<i>H</i>),2'-[1,3]dioxane], 6,7,7<i>b</i>,10<i>a</i>-tétrahydro-1.</p> <p>14-Méthyl-cholest-7-en-3-ol-15-one.</p> <p>(3<i>α</i>,4<i>α</i>)-4-Méthyl-stigmast-22-en-3-ol.</p>	
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	EtOH 70%	<p>Alcaloïdes :</p> <p>12-Azabicyclo[9.2.2]pentadéca-1(14),11(15)-dien-13-one.</p> <p>Oreophilin.</p> <p>3',4'-Dihydro-2'-(morpholin-4-yl)-5',7'-dinitrospiro[cyclopentane-1,3'-quinazoline].</p>	
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	EtOH 70%	<p>Acides aromatiques et leurs esters :</p> <p>Acide benzoïque.</p> <p>Acide Hydroxybenzoïque.</p> <p>Acide Vanillique.</p> <p>Acide P-Coumarique.</p> <p>Dibutyl phthalate.</p> <p>Acide Ferulic.</p> <p>Acide Isoferulique.</p> <p>Acide Cafféique.</p> <p>Acide 2-(2',4'-Dichloro-phenoxy)phényl acétique.</p>	
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan,	EtOH 70%	<p>Acides gras et leurs esters :</p> <p>Acide palmitique</p> <p>Acide margarique</p> <p>Acide oléique</p> <p>Acide Stéarique</p>	

Moradbeig, Klaleh)		Acide 3-hydroxy stéarique Acide eicosanoïque Acide béhénique Acide nephrostéranique 2-Methoxycarbonyl-2-(cis-2'pentenyl)-3-methoxy carbonyl cethyl cyclopentane	
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	DCM	Flavonoïdes: Angecin. 8,8-Diméthyl-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromène-2-one. Columbianetine. Chalcone de pinostrobin. Pinoembrine. 2-(1-(2-Méthylisocortonyloxy)-1-méthylethyl)-8-oxo-1,2-dihydrofurano[2,3-H]2H-chromène. Tectochrysine. Acide 3-Méthyl-but-2-énoïque, 2,2-diméthyl-8-oxo-3,4-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chroméne-3-yl ester. Acide 2-Buténoïque, 2-méthyl-, 9,10-dihydro-8,8-diméthyl-2-oxo-2H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipyran-9-yl ester.	
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	DCM	Terpènes : 2-Naphthalenéméthanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro- α , α ,4a,8-tetraméthyl-, (2R-cis). Agarospirrol. (1E,3a. α ,7a. β)-1H-Indène, 1-éthylidèneoctahydro-7a-méthyl-1,7,11-Triméthyl-4-(1-méthyléthyl)cyclotétradécane. γ -Sitostérol. β -Sitostérol. Octahydro cembrene.	(Houshang et al, 2018).
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	DCM	Acides aromatiques et leurs esters : Dibutyl phthalate	(Houshang et al, 2018).
Certaines régions d'Iran (Chenaran, Taleghan, Moradbeig, Klaleh)	DCM	Acides gras et leurs esters : Acide Caproïque. Acide Myristique. Acide Pentadécanoïque. Méthyl palmitate. Acide Palmitique. Acide Margarique. Méthyl stearate.	(Houshang et al, 2018).

		Acide Oléique. AcideStearique. 2-Méthoxycarbonyl-2-(cis-2'pentényl)-3- méthoxycarbonylcéthylcyclopentane. Acide Sebacique, diéthyl ester. Acide Lignocerique.	
Uruguay	Propolis	Huiles essentielles α -pinene (23.0% – 53.4%) β –pinene (24.1% – 27.4%) limonene (2.1% – 15.6%)	(Kaškoniene V et al, 2014).

1.4. Récolte de la propolis par l'homme

La propolis peut être récoltée avec diverses techniques :

Par raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis, alors dure et friable.

Se détachant mieux Par des grilles spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité **(Debuyser1984)**.

On élimine les déchets les plus grossiers et elle est ensuite dissoute à froid dans l'alcool éthylique à 70 % ce qui permet l'élimination de la cire **(Donadieu 1981)**.



Figure N° 4: Récolte de la propolis par grattage (Site web 3)



Figure N° 5: Récolte de la propolis par l'utilisation des grilles (Bogdanov, 2016)

1.5. Propriétés physico-chimiques de la propolis

❖ **Consistance** : La propolis est généralement molle, flexible et collante à des températures chaudes (25-45°C). Elle dure et cassante à des températures froides (moins de 15°C). La propolis commence à fondre à 60-70°C), mais certains échantillons de propolis ont un point de fusion plus élevé. échantillons de propolis ont un point de fusion allant jusqu'à 100°C (Aygün, 2017).

❖ **Couleur** : Elle varie selon sa provenance, sa varie du vert jaune au rouge au brun foncé selon la source (Anjum et al, 2019).

❖ **Saveur** : Elle est souvent amère et âcre.

❖ **Solubilité** : Compte tenu de la structure complexe de la propolis, elle ne peut être utilisée directement. La propolis est extraite commercialement avec un solvant approprié. Les solvants les plus utilisés pour l'extraction sont l'eau, le méthanol, le chloroforme, le dichlorométhane, l'éther et l'acétone (Wagh, 2013).

❖ **Densité** : la densité de la propolis est de 1,2 (El Houssaini, 2013).

❖ **Odeur** : Elle a une odeur variable suivant son origine, en général, arôme agréable douceâtre, mélangé à celui de miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille,etc...) (Enzo et al, 2006).

❖ **Conservation** : La propolis est conservée facilement dans des conditions favorables et bien déterminé. Elle est stockée dans un endroit sombre à une température -18°C. mais les extraits de la propolis sont conservés secs, soit au réfrigérateur (4° C) ou soit encore au congélateur (-20° C), soit à température ambiante dans un milieu opaque. Après un traitement ou une analyse de ses extraits, ils peuvent être conservés à l'état liquide (Boisard S, 2014).

1.6. Utilisation par l'abeille

La propolis est utilisée pour colmater les trous et les fissures, lisser la surface intérieure et conserver la température interne de la ruche ainsi que pour prévenir l'altération (par exemple, elle est utilisée pour diminuer la taille de l'ouverture de sortie pendant les saisons fraîches), et l'invasion des prédateurs. En raison de son activité antimicrobienne, il contribue également à un environnement interne aseptique et est utilisé pour momifier le corps des intrus afin d'éviter leur putréfaction à l'intérieur de la ruche) (**Kocot et al, 2018**).

1.7. Utilisation de la propolis par l'homme

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tel que :

1.7.1. La médecine

La propolis possède un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques, y compris antioxydant, anti-inflammatoire, immun modulateur, antimicrobien, antitumoral, anticancéreux, cardioprotecteur, neuroprotecteur, et bien d'autres encore.

1.7.2. La cosmétique

La propolis est largement utilisée dans les produits dermatologiques tels que les crèmes et les onguents. Son utilisation dans les produits de soins de la peau est basée sur son anti allergie, anti inflammation, propriétés antimicrobiennes, et l'action promotrice sur la synthèse du collagène cosmétique (**Pasupuleti et al, 2017**).

1.8. Propriétés biologiques de la propolis

La propolis possède un large spectre d'activité biologique.

1.8.1. Propriétés antibactérienne

L'activité antibactérienne de la propolis doit être considérée à deux niveaux. D'une part, elle est liée à l'action directe sur le micro-organisme, et l'autre à la stimulation du système immunitaire, résultant en l'activation des défenses naturelles de l'organisme avec l'action directe sur le micro-organisme, et l'autre avec la stimulation du système immunitaire. L'analyse des mécanismes de propolis permet de déduire son effet sur la perméabilité de la membrane cellulaire du micro-organisme, la perturbation du potentiel membranaire et la production d'adénosine triphosphate (ATP) ainsi que la diminution de la mobilité

bactérienne. Généralement, il est observé que l'activité antimicrobienne de la propolis est plus élevée par rapport aux bactéries Gram-positives qu'aux bactéries Gram-négatives (Przybyłek et al, 2019).

1.8.2. Propriétés anti-inflammatoires

Encore une fois, ce sont les flavonoïdes qui jouent le rôle principal dans l'inflammation. En effet, ils inhibent la synthèse des prostaglandines, ainsi que la prolifération des lymphocytes B et T. On pourrait expliquer cela par le fait que les flavonoïdes ont la faculté d'inhiber l'action de protéines kinases (Protéine Kinase C ou encore protéine tyrosine kinase). Parallèlement, une stimulation des macrophages sera observée.

Certains composés aromatiques et phénoliques, tels que l'acide caféique ou l'acide férulique possèdent respectivement des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes, anti-inflammatoires, régénératrices cellulaires.

L'association d'un extrait de pellicules de raisin riche en anthocyanes, dont la MVG (malvidine 3-O-glucoside), à la propolis, riche en d'autres polyphénols (flavonoïdes et acides phénols), limite la production de médiateurs de l'inflammation sur un modèle *in vitro*. De plus, dans une étude effectuée *in vivo* sur des rats arthritiques, il a été observé une diminution des signes inflammatoires de l'ordre de 41 % pour des rats traités par l'hydrocortisone, cette diminution des signes inflammatoires étant plus importante (67 %) pour des rats traités avec une association raisin/propolis (Mossalayi et al, 2013).

1.8.3. Activité antivirale

Il est connu que, la propolis a montré une activité antivirale qui a été fortement documentée en inhibant l'entrée du virus dans les cellules, créant une perturbation dans la réplication virale qui cause la destruction de l'ARN avant ou après sa libération (ARN) dans les cellules (EL Housseini, 2013). Parmi les virus que la propolis s'attaque, on cite : les poliovirus, les virus de type herpès (dont zona), les adénovirus, le virus de la grippe H1N1, de l'hépatite B et de la stomatite vésiculaire (DONADIEU, 2008).

Les flavonoïdes qui incluent le kaempferol, l'acétine, la quercétine, la galangine et la chrysin ont été rapportés comme cytotoxiques. D'autres chercheurs ont signalé qu'un composé, séparé de la propolis de peuplier, appelé cafféate de 3-méthyl-but-2-ényle, inhibe le titrage et la synthèse d'ADN du virus de l'herpès simplex (type 1) *ex vivo*. Un autre

composé appelé isopentyl ferulated a montré une activité contre le virus de la grippe A1 Honey Kong (H3N2) ex vivo. La propolis a montré une activité antivirale contre le virus de la grippe aviaire, le virus de la fièvre de la vallée du rift, le virus de la maladie de Newcastle de Newcastle, le virus de l'herpès bursal et le virus de la grippe (**Anjum et al, 2018**).

1.8.4. Propriétés antifongique

La propolis a montré une activité contre différents champignons. Il a été étudié que, la propolis inhibe les champignons aflatoxigènes, et diminue également la croissance conidienne dans *Aspergillus flavus*. La propolis de différentes régions montre une activité contre *Candida guilliermondii*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. albicans*. Dans une autre investigation, une propolis française a été utilisée efficacement contre les pathogènes fongiques humains *C. albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigates*. Un constituant de la propolis appelé pinocembrine montre une activité contre *Penicillium ita-licum*, qui arrête la croissance mycélienne et agit sur la respiration et l'homéostasie énergétique du pathogène conduisant à la rupture de la membrane cellulaire et au désordre du métabolisme (**Anjum et al, 2018**).

1.8.5. Propriétés anti-oxydante

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamines E et C et des polyphénols. Les études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en polyphénols. De ce fait, la propolis de peupliers plus riche en polyphénols possède un potentiel antioxydant supérieur à celui de la propolis verte du Brésil par exemple. Dans le même esprit, on trouve que la valeur ORAC d'une résine pure et entière de propolis est supérieure à celle de ses différentes sous-fractions organiques. In vivo, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes anti oxydantes (catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxydase). Le CAPE est le composé présentant le meilleur pouvoir antioxydant (**N. Cardinault, M.-O. Cayeux, P. Percie du Ser 2012**).

2. Les huiles essentielles

2.1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des essences, aromatiques, volatiles, huileuses et fluides, sont synthétisés par les plantes médicinales. (AFNOR, 2000). Elles sont obtenues par différents procédés mécaniques d'extractions à partir d'une matière première d'origine végétale (Bruneton, 1999).

2.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires bio synthétisées par des familles botaniques différents qui présentent des organes sécrétrices, qui peuvent être aussi un lieu de stockage de ces huiles telle que les poils sécréteurs (*Lamiaceae*), les poches sécrétrices (*Myrtaceae*) et les canaux sécréteurs (*Apiaceae*) (Bouyahya et al, 2016).

Elles sont stockées et localisées divers organes de la plante comme les sommités fleuries (menthe, lavande), les feuilles (eucalyptus, laurier), les rhizomes (gingembre), les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (vétiver), les graines (muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier) (Yahyaoui, 2005).

2.3. Les composition chimiques des huiles essentielles

En général, huiles essentielles sont un mélange complexe et variable qui se compose souvent de 300 constituants, cependant, la majorité des huiles comportent 20 à 60 molécules qu'ils sont caractérisés par des origines biosynthétiques distinctes. Les terpènes sont des composés prédominants, mais les phénylpropanoïdes et les autres composés (composés nitriques et sulfuriques) se retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire. Elles peuvent aussi contenir des composés azotés et sulfuriques (Bouyahya et al, 2016).

2.3.1. Les composition chimiques des huiles essentielles de la propolis

Les huiles essentielles de la propolis possèdent plusieurs compositions chimiques présentant une activité antibactérienne important, pour cette raison plusieurs études sont réalisées pour identifier les différents constituants des huiles essentielles. Le tableau suivant présente les différentes compositions majoritaires des huiles essentielles des la propolis récoltée par différentes régions.

Tableau N° 3: Les compositions chimiques majeures des huiles essentielles responsables à l'activité antibactérienne de la propolis récoltées par différents pays de monde.

L'origine de propolis	Compositions des HEs	Références
Cerrado biome in Midwest Brazil.	(E)-Caryophyllene (7.85%) Cadinene (7.67%) Spathulenol (6.65%)	(Fernandes et al, 2015)
Uruguay	α -pinene (23.0% – 53.4%) β -pinene (24.1% – 27.4%) limonene (2.1% – 15.6%)	(Kaškonienė et al, 2014)
Estonia	Eucalyptol (25.9%) α -pinene (20.6%) benzaldehyde (10.8%) β -pinene (8.9%)	(Kaškonien et al, 2014)
Brazil	α -pinene (52.5%) β -pinene (20.8%)	(Kaškonienė et al, 2014)
China	3-methyl-3-butene-1-ol (40.3%) 3-methyl-2-butene-1-ol (11.6%) 4-penten-1-yl acetate (9.0%) α -longipinene (9.4%)	(Kaškonienė et al, 2014)
China (Heilongjiang, Beijing)	acetic acid (44.3% - 60.0%) benzyl alcohol (7.3% - 13.9%)	(Cheng et al, 2013)
China (Shanghai)	acetic acid (25.3%) , cedrene (10.4%) 3-methyl-3-buten-1-ol (7.1%)	(Cheng et al, 2013)
China (Shandong)	acetic acid (11.4%) 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)- 4-methyl- benzene (9.7%) 1,2,3,4, 4a,5,6,8a octahydro-4a,8-	(Cheng et al, 2013)

	<p>dimethyl-2-(1-methylethenyl)- naphthalene (8.3%)</p> <p>benzyl alcohol (7.4%)</p>	
Turkey (Eastern Anatolia)	<p>phenyl ethyl alcohol (7.7%)</p> <p>benzyl alcohol (7.4%)</p> <p>decanal (6.7%)</p> <p>ethyl benzoate (6.5%)</p>	(Hames-Kocabas et al, 2013)
Turkey (North Eastern Anatolia)	<p>Cedrol (7.0% - 15.6%)</p> <p>α-bisabolol (14.3%)</p> <p>δ-cadinene (2.7% - 5.6%)</p>	(Hames-Kocabas et al, 2013)
Brazil	<p>Nerolidol (10.4% – 14.7%)</p> <p>benzenepropanoic acid (14.9% – 20.8%)</p>	(Huang et al, 2013)
Portugal	<p>Viridiflorol (9.0% – 39.0%)</p> <p>n-tricosane (5.3%)</p> <p>n-nonadecane (4.0% –18.0%)</p>	(Miguel et al, 2013)
India (Maharashtra state)	<p>Tricosane (13.6%)</p> <p>hexacosane (11.5%)</p> <p>palmitic acid (8.5%)</p> <p>linalool (6.7%)</p> <p>methyleugenol (6.0%)</p>	(Naik et al, 2013)
Italy (Northern)	<p>Acid benzoique (3.1% – 30.1%)</p> <p>benzyl benzoate (0.2% – 13.1%)</p> <p>β-eudesmol (2.9% – 12.9%)</p> <p>δ-cadinene (1.3% – 13.3%)</p> <p>γ-cadinene (1.4% – 8.9%)</p> <p>T-cadinol (2.7% – 10.0%)</p>	(Pellati et al, 2013)

	α -cadinol (4.8% – 9.7%)	
Italy (Southern)	α -pinene (13.2%) germacrene D-4-ol (6.3%)	(Pellati et al, 2013)
Ethiopia (Assela)	5, 6, 7,8-tetramethylbicyclo [4,1,0] hept-4-en-3-one (15.0%) acoradiene (13.8%) epicedrol (6.8%)	(Haile et al, 2012)
Ethiopia (Haramaya)	Calamenene (13.8%) 4-terpineol (8.6%) epi-bicyclosesquiphellandrene (8.4%)	(Haile et al, 2012)
Brazil	Longipinene (24.9%) α -eudesmol (6.9%) β -eudesmol (6.1%) β -caryophyllene (5.3%)	(Li Y-J et al, 2012)
Santiago (état de Rio Grande do Sul au Brésil)	a-pinene (62%) b-Pinene (29,2%)	(Simionatto et al, 2012)
Jaguari (état de Rio Grande do Sul au Brésil)	a-pinene (63%) b-Pinene (12,5%) Limonene (11,2%)	(Simionatto et al, 2012)
San Francisco de Assis (état de Rio Grande do Sul au Brésil)	a-Pinene (57%) b-Pinene (30,8%)	(Simionatto et al, 2012)
Brazil (Rio Grande do Sul State)	α -pinene (57.0% – 63.0%) β -pinene (12.5%– 30.8%) limonene (1.5% – 11.2%)	(Simionatto et al, 2012)

Argentina (Andean region)	O-cimene, limonene	(Agüero et al, 2011)
Brazil (Rio de Janeiro State)	α -pinene (18.3%) β -pinene (6.5%) δ -cadinene (7.0%)	(Ioshida MDM et al, 2010)
Brésil (Rio de Janeiro)	β -caryophyllene (12.7%) Acétophénone (12.3%) Linalol (6,47%)	(Oliveira et al, 2010)
China (Inner Mongolia)	α -bisabolol (20.1%) 2-methyl-3-buten-2-ol (10.8%) 3-methyl-2-butene-1-ol (8.3%)	(Fu Y-X et al, 2009)
China (Inner Mongolia)	3-methyl-2-buten-1-ol (26.8%) phenylethyl alcohol (17.1%) 2-methoxy-4-vinylphenol (9.5%)	(Fu Y-X et al, 2009)
China (Inner Mongolia)	Heptadecane (7.0%) phenantrene (4.0%)	(Fu Y-X et al, 2009)
Brazil (Minas Gerais State)	(E)-nerolidol (17.1%) β -caryophyllene (13.4%) selina-3,7(11) diene (10.4%)	(de Albuquerque IL, 2008)
Brazil	Nerolidol (6.6%) trans-caryophyllene (4.1%) spatulenol (3.6%)	(Marostica Junior RM et al, 2008)
Brazil (Teresina, Piaui State)	1,8 - cineole (24.0%) exo-fenchol (11.3%) terpinen-4-ol (7.7%)	(Torres RNS, 2008)
Brazil (Piaui State)	α -pinene (0.3% – 34.4%) E-caryophyllene (2.6% – 17.4%)	(Torres RNS et

	α -copaene (3.6% – 7.5%)	Al, 2008)
Greece	α –pinene (7.9% – 45.8%) trans- β -terpineol (2.2% – 6.6%) Junipene (1.5% – 11.7%)	(Melliou et al, 2007)
Mexico (Yucatan)	α -pinene (11.9%) hexadecanoic acid (10.9%) trans-verbenol (7.0%)	(Pino JA et al, 2006)
Mexico (Yucatan), stingless bees	α -pinene (17.6%) β -caryophyllene (11.8%) spatulenol (9.7%) caryophyllene oxide (9.5%) β -bourbonene (9.2%)	(Pino JA et al, 2006)
Turkey (South Eastern Anatolia)	α –terpinene (21.8%) α –terpineol (12.3%) junipene (9.1%) cinnamyl alcohol (8.7%) β -cariophyllene (8.1%)	(Yildirim et al, 2004)
Brazil, stingless Friesomelita	manool, totarol	(Patricio EFLRA et al, 2002)
Bulgaria	sesquiterpene alcohol M = 222 (15.5%)	(Kujungiev et al, 1999)
Brazil, stingless bees	Tetragona: nerolidol (12.3%) Spatulenol (10.4%) Melipona quadrifasciata – p-cimen-8-ol (10.2%) M. comperittes – ethylphenol (11.4%)	(Bankova et al, 1999)
Canary islands	Nerolidol (3.2% – 11.0%)	(Bankova et al,

	spatulenol (3.2% – 8.4%) ledol (1.6% – 3.8%)	1998)
Brazil	Spatulenol (3.0% – 13.9%) (2Z, 6E)-farnesol (1.6 – 14.9) prenyl-acetophenone (0.2 – 8.7)	(Bankova et al, 1998)
Croatia	Limonene (6.4% – 10.5%) benzyl alcohol (3.1% – 18.2%) benzyl benzoate (3.6% – 4.4%)	(Borcic et al, 1996)
Mongolia	benzyl benzoate (8.6%) Sesquiterpene alcohol M = 222 (15.7%)	(Bankova et al, 1994)
Albania	Cadinene (10.5%) methoxyacetophenone (9.0%) sesquiterpene alcohol M = 222 (18.5%)	(Bankova et al, 1994)
Bulgaria	β -eudesmol (8.8%) δ -cadinen (5.3%)	(Bankova et al, 1994)
UK (Wales)	6-methylheptyl-5-en-2-one (16.0%) benzyl alcohol (14.2%) benzaldehyde (9.0%)	(Greenaway et al, 1989)
Hungary	β -eudesmol, benzyl benzoate	(Petri et al, 1988)
Poland (Southern)	farnesol, dihydroeudesmol, guaiol	(Maciejewicz et al, 1983)
France	β -eudesmol (30.0%) guaiol (10.0%) benzyl benzoate (8.0%)	(Clair et al, 1981)
Czech Republic	benzoic acid, benzyl alcohol, vanillin eugenol	(Janas et al, 1974)

2.4. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

➤ Caractéristiques physiques

- Les huiles essentielles sont liquides à la température ambiante
- Leur densité est généralement inférieure à 1.
- Elles ont indice de réfraction souvent élevé.
- Elles sont douées d'un pouvoir rotatoire.
- Elles sont peu solubles dans l'eau et solubles dans la majorité des solvants organiques tels que l'alcool et l'éther.
- Elles peuvent être incolores ou colorées et sont sensibles à l'altération.
- Elles ont tendance à se polymériser pour former des produits résineux (Bruneton, 1993 ; Erman, 1985).

➤ Caractéristiques chimiques

Les huiles essentielles s'oxydent à la lumière et absorbent de grandes quantités d'O₂ de l'air, en se résinifiant, ce qui modifie leurs odeurs (Padrini, 2003).

2.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles repose sur différentes Techniques. Généralement la méthode d'extraction utilisée choisi en fonction de la nature de la substance végétale à traiter, de la nature des composés et du rendement en huiles. Les méthodes d'extraction qui intervient sont extraction au CO₂ supercritique, Expression à froid l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation est la technique la plus ancienne et également la plus utilisable.

➤ Technique d'hydro-distillation

C'est une technique qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau et porter à ébullition. Les vapeurs d'eau formées au sein de l'eau bouillante entraînent l'huile essentielle qui est recueillie après condensation et décantation (Anonyme, 2008 ; Paris, 1965).

2.6. Utilisation des huiles essentielles :

Les HE ont de nombreuses utilisations (Mansour, 2006) ; notamment :

- Les HE agissent contre des insectes ou des animaux.
- Il attire les insectes et contribue ainsi à la pollinisation croisée entre les plantes.
- Peut être utilisé comme substance thérapeutique ; par exemple comme mouline à vent ; diurétique ; antiseptique ou anthelminthique.
- Ajoutez aux aliments comme épice pour obtenir un gout délicieux et délicieux.
- Ajouté aux bonbons ; aux boissons gazeuses et non gazeuses ; aux médicaments ;aux cosmétiques et aux cigarettes.
- Il est utilisé dans la fabrication de savon et de pesticides ménagers ; pour son arôme.

2.7. Les activités biologiques des huiles essentielles :

Huiles essentielles présentent des activités antimicrobiennes tels que antibactérienne et antifongique, antiseptique, anti-inflammatoire (**Fekih, 2014**), antiviral, antioxydant (**Laurent, 2017**).

2.7.1. L'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis

Tableau N° 4: l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis de certaines payes de monde

Origine	Diamètres des zones d'inhibition (ZI=mm)												Référence
	Gram positif						Gram négatif						
	Staphylococcus aureus			Staphylococcus epidermides		Bacilo subtilis	Streptococcus pyogenes		Escherichia coli		Pseudomona s aeruginosa	Klebsiella pneumoniae	
	SR	ATCC 25923	ATCC 6538	25/04	194/02	ATCC 6633	93007	75194	36298	ATCC 25792	ATCC 25619	ATCC 1003	
Bg	4>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(Kujungie6 et al, 1999)
Br1	12.1±0.6												
Br2	11.5±0.3												
Br3	12.8±0.3												
Br4	11.2±0.3												
G1	21.0±2												
G3	16.0±0.7												
K1	23.0±1.3												
K2	12.3±1.1												
Rio de Janeiro(B résil)	-	14	-	10	10	-	14	18	17	-	-	-	(Oliveira et al, 2010)
Santiago(Brésil)	-	-	12	-	-	11	-	-	-	11	10	11	(Simionatto et al, 2012)

SR : Sans Référence

Bg :dans la région de Sofia, Bulgarie ; Alb, près de Tirana,Albanie; Mong, près d'Ulan **Bator**, Mongolie ;Egypte, à Bani Swaief, près de Gizeh, Egypte

Br1 :près de Rio Claro City, État de Sao Paulo, Brésil

Br2 :près de Prudentopolis, État du Parana, Brésil

Br3 :près de Pacajus, État du Ceara, Brésil

Br4 : prèsLimera, État de Sao Paulo, Brésil

K1 :près de SanMateo, Gran Canaria, Îles Canaries

K2 : prèsTelde, Gran Canaria, Îles Canaries

G1 :dans l'État de Picas Piani, au Brésil, recueilli par l'abeilleMelipona compressipes, et **G3**, à Prudentopolis,État du Parana recueilli par l'abeille Melipona quadrifasciata anthidioides. (G1 et G3 sont produits par des abeilles indigènes sans dard du genre Mélipone.)

Tableau N° 5: l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la propolis de certaines payes de monde (CMI=mm)

Origine	CMI (mg/ml)									Référence
	Gram positif			Gram négatif						
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>E.feacalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Enterobacter Cloacae</i>	
	ATCC 25923	ATCC 12228	ATCC 29218	ATCC 25922	ATCC 227853	ATCC 27853	ATCC 13883	ATCC 700603	ATCC 13047	
1/Chalcidique (Nord-Est de la Grèce)	6,80	5,60	-	4,90	5,70	-	5,30	-	5,80	(Melliou et al, 2007)
2/île d'Andros (Égée)	4,10	4,90	-	4,20	5,20	-	4,80	-	5,30	
3/Agrinio (Centre-Ouest de la Grèce)	5,30	7,20	-	3,80	6,90	-	6,90	-	7,90	
4/Arta(Nord-Ouest de la Grèce)	6,70	6,50	-	3,40	5,90	-	5,60	-	3,10	
5/Preveza (Nord-Ouest de la Grèce)	6,50	6,40	-	3,90	7,10	-	7,80	-	7,90	
Brazilian Cerrado biome	>1	-	5,0	>1	-	>1		>1	-	(Fernandes et al, 2015)

Chapitre II:
Antibiothérapie et la
résistance bactérienne

1. Antibiothérapie

Antibiothérapie est défini comme un traitement des maladies infectieuses par l'utilisation des antibiotiques qui apparue à partir de 1941 une véritable révolution. Pour cette raison, le traitement avec les antibiotiques dépend de la connaissance des propriétés bactériennes responsables de la maladie et de la pharmacocinétique de l'antibiotique ce qui prévient le risque des bactéries (Morri et al, 2017). Eradiquer complètement les infections bactériennes pendant l'âge d'or qui s'étendait sur un demi-siècle. Après cette période une émergence de l'antibiorésistance était observée (Trémolières, 2010).

1.1. Définition des Antibiotiques

Pour traiter les différents infections bactériennes en utilise des substances chimiques sont appelés les antibiotiques qui ont la capacité de tuer ou d'empêcher la croissance bactérienne mais leur administration il doit être à des faible doses moins de 1mg /ml (Lancini et al ,1995) pour éviter des altérations dans la hôte. Ils sont des produits naturelles d'origine microbienne ou synthétique tels que les sulfamides (Yala et al, 2001).

1.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont classifiés selon différentes critères :

1.2.1. Classification des antibiotiques selon leur origine

➤ **Les antibiotiques naturels :** sont obtenues à partir des micro-organismes (Mokrani et Hamdani, 2017) de type champignons inférieurs comme *penicillium* pour les pénicillines (Yala et al, 2001), *Céphalosporium* pour les céphalosporines (Ghuysen, 1975) et bactéries comme *Bacillus* pour polymyxine-colistine (moroh, 2013), et *Stréptomyces* pour streptomycine (lancini et al, 1995).

➤ **Les antibiotiques hémi-synthétiques :** sont élaborées par modification chimiques des substances de base naturelle comme les bêta-lactamines (Mokrani et Hamdani, 2017).

➤ **Les antibiotiques synthétiques ou artificiels:** sont résulté et issue par synthèse chimique (par l'intervention des produits chimiques en laboratoire) comme les quinolones et les sulfamides (Mokrani et Hamdani, 2017).

1.2.2. Classification des antibiotiques selon la cible bactérienne

Les antibiotiques agissent sur différentes cibles des bactéries tel que la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines, la synthèse des acides nucléiques (Sultan et al, 2018).

1.2.3. Classification selon la nature chimique

Elle est basée sur la structure chimique de base (noyau de base ex : cycle β -lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse (Mohammedi, 2010), (CATTOIR V, 2006). Selon la nature chimique du cycle de base elle existe cinq familles des antibiotiques :

- Pénicilline porte un cycle à 5 sommets dont un soufre comme les pénicillines.
- Clavams porte un cycle à 5 sommets dont un oxygène comme les β -lactamines.
- Carbapénème porte un cycle insaturé à 5 sommets carbonés comme les imipénèmes.
- Céphalosporine porte un cycle insaturé à 6 sommets dont un soufre comme les céphalosporines.
- Oxacéline porte un cycle insaturé à 6 sommets dont un oxygène comme les lactamoxef (Hnich, 2017).

1.2.4. Classification des antibiotiques selon leur spectre d'activité

- **Les antibiotiques à large spectre** : ils agissent avec plusieurs types de microbes tel que les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les virus plus gros, les organismes de types pleuropneumonie et protozoaires (ex : pénicillines, clarithromycines, azithromycines) (Naveed et al, 2020).
- **Les antibiotiques à spectre étroit**: ils affectent un nombre limité des bactéries et des microbes (ex : tobramycine, flucloxacilline) (Naveed et al, 2020).

1.2.5. Classification des antibiotiques selon l'effet

- **Antibiotiques bactéricides** : ils tuent les bactéries (Basha, 2019). Cet effet est évalué par la mesure de concentration minimale bactéricide (CMB) (Lleo et al, 1987).
- **Antibiotiques bactériostatiques** : ils inhibent la croissance bactérienne, et gardent la viabilité (Basha, 2019). Cet effet est évalué par la mesure de concentration minimale inhibitrice (CMI) (Lleo et al, 1987).

1.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur différentes cibles moléculaire de la bactérie par différentes modes d'action. On distingue :

- Inhibe la synthèse de peptidoglycane.
- Altération de paroi.
- Inhibe la synthèse des protéines.
- Inhibe la synthèse des acides nucléiques.
- Perturbation de métabolisme intermédiaire (**Olivier L, 2017**).

2. Résistance aux antibiotiques

A la fin de l'âge d'or, le miracle des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes se transforme en cauchemar, lors l'apparition de l'antibiorésistance à l'échelle mondiale qui devient une préoccupation majeure, à la fois sur des questions sanitaire, économique, mais surtout humain (**Trémolières, 2010**).

2.1. Définition de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques c'est un phénomène défini par la capacité des souches bactériennes d'adapter ou de résister les différents types d'antibiotiques (**ZIATI, 2021**). Elle résulte par l'utilisation exagérée et injustifiée des antibiotiques, a permis la sélection de souches bactériennes résistantes (**Med Sci, 2021**).

L'évolution des antibiotiques au cours du temps suivi par l'augmentation des bactéries multi résistantes(BMR), puis les maladies infectieuse.

L'antibiorésistance présente une adaptation et stimulation de la croissance des bactéries, à des doses très élevées d'antibiotique ou par une simple augmentation de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) par rapport à la sensibilité normale d'un groupes de bactéries appartenant à une même espèce. De fait, qu'elle soit naturelle ou acquise, elle empêche la disparition du foyer infectieux (**RACHIDI, 2016**).

La plupart des bactéries à Gram- résistent les antibiotiques telque *Acinetobacterbaumanni*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore certaines entérobactéries (**Tacconelli et al, 2018**).

2.2. Les types de résistance

Selon le type d'antibiotique utilisé et la présence de gènes de résistance et la capacité d'entrer et d'exprimer du matériel génétique à travers différents hôtes (**Schwarz et al, 2001**), on distingue deux types de l'antibiorésistance : la résistance innée et la résistance acquise.

2.2.1. Résistance innée

C'est une résistance naturelle où les souches bactériennes de même espèce sont d'origine résistent un ou plusieurs antibiotiques (**Perry et al, 2016**), par l'expression des gènes chromosomiques (la résistance chromosomique). Elle est stable, et transmise à la descendance lors de la division cellulaire, via le chromosome bactérienne (Transfère vertical) (**MEDICAL, 2012**).

La Société Française de Microbiologie (SFM) définit la résistance naturelle comme la caractéristique d'une espèce bactérienne, qui se traduit par des concentrations minimales inhibitrices (CMI), supérieures à la concentration critique supérieure des tests de sensibilité pour l'antibiotique concerné. Habituellement, le support de cette résistance est chromosomique (**Peyrou, 2001**).

2.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise c'est l'inverse de la résistance naturelle. Elle est spécifique pour certaines souches bactériennes, qui sont capable de résister une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée, que celle supportée par les autres souches de la même espèce (**DEMBELE, 2020**). Elle peut s'acquérir soit par mutation chromosomique, soit par acquisition de matériel génétique exogène (résistance extra chromosomique) (**Peyrou, 2001**).

2.2.2.1. Résistance par mutation chromosomique (intra chromosomique)

La résistance s'effectue soit par une mutation génomique provoquant un changement de la séquence nucléotidique qui module l'expression génique puis la molécule cible d'antibiotique qui serait impossible d'interagir avec lui, soit par une recombinaison rassurante la transition de fragment d'ADN d'un endroit chromosomique bactérienne à un autre, pour il serait facilement à déplacer et il s'agit de transposon ou intégrons (**Zogheib et al, 2005**).

Lors la division cellulaire la transmission des gènes de résistances vers les décondenses est verticale.

2.2.2.2. Résistance extra chromosomique

C'est l'acquisition de gène de résistance d'un plasmide étrangère, issue par une autre bactérie par des mécanismes de conjugaison, transformation ou transduction. Le transfert de matériel génétique est horizontal.

Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (**Springman et al 2009**).

2.3. Mécanisme de résistance

Les souches bactériennes présentent quatre grands mécanismes des résistances :

2.3.1. Modification enzymatique

Les bactéries synthétisent des enzymes qui alertent la structure chimiques des antibiotiques puis leur disfonctionnement (inactivation) soit par un clivage dans le cas de B-lactamase qui dégrade le cycle B-lactame de pénicilline et de céphalosporine(**Jacoby, 1994**), soit par l'ajoute des groupements chimiques dans le cas des aminoglycosidases (AMG) Acétyltransférase, l'AMG Adényltransférase ou phosphotransférase qui sont inactivées les aminosides ou les chloramphénicolacétyltransférase qui détritent les chloramphénicols.(**Munita et al, 2016**).

2.3.2. Modification de perméabilité membranaire

La bactérie présente un système de perméabilité et de protection contre les agressions extérieurs .ce système se constitue d'une paroi rigide et résistante, qui se diffère structurellement d'une bactérie à gram négatif à une autre bactérie à gram positif.

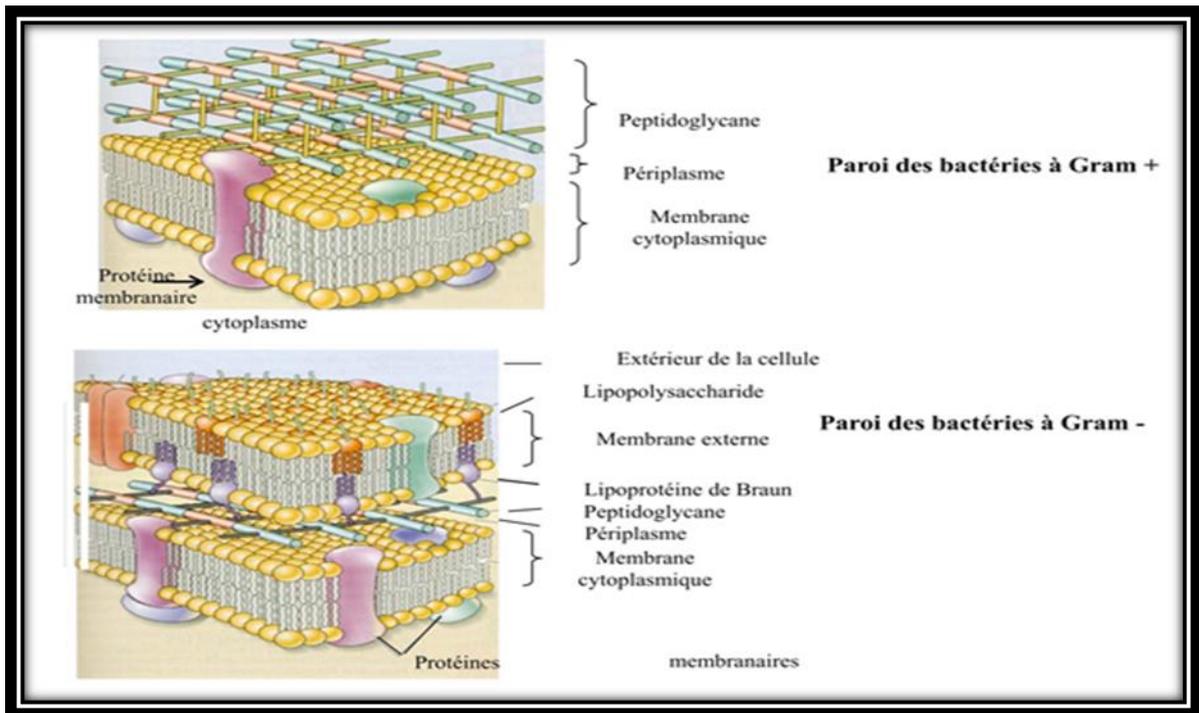


Figure N° 6: Paroi bactérienne (perry et al. 2002)

La paroi bactérienne assure les échanges membranaires entre le milieu intra et extracellulaire tel que les éléments indispensables à la vie bactérienne.

Les substances hydrophobe sont perméable à la membrane, mais les ions et les petites substances hydrophiles sont imperméable (Davin-Regli, 2020) comme les antibiotiques qu'ils sont transportés par des canaux protéique appelées porines.

Les interactions antibiotique-porine modulent l'expression génique des porines soit par une perte d'expression et diminution de nombre des porines ou par une mutation qui provoque un changement de conformation et un rétrécissement de canal puis l'imperméabilité membranaire (Davin-Regli et al, 2020).

La diminution de perméabilité est un mécanisme de résistance le plus répandu chez les bactéries à Gram négatif tel que *P. aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae* (ALEKSHUN, 2007).

2.3.3. Modification et remplacement de la cible

L'antibiotique pénètre à l'intérieur de la bactérie peuvent être modifié ou remplacer leur cible. Ce processus est plus souvent existant pour les pénicillines, les glycopeptides et les molécules du groupe MLS chez les bactéries à Gram positif et pour les quinolones chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**GUARDABASSI L, 2006**).

Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible (**ALEKSHUN M, 2007**).

La résistance aux quinolones résulte à l'existence de gène plasmidique Qnr (*Quinolone resistance*) dont 5 groupes existent (**CAVACOL, 2009**), l'expression de ce dernier produit des protéines Qnr qui se fixent sur les topoisomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (**WANG M, 2009**).

2.3.4. Pompes à efflux

Les bactéries présentent plusieurs pompes d'efflux qui leur permettent de se résister aux stress générés par des molécules toxiques, incluant les antiseptiques et les antibiotiques. Ces pompes sont parfois spécifiques, mais, le plus souvent, elles sont aptes à exporter des substances de structure et de fonctions très différentes. L'ensemble de ces propriétés confère aux bactéries une grande capacité d'adaptation et donc un potentiel à développer un phénotype de multi-résistance. (**Boulant, 2020**).

Les gènes codant pour ces transporteurs protéiques sont présents chez presque toutes les bactéries et se situent sur le chromosome ou sur un plasmide (**Boulant, 2020**).

Trois gènes codant pour des systèmes d'efflux ont été décrits chez les cocci à Gram positif. Leur produit forme un transporteur protéique qui diminue l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule. (**Quincampoix et al, 2001**).

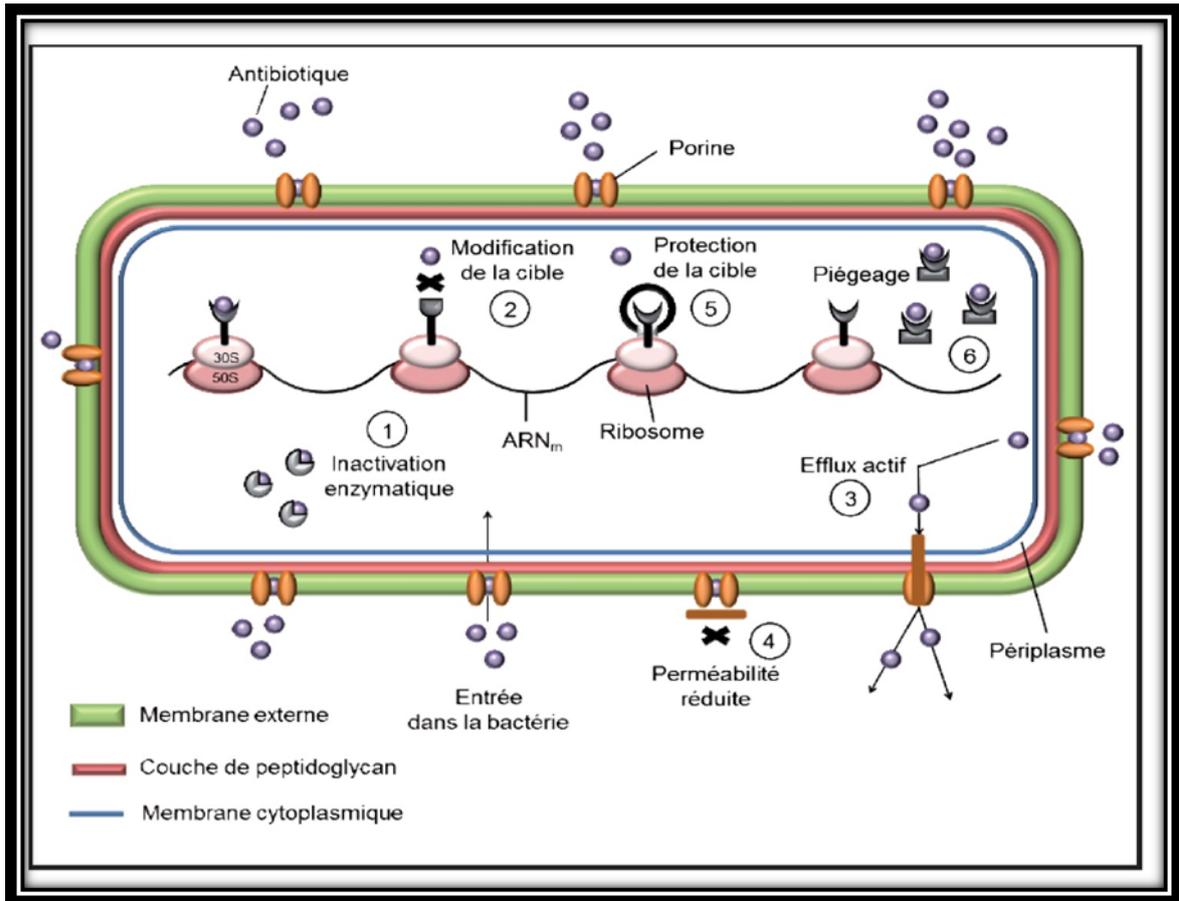


Figure N° 7: Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques (Guardabassi et Courvalin, 2006)

Partie expérimental

Chapitre
Matériels et méthodes

1. Matériel

L'ensemble des manipulations ont été réalisé dans les laboratoires du centre universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila :

- LSNM : laboratoire de recherche Sciences naturelles et des matériaux.
- Laboratoires pédagogiques de sciences de la nature et de la vie.

1.1. Matériel technique :

Tableau N° 6: Verrières et accessoires

Verrières et accessoires		
Papier d'aluminium	Potence (support)	Ballon à fond rond
Papier film	Boite de Pétri en verre	Chauffe ballon (bec électrique)
Papier filtre	Boite de Pétri en plastique	Réfrigérant à eau
Papier Wattman	Pissette	Compte goutte
Etiquette	Porte tube	Thermostat
Mortier et pilon	Tube à essai	Pince
Spatule	Tube à vise	Flacon + vial
Erlenmeyer	Micropipette	Embout
Entonnoir	Eprouvette graduée	Eppendorf
Bécher	Ampoule à décanter	Pipette pasteur
Ecouvillon	Cuve	

Tableau N° 7: produits chimiques et réactif

produits chimiques	Réactifs
Chloroforme	Chlorure d'aluminium
n-hexane	Acide gallique
Méthanol	Quercitine
Ether di éthylique	Folin Ciocalteu
Ammoniaque	Bicarbonate de sodium
Eau physiologie	
Chlorure de sodium	

1.2. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est constitué de la propolis. Deux échantillons de cette dernière ont été collectés dans deux régions différentes, l'une de la Wilaya de Guelma (Djebel MAouna) et l'autre de la Wilaya de Mila, de la commune de Terrai Beinen, exactement dans la région d'El Gharbia et Senta.

La propolis set récoltée durant la saison d'été en 2020.



Figure N° 8: Echantillon de propolis

1.3. Présentation géographique de la zone de prélèvement de la propolis

Tableau N° 8: Information géographique des régions de prélèvement de propolis

Géographie	Wilaya de Mila	Wilaya de Guelma
Coordonnées géographiques	Latitude : 36.45. Longitude : 6.26667 36° 27'0 " Nord, 6° 16'0" Est	Latitude: 36.4667, Longitude: 7.43333 36° 28' 0" Nord, 7° 25' 60" Est
Superficie	12 989 hectares 129,89 km ²	4 474 hectares 44,74 km ²
Altitude	Minimale 155 m, Maximale 1040 m	Minimale 256 m, Maximale 321 m, <i>Moyenne 289 m</i>

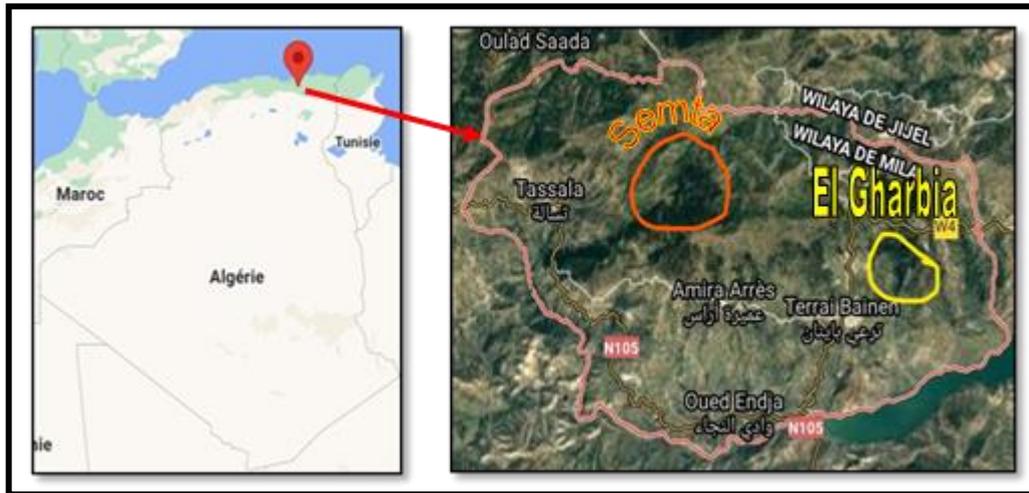


Figure N° 9: Situation géographique de Terrai Beinen (El Gharbia et Semta), la Wilaya de Mila (Google earth) .



Figure N° 10: Situation géographique de la Wilaya de Guelma (Google earth).

1.4. Matériel microbiologique

1.4.1. Les souches bactériennes étudiées

Sept souches bactériennes de référence ont été testé : *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *E-coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*. ces derniers souche obtenues de l'American Type de Culture Collection (ATCC). Ils ont été obtenus par le laboratoire de recherche BVBR de l'université d'Oum El Bouaghi, et par le laboratoire de phytopathologie et de microbiologie de l'université Ferhat Abbes, Sétif 01.

Tableau N° 9: les différentes souches testées dans l'activité antibactérienne.

Gram	Famille	Genre	Espèce	Référence
Positif	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Faecalis</i>	14C1104
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Cereus</i>	ATCC10876
	<i>Listériaceae</i>	<i>Listéria</i>	<i>monocytogenes</i>	ATCC15313
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Luteus</i>	ATCC4698
Négatif	<i>Entérobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	ATCC9738
		<i>Proteus</i>	<i>Mirabilis</i>	ATCC35659
	<i>Pseudomoneae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	ATCC27853

1.4.2. Antibiotiques

Différentes antibiotiques de 3 familles sont utilisés dans notre étude comme des control positif.

Tableau N° 10: Caractéristiques des antibiotiques utilisés.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)
B-lactamine	Ampicilline	AMP ₁₀	10
	Céfazoline	CZ ₃₀	30
	Imipénem	IPM ₁₀	10
Aminoside	Amikacine	AK ₁₀	10
	Gentamicine	GEN ₁₀	10
Phénicol	Chloramphénicol	C ₃₀	30

1.4.3. Les milieux de culture

1.4.3.1. La gélose nutritive (GN)

Elle s'utilise pour la croissance, isolement et réactivation des souches bactériennes.

1.4.3.2. La gélose Muller Hinton (MH)

Elle s'utilise pour tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et aux extraits des produits naturels. Elle facilite la diffusion des antibiotiques et la croissance des souches bactériennes.

2. Méthode

2.1. Broyage de propolis

La propolis est une matière difficile à broyer grâce à leur composition chimique (résine, cire), donc elle est refroidie dans un réfrigérateur, puis elle est broyée à l'aide d'un mortier.

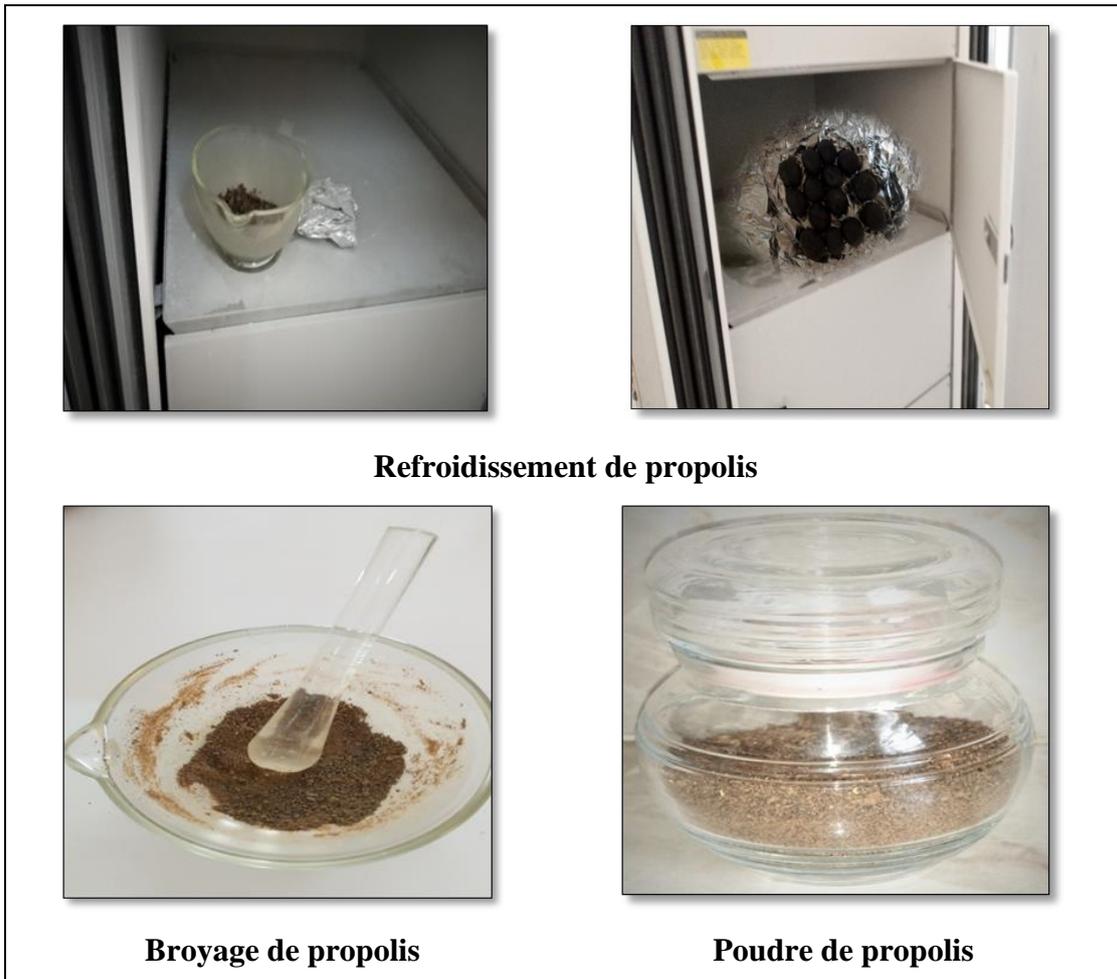


Figure N° 11: Broyage de propolis

Au laboratoire pédagogique de SNV : laboratoire N°18

2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles se réalisent par une méthode d'hydrodistillation en utilisant un Montage d'hydrodistillation .

Après avoir pesé 50g de propolis, en va l'introduit dans un ballon avec un volume d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition au-dessus d'une chauffe ballon, panant 3à4 h à une température environ 80,90 à 100°C. Les vapeurs d'eau libèrent les molécules d'intérêts.les plus volatiles d'entre elle sont emportées avec la vapeur .Celle-ci est ensuite condensé dans un réfrigérant. Et les différentes substances sont récupérées séparément dans une verrerie sous forme de l'hydrolat .L'huile colée aux parois de l'ampoule à décanter est obtenue en lavant ce dernier par l'éthère diéthylique à l'aide d'une micropipette .Conserver l'huile essentielle dans un tube sec en verre dans un milieu opaque à température 4à6 °C après l'évaporation de l'éthère diéthylique.



Figure N° 12: Montage de l'hydrodistillation **Figure N° 13:** Huile essentielle extraite de propolis

Cette étape est réalisé au laboratoire de LSMN.

2.3. Extraction par solvants (CHCL₃, hexane)

L'extraction par solvant est une méthode de séparation des molécules se trouvant dans une matière première solide, grâce à l'utilisation d'un solvant liquide dans lequel la molécule à extraire est soluble, puis l'obtention d'un extrait brut. Cette méthode c'est une extraction solide –liquide est utilisée pour extraire les composés phénoliques totaux.

5g de poudre de propolis ont été repris avec un volume de CHCL₃, dans une erlenmeyer de 250ml.



Figure N° 14: Pesage de propolis propolis



Figure N° 15: Mélange des extraits de propolis

Le mélange a été macérer et agiter à l'aide d'un appareil agitateur magnétique, pendant 72h à une température ambiante.



Figure N° 16: Macération des extraits

Après la macération le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre dans une erlenmeyer, le filtra est transféré dans une petite boîte pétri et laisser à concentrer (évaporation de solvant) sous la haute.

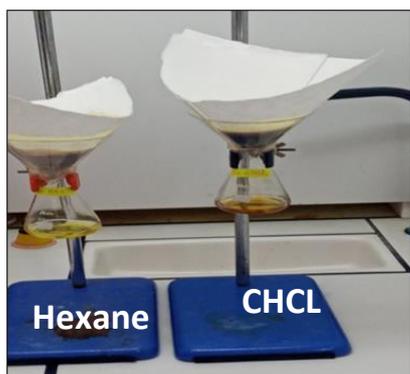


Figure N° 17: Filtration des extraits**Figure N° 18:** Evaporation des extraits

Après l'évaporation de CHCl₃ et séchage de l'extrait brut, il est gratté et conservé dans une Vial pour obtenir de l'extrait de CHCl₃ brut.

**Figure N° 19:** Grattage des extraits
extraits**Figure N° 20:** Conservation des
extraits

Ce processus à été effectué aussi pour la préparation de l'extrait hexane au laboratoire pédagogique de SNV : Laboratoire 18

2.4. Détermination des rendements d'extraction

Le rendement d'extraction à été calculé par rapport au poids total de la matière première, il est exprimé en pourcentage.

➤ Calcule des rendements en extraits secs :

Le rendement d'un extrait sec est déterminé en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt}(\%) = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1 : poids de la boîte pétri avec extrait brut après évaporation.

P2 : poids de la boîte pétri vide.

P3 : poids de la matière première de départ.

2.5. Dosage des polyphénols totaux

L'importance des polyphénols totaux dans les activités biologiques, nous a fait étudier le pourcentage de leur présence dans la matière première.

La teneur des composées phénoliques des extraits bruts, a été déterminée par l'utilisation d'un réactif de Folin- Ciocalteu, qui se compose d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, qui est réduit en milieu alcalin par les groupements oxydables des polyphénols, provoquant la formation de produit de réduction de couleur bleu. L'intensité de cette couleur indique la présence et la teneur des polyphénols totaux dans le mélange. Ces derniers absorbent le maximum de la lumière à 760nm, où l'intensité est proportionnelle à la concentration des composés phénoliques présent dans l'échantillon.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage d'acide gallique.

On préparer une gamme d'acide gallique avec des concentrations de 5mg/ml, 10mg/ml, 20 mg/ml, 20mg/ml, 40mg/ml, 80mg/ml.

Le milieu réactionnel de chaque extrait (CHCL₃, Hex) est préparé à partir de 0,5ml d'extrait. On ajoute 2ml de la solution Na₂CO₃ (75 mg/ml d'eau distillée) et agiter le mélange, après une agitation, 2,5ml de la solution de Folin Ciocalteu (dilué 1/10 dans l'eau distillée) est ajouté à l'ensemble, après 90min d'incubation à la température ambiante, l'absorbance est lue à 765nm contre un blanc (MeOH). Le taux de polyphénols totaux dans chaque extrait, a été calculé à partir de l'équation d'une courbe d'étalonnage, établie avec des concentrations d'acide gallique comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de chaque extrait (CHCL₃, Hex).

Le milieu réactionnel est répété deux fois pour chaque extrait.

2.6. Dosage des flavonoïdes totaux des extraits (CHCL₃, Hex)

La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux, repose sur l'oxydation des flavonoïdes par trichlorure d'aluminium (AlCl₃) qui provoque la formation d'un complexe de couleur jaune, qui absorbe la lumière à 430nm. L'intensité de couleur jaune confère le pourcentage des flavonoïdes présent dans un mélange.

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage de quercitine (2,5µg/ml-20µg/ml).

On préparer une gamme de quercitine avec des concentrations de 2,5ug/m, 1,5µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml.

Le milieu réactionnel de chaque extrait (CHCL₃, Hex) est préparé à partir de 1ml d'extrait. On ajoute 1ml de la solution de AlCl₃ (2 mg/100ml dans MeOH) et agiter le mélange, puis ajouter 1ml de blanc (MeOH). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430nm. Le taux des flavonoïdes dans chaque extrait, a été calculé à partir de l'équation d'une courbe d'étalonnage, établie avec des concentrations de la quercitine comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme de chaque extrait (CHCL₃, Hex).

2.7. Etude qualitative par CCM des extraits CHCl₃ et Hex

2.7.1. Principe de CCM

CCM est une technique analytique qui se repose sur la séparation et l'identification des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un système de solvant adapté au type de séparation recherché, et une force de rétention dans la phase stationnaire qui est un gel de silice.

2.7.2. Le choix de la phase mobile

Le choix de système de solvant est basé sur ceux qui donnent la meilleure séparation, dans cette méthode de nombreuses systèmes ont été essayées jusqu'à l'obtention d'un système donnant des taches bien séparer.

Le système choisis est un mélange de dichlorométhane, n-hexane, méthanol (7v/3v/1,5v).

2.7.3. Préparation de concentration de l'extrait

A partir d'une solution 1 de concentration 100mg/ml, on préparer une autre solution 2 de concentration 50mg/ml qui on l'utilise, après l'application de loit de dilution on prélève 0,5ml de solution 1 et le ajouté dans une eppendorf de 1ml, puis continue par 0,5ml de méthanol.

2.7.4. Révélation

La révélation s'effectue dans une chambre noire, sous une lampe à UV (ultra-violet) qui présente les couleurs de différents constituants séparés.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son rapport frontal R_f , calculé par la formule suivante :

$$R_f = d/D$$

d : la distance parcourue par la molécule.

D : la distance parcourue par la phase mobile (front du solvant).

2.8. Etude de l'activité antibactérienne

Pour tester la sensibilité des bactéries, on réalise la méthode d'antibiogramme et d'aromatogramme, qui reposent sur la diffusion des antibiotiques et des extraits de produit naturelle (en imprégnés dans des disques) sur un milieu gélosé (MH).

2.8.1. Préparation des milieux de culture

2.8.1.1. La gélose nutritive (GN)

On pèse 28g de poudre de GN et le verse dans une erlenmeyer contenant 1L d'eau distillée. À l'aide d'une plaque chauffante et agitatrice, on dissout la poudre de GN à une température 100°C pendant quelques minutes, jusqu'à ce que le mélange déborde, puis on le verse dans des flacons en verre.

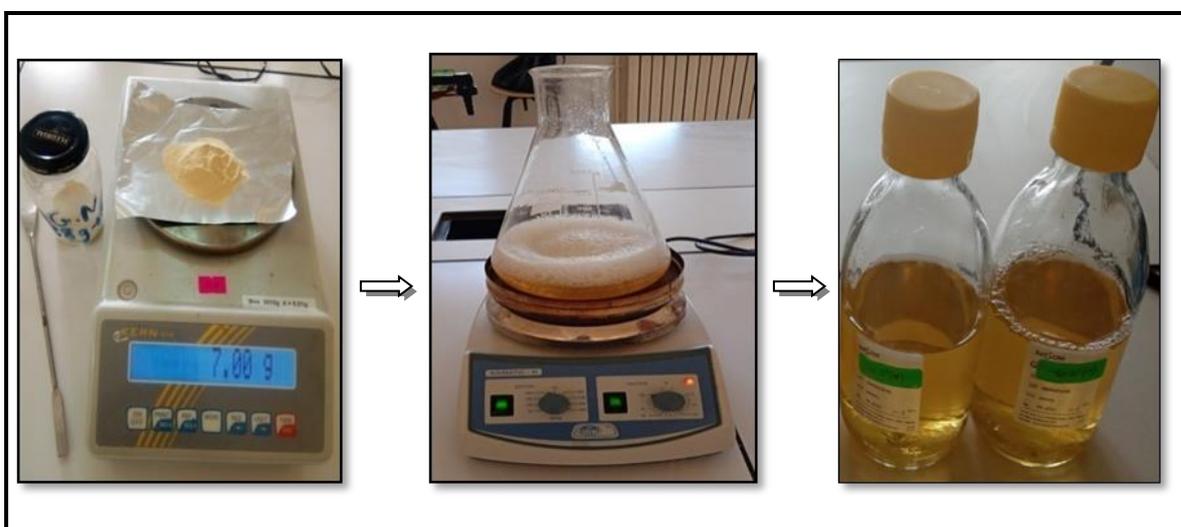


Figure N° 21: Préparation de milieu GN

2.8.1.2. La gélose Muller Hinton(MH)

Après de peser 38g de poudre de MH, on le introduit dans une erlenmeyer contient 1L d'eau distillée, le mélange obtenu est agité sur une plaque agitatrice et chauffante à une température 100°C jusqu'à leur bouillage, puis le verser dans des flacons en verre.

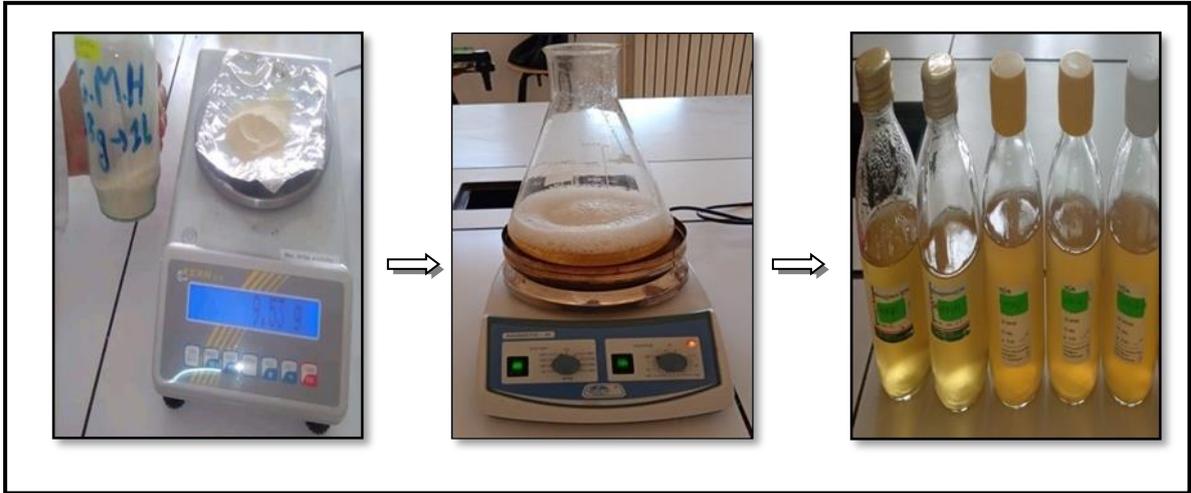


Figure N° 22: Préparation de milieu MH

2.9. Préparation d'eau physiologique

On utilise l'eau physiologique pour la préparation de suspension bactérienne.

On ajoute 0,9g de poudre de NaCl à 100ml d'eau distillée sous agitation, pendant quelques minutes jusqu'à la solubilisation de NaCl, puis 9ml de la solution est divisée dans chaque tube en verre à vesse.

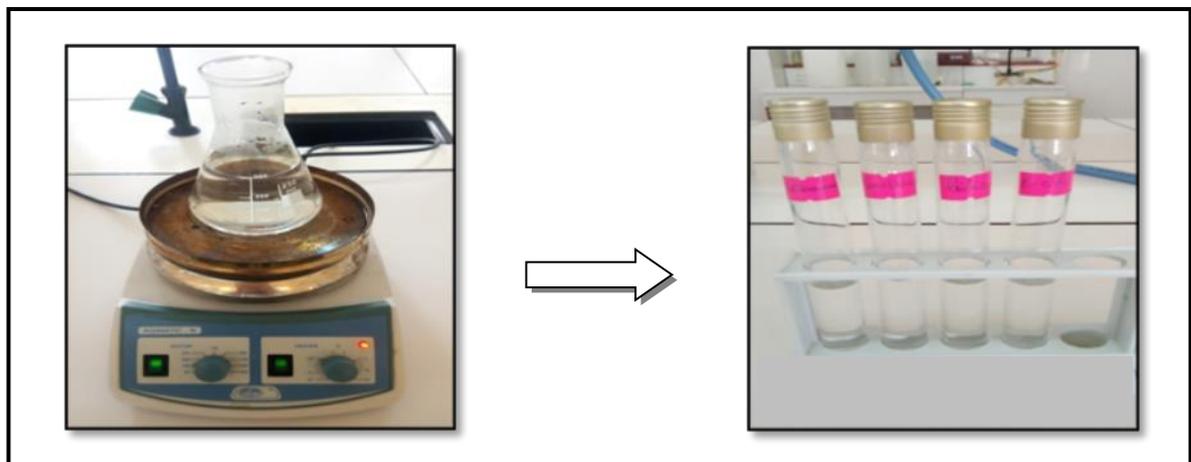


Figure N° 23: Préparation de l'eau physiologique.

2.10. Préparation des disques d'aromatogramme

On coupe une feuille de papier Wattman N °3 par un perforateur en disque de 5,5mm de diamètre.

Mettez le disque l'un sur l'autre et récupérez les 10 de ces derniers dans du papier aluminium et mettez-les dans une boîte pétri.

2.11. Stérilisation du matériel

À l'aide d'un autoclave on stérilise les milieux de culture (GN, MH), l'eau physiologique, les disques d'aromatogramme, les emboles et les ependrof (couvrir par le papier d'aluminium), à une température de 121°C pendant 15min.

2.12. Préparation des concentrations des extraits et des huiles essentielles

(20mg/ml, 100mg/ml, 10mg/ml)

On solubilise 20mg d'huile essentielle, 100mg de chaque extrait de CHCL₃ et d'extrait de n-hexane dans 1 ml de DMSO qui se trouve des 3 eppendorfs étiquetés, on agite et solubilise le tous à l'aide d'un vortex et d'un Bain Marie. Les solutions obtenues de deux concentrations (20mg/ml, 100mg/ml) sont diluées $\frac{1}{10}$ pour la préparation des autre solutions de 10mg/ml.

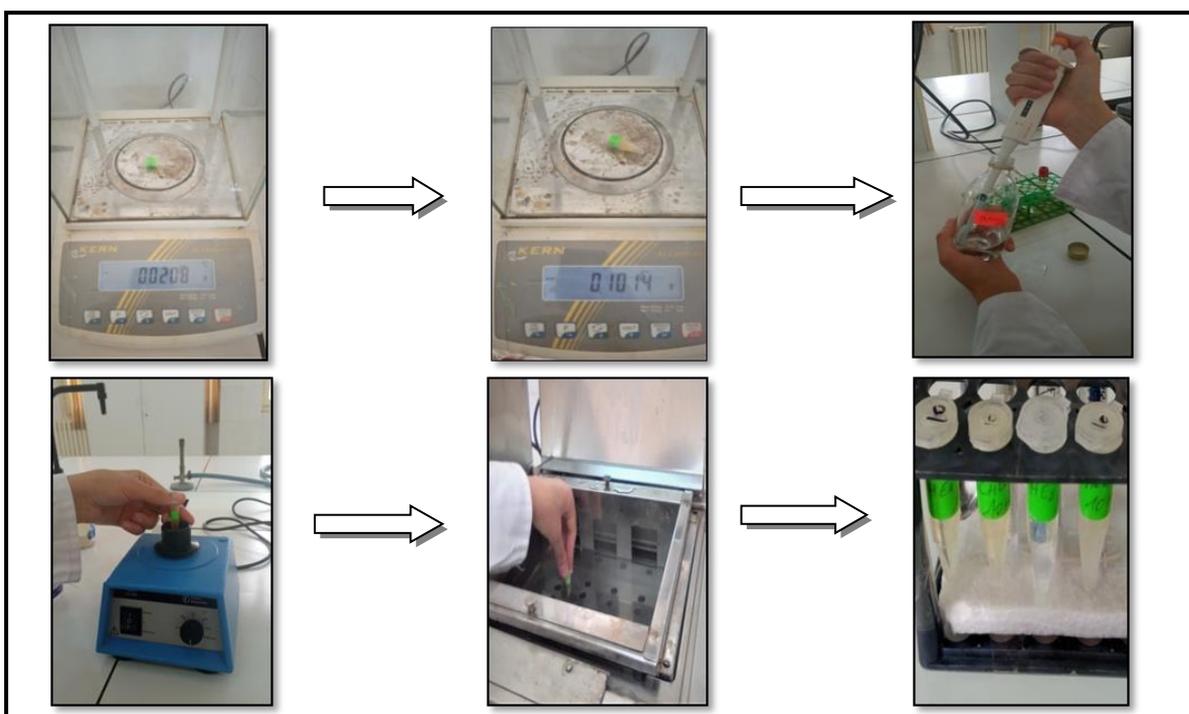


Figure N° 24: La préparation des concentrations des CHCL₃, Hex, HE.

2.13. Teste d'antibiogramme et aromatoigramme

Ce teste consiste à étudier le caractère bactéricide des antibiotiques et des extraits de produit naturel. Il dure 3 jours :

- Première jour : on réalise le repiquage.
- Deuxième jour : on s'effectue l'écouvillonnage.
- Troisième jour : on lire les résultats.

Ces trois processus sont établis à des conditions stériles, dans une zone de travail bien préparé.

Dans notre étude ce teste est Réalisé en deux étapes, dans la première, Les extraits sont testés à la concentration la plus élevé (20 mg/mL pour les HEs et 100 mg/mL pour les extraits CHCl₃ et Hex), avec deux antibiotiques pour chaque souche, et dans la deuxième fois en tester l'association antibiotique- extrait et l'association antibiotique-HE à une concentration de 10mg/ml.

2.13.1. Préparation des boites de pétri (coulage)

Après liquéfaction des milieux de culture (GN, MH) stériles, en les coulent dans des boites de pétri stériles ailleur de bec bunsen, à une épaisseur de 4mm dans tous la surface des boites, puis laisser leur séchage à une température ambiante pendant 30min.

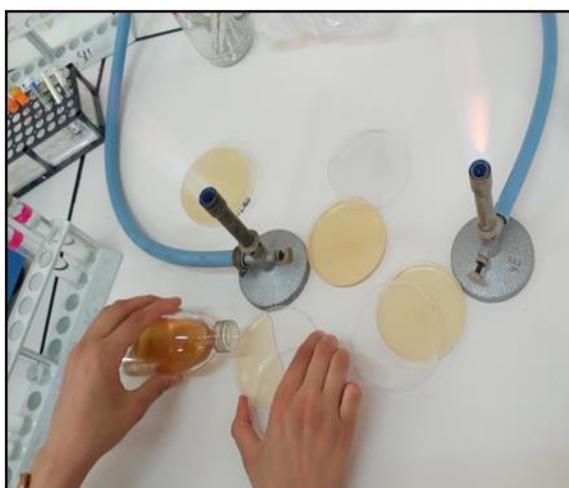


Figure N° 25: coulage des milieux de culture **Figure N° 26:** Séchage des milieux de Culture

2.13.2. Repiquage des souches bactériennes

Après la préparation d'une zone de travail stérile avec l'eau de javel, on a repiqué et ensemencé chaque souche bactérienne prélevée de gélose inclinée sur la gélose nutritive en boîte pétri ou dans des tubes gélosés inclinés et de BN, à l'aide d'une pipette pasteur, puis incubées dans l'étuve à une température 37°C pendant 18 à 24 heures. Pour obtenir des souches bactériennes jeunes.



Figure N° 27: Repiquage des souches bactériennes dans GN et BN

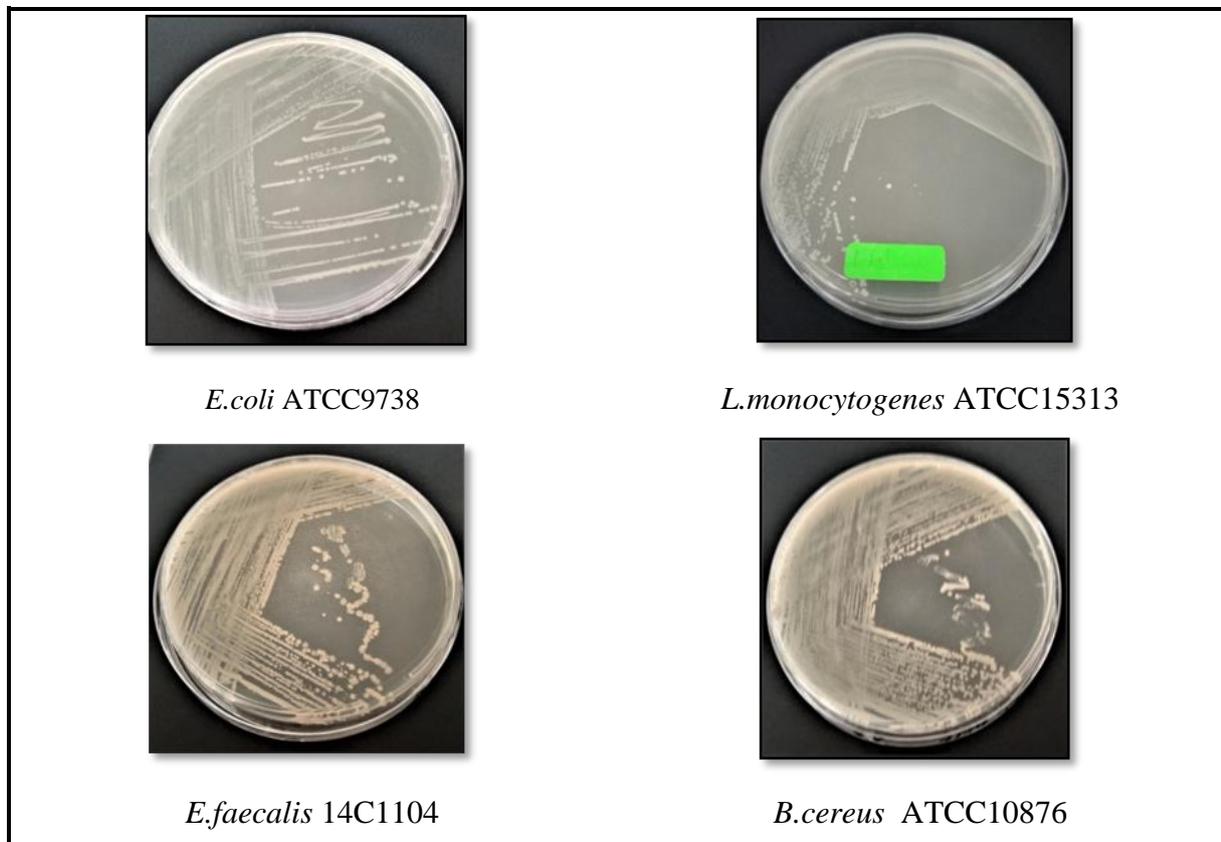


Figure N° 28: quelques souches bactériennes jeunes

2.13.3. Préparation des suspensions bactériennes

À partir des boîtes de pétri repiquées et à l'aide d'une pipette Pasteur, en prélever quelques colonies bien isolées et les transférer et décharger dans un tube d'eau physiologique stérile, puis homogénéiser à l'aide d'un vortex. On réalise cette étape pour obtenir d'une charge bactérienne de 0,5Mc Farland (10^6 UFC/ml), qui correspond à une densité optique limitée entre 0,08 et 0,1 ; lorsque on mesure l'absorbance de l'inoculum bactérienne à 625nm, par le spectrophotomètre. Si la densité mesurée est supérieure à l'intervalle mentionné, en décharger la suspension par l'ajoute d'eau physiologique, mais si la densité est le contraire, ici en charger l'inoculum par l'addition d'une autre colonie.

La préparation et l'utilisation de suspension bactérienne ne dépasse pas 15min.

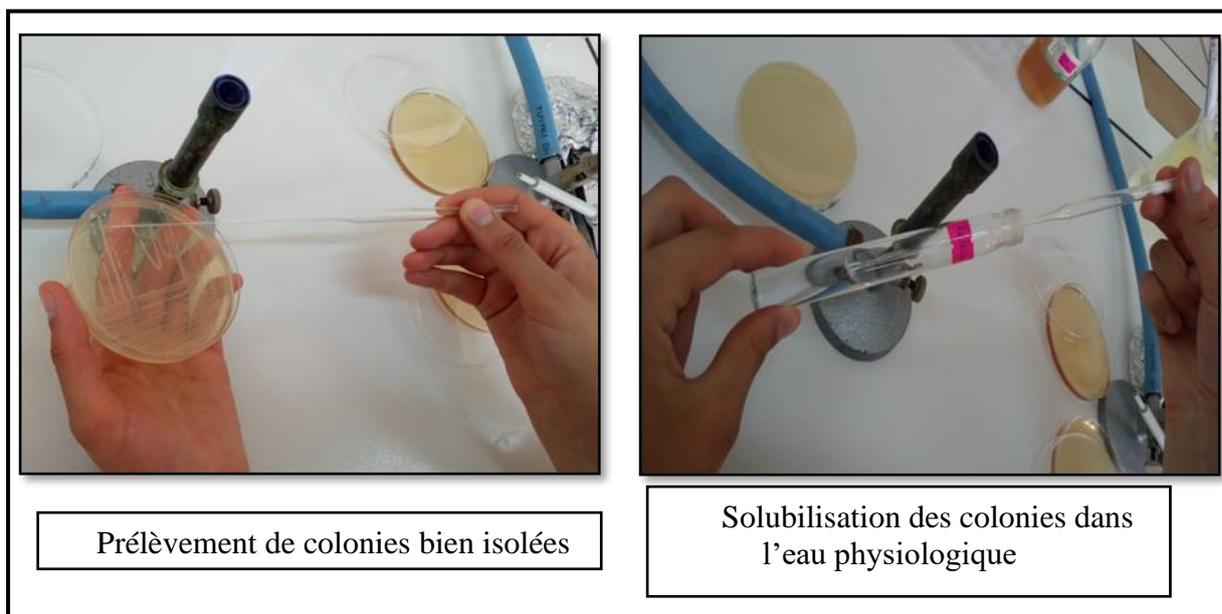


Figure N° 29: Préparation de suspension bactérienne

2.13.4. Écouvillonnage (ensemencement bactérienne)

Ensemencement bactérienne s'effectue par l'utilisation d'un écouvillon stérile qui est trempé dans l'inoculum bactérienne et l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube, puis on étale la surface gélosée (MH) de haut en bas de la boîte pétri en stries serrées et écouvillonné aussi leur bordure. L'étalement a été répété deux fois, en tournant la boîte de 60° pour assurer la distribution régulière de suspension bactérienne. Les boîtes écouvillonnées ont été fermées jusqu'à leur utilisation dans l'étape suivante.

2.13.5. Dépôt des disques et injection des extraits et d'huile essentielle

On dépose des disques stériles, vierge de 5,5mm de papier Wattman e et des disques d'antibiotique délicatement sur la surface de gélose inoculée, par une pince stérilisée en bec bunsen. Les disques vierges et quelques disques d'antibiotique sont imprégnés par 10 μ l des extraits et d'huile essentielle à l'aide d'une micropipette, mais un antibiotique reste seul pour comparer les résultats obtenus dans une même boîte pétri.

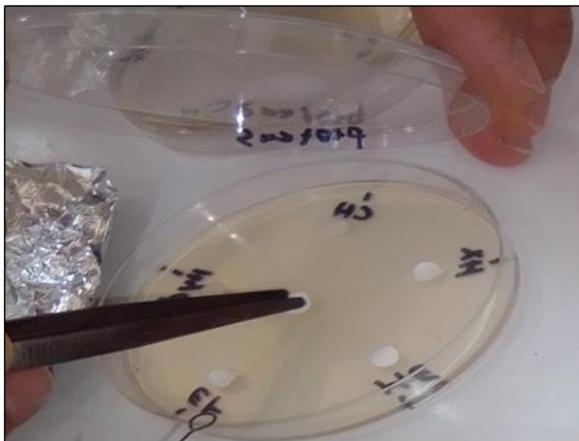


Figure N° 30: Dépôt des disques vierge
HE

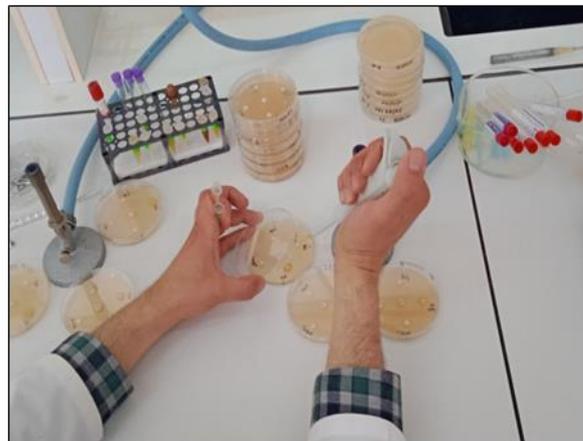


Figure N° 31: Injection des extraits,
HE

2.13.6. Incubation et lecture des résultats

On incube les boîtes de pétri dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Les résultats obtenus sont évalués par la mesure des diamètres des zones d'inhibition produites autour de chaque disque qui ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse en (mm).

L'effet des extraits et d'HE et des antibiotiques se traduit par l'apparition d'une zone transparente autour de disque correspondant à une absence de la croissance bactérienne. Le diamètre de cette zone est grande plus la souche est sensible.

La souche est résistante, si le diamètre égal à 5,5mm, la souche est sensible si le diamètre plus de 5,5mm.

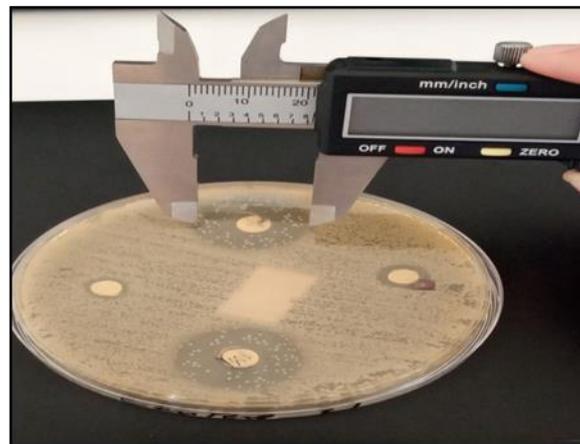


Figure N° 32: mesure le diamètre d'inhibition par le pied à coulisse

Chapitre II

Résultat et discussion

1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction a été calculé pour les deux huiles essentielles (HE1, HE2) de la propolis des deux régions de l'Est Algérien : Guelma et Mila respectivement, et pour les deux extraits bruts de CHCL₃ et de *n*-hexane de la propolis de la Wilaya de Mila. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 34**:

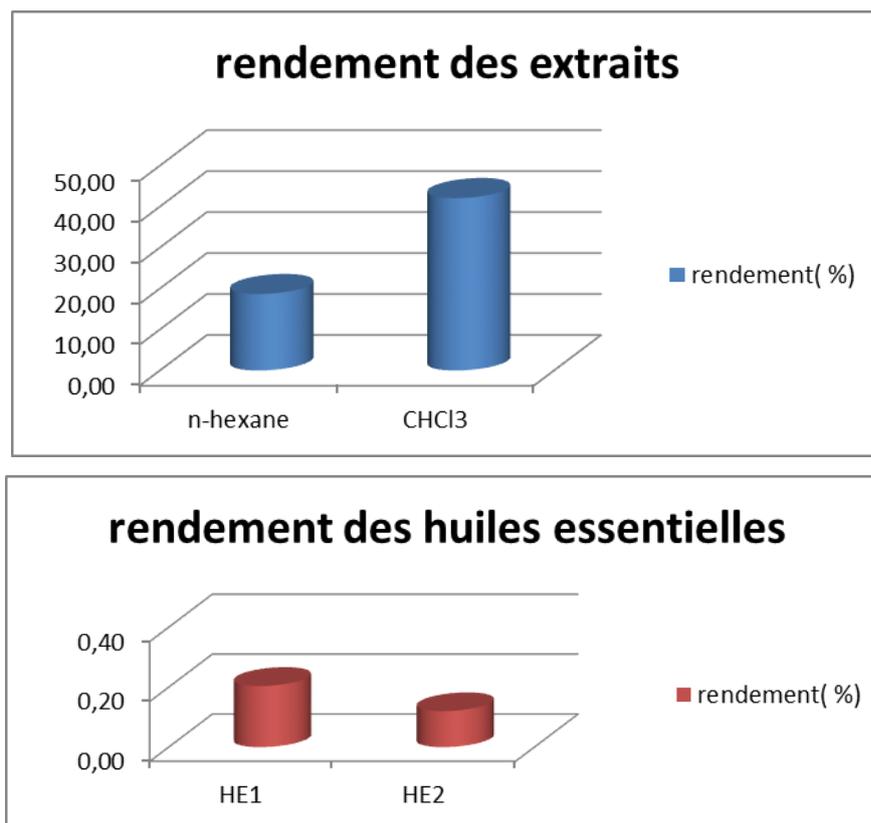


Figure N° 33: représentation graphique des rendements des HE et des extraits de la propolis.

Le rendement de chaque extrait est calculé par rapport au poids sec, initial de la propolis.

Les deux huiles essentielles de deux échantillons de la propolis extraites par hydrodistillation sont de couleur jaune claire et d'odeur agréable. Les HE sont solubles dans le DMSO et dans éther di éthylique.

Selon les résultats illustrés au-dessus, HE1 possède un grand rendement de 0,20% par rapport à l'HE2 qui présente un rendement de 0,12%. Donc la propolis de la Wilaya de

Guelma a des teneurs élevés en matière extraite (HE1) par rapport à la propolis de la Wilaya de Mila.

➤ Discussion

Les rendements de deux huiles essentielles obtenus dans notre étude sont très faible comparativement à celui rapporté par (**Simionatto et al, 2012**) qui note des rendements de 2,5%, 2,7%, 3,8% de certaine régions de Brésil tels que Santiago, San Francisco de Assis, Jaguari respectivement. Par contre ils sont élevés par rapport à (**Fernandes et al, 2015**) qui a indiquée un rendement de 0,07% de la région Cerrado biome de Brésil.

Cette différence est due à plusieurs facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, sol, climat, ect...) ou technologiques comme le mode d'extraction des huiles essentielles (**Regnault et al, 2005**).

Les deux extraits de la propolis de la Wilaya de Mila obtenues par la macération ont des couleurs différents, le marron claire pour l'extrait chloroformique et le jaune claire pour l'extrait n-hexane. Les deux extraits bruts sont moyennement solubles dans le DMSO et dans le méthanol.

Les résultats présentés ci-dessus montrent la différence de rendement des deux extraits de CHCL₃ et de n-hexane, où l'extrait de CHCL₃ représente un grand rendement de 42,08% par rapport à l'extrait n-hexane qui représente 18,66%.

D'après nos recherches dans des travaux antérieurs sur chacun des extraits de CHCL₃ et d'n-hexane de la propolis, nous trouvons qu'il n'a pas beaucoup études qui s'y rapportent. Pour cette raison, les résultats obtenus par l'extrait de CHCL₃ seront comparés avec l'extrait de DCM.

Les rendements obtenus par les deux extraits de CHCL₃ et de n-hexane dans notre étude sont faible comparativement à celui rapporté par (**Monica et al, 2020**) qui note des rendements de 62,3% pour l'extrait de DCM, de 27,3% pour l'extrait n-hexane d'une région de Brésil.

Cette différence est due à la variation des compositions chimiques de la propolis qui varie selon l'origine botanique, l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique, mais elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable (**SEGUENI, 2011**).

2. Teneurs en Polyphénols totaux

L'analyse quantitative des polyphénols totaux de chaque extrait est calculée à partir de l'équation de régression de courbe d'étalonnage, établie avec l'acide gallique (5-80 $\mu\text{g/ml}$), où cette équation est constitué de $y=0,006x-0,019$.

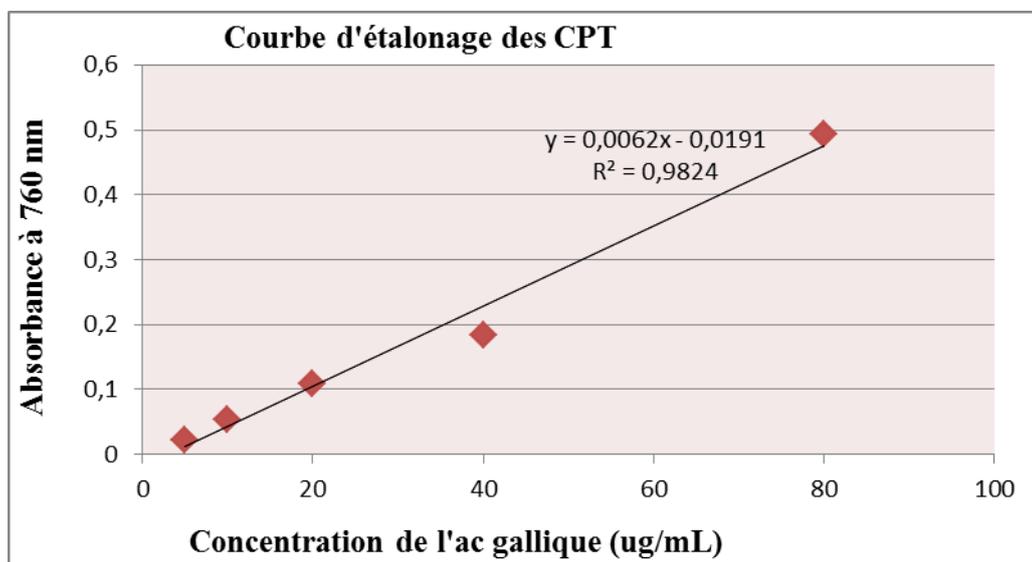


Figure N° 34: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les résultats obtenus de la teneur en polyphénols totaux, de chaque extrait brut (CHCL₃, n-hexane) sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau N° 11 : La dose des polyphénols totaux dans chaque extrait brut de la propolis.

	CHCL ₃	Hex
[C] $\mu\text{g eq d'Ac gallique/mg d'extrait}$	16,41 \pm 2,24	5,00 \pm 0,71

Les résultats de dosage représentés dans le tableau sont faibles, ils indiquent qu'il y'a une supériorité des teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de CHCL₃ (16,41 $\mu\text{g/ml}$), par rapport aux l'extrait de n-hexane (5,00 $\mu\text{g/ml}$).

➤ Discussion

D'après nos recherches dans des travaux antérieurs sur le dosage des polyphénols et des flavonoïdes des extraits de CHCL₃ et n-hexane de la propolis, nous trouvons qu'il n'a pas

beaucoup études qui s'y rapportent. Pour cette raison, les résultats obtenus par l'extrait de CHCL3 seront comparés avec autres extrait de propolis.

D'une part les résultats obtenues dans notre étude sont très faible comparativement à celui rapporté par :

Boufadi, 2014 qui note des teneurs en composés phénoliques de l'extrait d'acétate d'éthyle de propolis six régions algériennes varient de 70,26 mg EAG/gr de propolis d'Ain Ouassara à 292,95 mg EAG/gr de propolis de Tigzirt.

Hochheim et al, 2019 qui montre que l'extrait méthanolique, l'extrait brut hydroalcoolique et la fraction d'acétate d'éthyle de la propolis de Brésil contiennent des concentrations de polyphénols de $57,53 \pm 0,2 \mu\text{g EAG/mg}$, $4,87 \pm 0,2 \mu\text{g EAG/mg}$, $64,93 \pm 0,6 \mu\text{g EAG/mg}$, respectivement.

Yang et al. 2011 qui révèlent que la fraction chloroforme et la fraction acétate d'éthyle de propolis d'Anhui de la Chine contiennent des concentrations de polyphénols de $195,7 \pm 1,58 \mu\text{g EAG/mg}$, $235,6 \pm 1,78 \mu\text{g EAG/mg}$ respectivement.

D'autre part la teneur en polyphénols de l'extrait CHCL3 est supérieure à celui rapporté par :

Hochheim et al, 2019 qui montre que la fraction de dichlorométhane contient une concentration de polyphénols de $8.10 \pm 0.3 \mu\text{g EAG/mg}$.

Alors, cette variation des teneurs en polyphénols de la propolis de différentes régions dans le monde s'explique par la variation des composés chimique de la propolis qui sont contrôlées par la diversité de la flore et de la zone géographique de collecte (**Letullier et al, 2019**).

3. Teneurs en flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes de chaque extrait est calculée à partir de l'équation de régression de courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (2,5-20 $\mu\text{g/ml}$), où cette équation est constitué de $y = 0,044x - 0,097$.

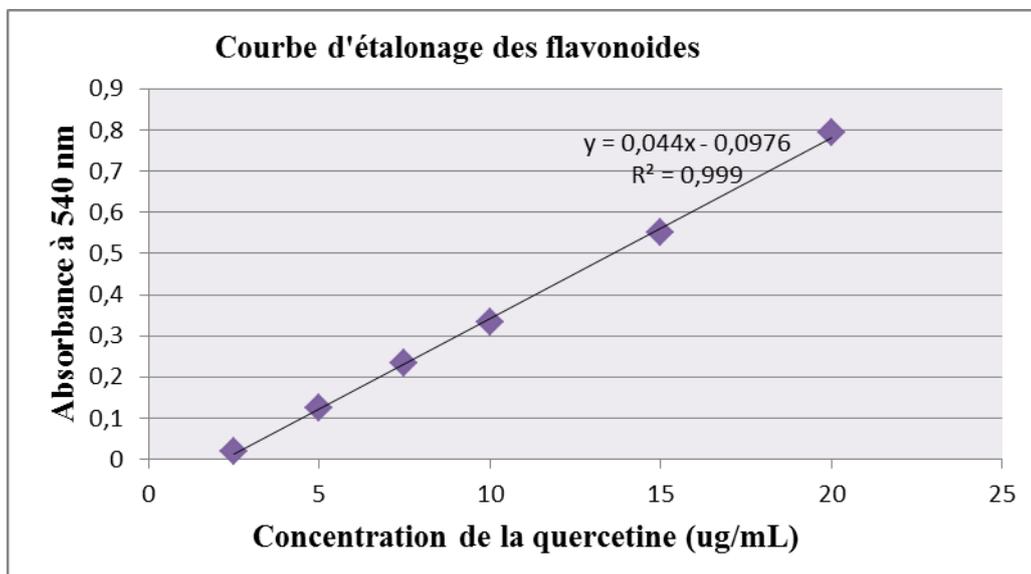


Figure N° 35: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes de chaque extrait brut (CHCl_3 , *n*-hexane) sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau N° 12 : La dose des flavonoïdes dans chaque extrait brut de la propolis.

	CHCl_3	Hex
[C] μg eq quercétine/mg d'extrait	$7,13 \pm 2,84$	$2,89 \pm 0,26$

Les résultats représentés dans le tableau sont faibles, ils indiquent qu'il y'a une supériorité des teneurs en flavonoïdes dans l'extrait de CHCl_3 ($7,13 \mu\text{g/ml}$), par rapport aux l'extrait de *n*-hexane ($2,89 \mu\text{g/ml}$).

Discussion

D'après nos recherches dans des travaux antérieurs sur le dosage des flavonoïdes et des extraits de CHCl_3 et *n*-hexane de la propolis, nous trouvons qu'il n'a pas beaucoup études qui s'y rapportent. Pour cette raison, les résultats obtenus par l'extrait de CHCl_3 seront comparés avec autres extrait de propolis.

D'une part les résultats obtenus dans notre étude sont très faibles comparativement à celui rapporté par

Yang et al. 2011 qui révèlent que la fraction chloroforme et la fraction acétate d'éthyle de propolis d'Anhui de la Chine contiennent des concentrations des flavonoïdes de $52.4 \pm 0.7 \mu\text{g EAG/mg}$, $62.1 \pm 0.7 \mu\text{g EAG/mg}$ respectivement.

Boufadi et al. 2014 qui révèlent des concentrations en flavonoïdes de l'extrait d'acétate d'éthyle de propolis de six régions algériennes varient $14,4 \pm 0,9 \text{mg EQ/g}$ à $80 \pm 1 \text{mg EQ/g}$.

Hochheim et al, 2019 qui montrent que la fraction de dichlorométhane de la propolis contient une concentration des flavonoïdes de $8,10 \pm 0,3 \text{ EAG/mg}$.

D'autre part nos résultats sont supérieurs à celui rapporté par :

Hochheim et al, 2019 qui montrent que la fraction de dichlorométhane et la fraction d'acétate d'éthyle de la propolis contiennent des concentrations des flavonoïdes de $3,99 \pm 0,4 \mu\text{g EAG/mg}$, $2,20 \pm 0,3 \mu\text{g EAG/mg}$, $4,23 \pm 0,5 \text{ EAG/mg}$ respectivement.

4. Etude qualitative par CCM des extraits CHCl₃ et HexTableau N° 13 : Composés phénoliques identifiés par CCM dans l'extrait CHCl₃

Spots	Couleurs sous l'ultra violet	R _f (cm)	Types de composé possible	Références
01	jaune-vert	0,06	Stérols Flavonoïdes	(N'guessan et al, 2011)
02	Jaune pale	0,09	Stérols	(N'guessan et al, 2011)
			Flavonols	(Markham, 1982)
			Dihydroflavonols	(Lhouel, 2005)
03	Brun	0,13	Flavonoïdes	(N'guessan et al, 2011)
			Anthocyanidine 3-glucoside. Flavonols, flavones, aures.	(Markham, 1982)
			3-OH absent ou 3-OH substitué	(Lhouel, 2005)
04	Violet	0,28	Anthracènes	(N'guessan et al, 2011)
			Flavone	(Markham, 1982)
			Flavones 5-OH et 4'-OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitue en 3 Flavones 6 ou 8-OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones	(Lhouel, 2005)
05	Noire	0,33	Flavonole 5, 6, 7 tri-OH libre Flavonole 5, 7, 8 tri-OH libre	(Lhouel, 2005)
06	Violet	0,42	Anthracènes	(N'guessan et al, 2011)
			Flavone	(Markham, 1982)
			Flavones 5-OH et 4'-OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitue en 3 Flavones 6 ou 8-OH	(Lhouel, 2005)

			Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones	
07	vert claire	0,46	Coumarines	(N'guessan et al, 2011)
			Flavonols, flavonones, aurones.	(Markham, 1982)
08	Bleu claire blanchâtre fluorescente	0,51	/ Acide phénolique Coumarine	(Markham, 1982)
			Flavones sans 5 –OH libres avec 3-OH substitué	(Lhouel, 2005)
09	Blue	0,55	Flavonoïdes Coumarines	(N'guessan et al, 2011)
			Acide phénolique Coumarine	(Markham, 1982)
			Flavones sans 5 –OH libres avec 3-OH substitué	(Lhouel, 2005)
10	Violet	0,59	Anthracènes	(N'guessan et al, 2011)
			Flavone	(Markham, 1982)
			Flavones 5-OH et 4'-OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitue en 3 Flavones 6 ou 8-OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones	(Lhouel, 2005)
11	Rouge fluorescente	0,81	Triterpènes de type oléanane et ursane. Anthracènes. Anthracènes	(N'guessan et al, 2011)
12	Violette	0,88	Anthracènes	(N'guessan et al, 2011)
			Flavone	(Markham, 1982)
			Flavones 5-OH et 4'-OH Flavones 3-OR et 5-OH, 4'-OH Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitue en 3 Flavones 6 ou 8-OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols,	(Lhouel, 2005)

			flavonones	
13	Noire	0,94	Flavonole 5, 6, 7 tri-OH libre Flavonole 5, 7, 8 tri-OH libre	(Lhouel, 2005)
14	Bleu claire fluorescente	0,99	Acide phénolique Coumarine	(Markham, 1982)
			Flavones sans 5 –OH libres avec 3-OH substitué	(Lhouel, 2005)

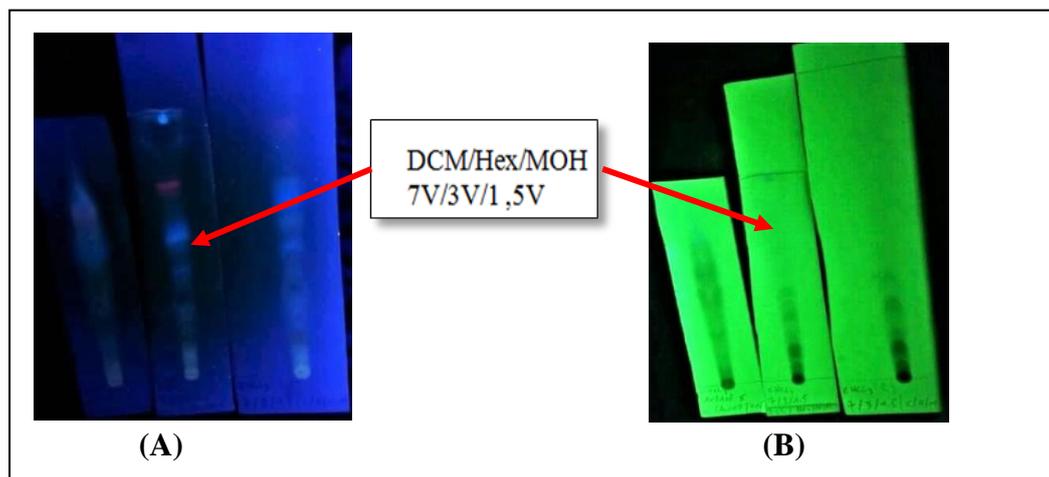


Figure N° 36: (A) : révélation des composés de l’extarit CHCL3 sous la lumière UV 365nm ; (B) : révélation des composés de l’extarit CHCL3 sous la lumière UV 254nm

Le chromatogramme obtenu comporte une série de spots avec des différents couleurs et différents rapports frontaux aux des polarités croissantes, l’identification des composé était basée sur les couleurs visualisées sous la lampe UV des taches apparues sur la plaque CCM avec ceux de la littérature.

Sur la base des résultats présentés dans le tableau ci-dessus, on a remarqué que la majorité des constituants de l’extrait CHCL3 de la propolis de Mila sont des flavonoïdes tel que flavanols, flavanones, et isoflavones, par contre les coumarines, acides phénoliques, stéroïdes, terpènes qui ont été identifiées par certains couleurs des spots.

➤ Discussion

Il n'ya pas de résultats antérieurs sur la séparation des composées de l'extrait de CHCL3 par la méthode de CCM, et pour cela nous pouvons comparer nos résultats avec les résultats du chercheur (C.E.A.Botteon et al, 2021),qui a été mené sur un fraction de DCM afin de séparer ses composants à l'aide de la technique HPLC, qui a révélé l'existence de chacun de liquiritigénine (flavanone), formononétine, vestitol, néovestol, medicarpin, 7-0-méthylvestol, guttiférone E, oblongifoline B(coumarines).

5. Etude de l'activité antibactérienne

Au début, on a étudié l'évaluation de l'efficacité de l'HE de la propolis de Guelma (HE1) à des concentrations 20mg/ml et 10mg/ml et des extraits bruts de CHCL3 et de n-hexane aux deux concentrations 100ml/mg, 10ml/mg de propolis de la Wilaya de Mila, et l'effet des antibiotiques contre les souches testées. Ensuite, l'effet de tous les extraits en association avec les antibiotique, afin d'étudier leurs synergie sur des souches bactériennes présentant une résistance intermédiaire.

Le DMSO est un meilleur solvant organique qui solubilise les HE et les deux extraits de CHCL3 et de n-hexane. Il est inactif vis-à-vis toutes les souches utilisées.

5.1. Les huiles essentielles

Les résultats obtenues, montrent que l'HE1 et l'HE2 aux deux concentrations successivement 20mg/ml et 10mg/ml pour chacun exerçaient un effet antibactérienne contre les souches bactériennes testées, avec des diamètres d'inhibition entre 6mm et 11,20mm à l'exception des souches *Proteus mirabilis* ATCC35659, *Micrococcus luteus* TCC4698 qui sont résistantes à l'HE1 à la concentration 20mg/ml et *Listeria monocytogenes* ATCC15313 qui résiste les deux HE1 et HE2 à la concentration 10mg/ml.

Les résultats de l'activité antibactérienne de HE1 à une concentration de 10mg/ml et de différents types des antibiotiques sont exprimés par le diamètre de zone d'inhibition en millimètre (mm) et illustrés dans le tableau N°14 et dans la figure N°38 suivants :

Tableau N°14 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) d'HE1 (20mg /ml, 10mg/ml), des différentes antibiotiques utilisées pour chaque souche bactérienne.

Souches testées		Diamètre d'inhibition (mm)							
		HE 1		Antibiotiques (ATB)					
		20mg/ml	10mg/ml	IPM10	AK30	CZ30	C30	GEN10	AMP10
GRAM (-)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	NI	7,5±0,71	21,5±0,71	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>E-coli</i> ATCC9738	6±0	6±0,00	22,5±0,71	NT	NT	NT	22,5±2,12	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	8,75±0,35	9,5±0,71	NT	21,5±0,71	NT	NT	24±0	NT
GRAM (+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	6,75±1,06	6,5±0,71	NT	NT	7±0	NT	19±0	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	8,5±0,71	7,5±0,71	NT	NT	25±0	NT	NT	16,5±0,71
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	NI	7±1,41	NT	NT	NT	40,5±0,71	NT	50,5±0,71
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	7±0	8,25±1,06	NT	NT	NT	22±0	NT	NI

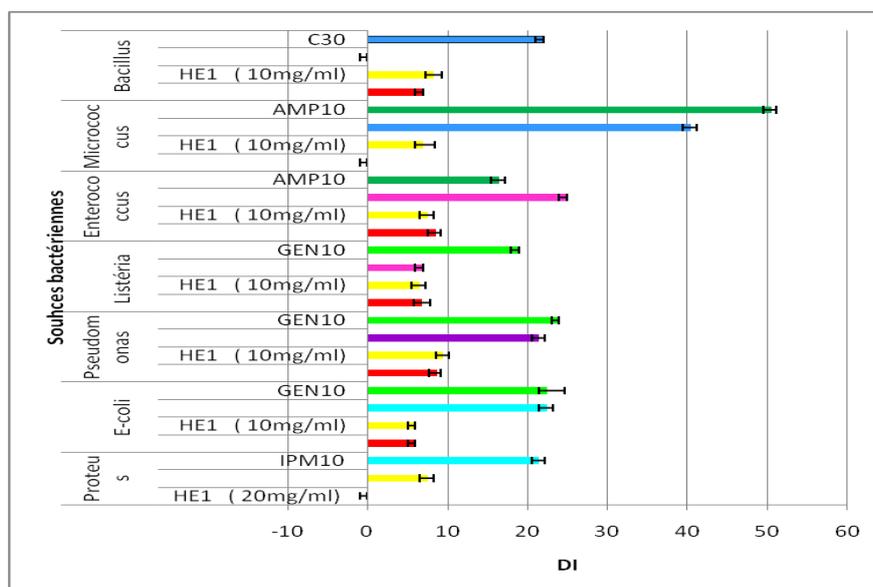


Figure N° 37: Histogramme des les diamètres d'inhibition des deux concentrations d'HE1 et des antibiotiques.

L'activité antibactérienne d'HE1 qui en résulte, montrent que toutes les souches bactériennes sont sensible aux deux concentrations, qui présentent des diamètres d'inhibition proches et >5,5mm, à l'exception de certaines souches (*Proteus Mirabilis* ATCC35659, *Micrococcus Luteus* ATCC4698) résistantes à la concentration 20mg/ml d'HE1.

Les résultats de l'activité antibactérienne de HE1 et HE2 à une concentration 10 mg/ml sont illustrés dans le tableau N°15 et dans la figure N° 39 suivants :

Tableau N°15 : Diamètres d'inhibition de l'HE1 et l'HE2 à la concentration 10mg/ml, exprimés en mm.

DI		Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm)				
		Extraits (10mg/mL)		ATB		
Souche bactérienne		HE1	HE2	AMP	CZ30	GEN10
GRAM (+)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC1104	11,07±0,33	10,91±0,50	21,44±5,45	NT	NT
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	9,75±0,27	11,20±0,07	19,27±0,87	NT	NT
	<i>Listéria monocytogenes</i> ATCC15313	NI	NI	NT	NI	NT
GRAM (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC9738	9,025±0,18	9,06±0,81	NT	NT	20,93±4,93

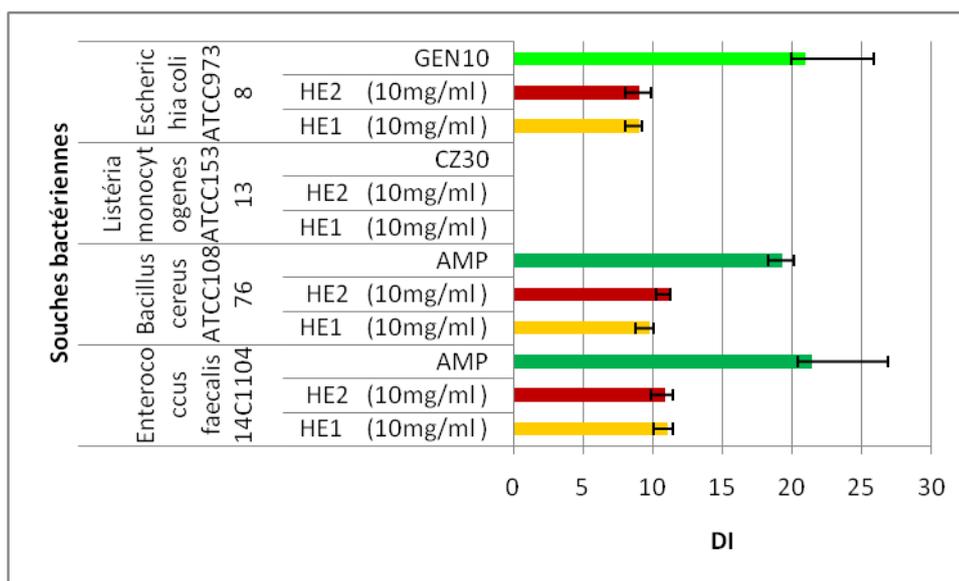


Figure N° 38: Histogramme des diamètres d'inhibition de chaque HE1, HE2 à une concentration de 10mg/ml.

D'après les résultats au dessus on remarque que les HE1 et les HE2, ont un pouvoir antibactérien important contre toutes les souches testées, à des diamètres d'inhibition différents, sauf *Listéria monocytogenes ATCC15313* qui les résiste. HE2 appliqué contre les deux souches bactériennes de *Bacillus cereus ATCC10876*, *Escherichia coli ATCC9738* présente des diamètres d'inhibition (11,20mm 9,06mm respectivement) supérieurs au diamètre d'inhibition d'HE1 (9,75mm 9,025mm respectivement) de ces deux

souches respectivement, par contre l'HE2 testé sur l'*Enterococcus faecalis* 14C1104 possède un diamètre d'inhibition (10,91mm) inférieur de l'HE1 (11,07mm).

HE1 appliquée contre *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738, ont donné des diamètres des zones d'inhibition (11,07mm 9,75mm 9,025mm respectivement) inférieur à celles résultant de l'effet d'AMP₁₀ (21,44mm), d'AMP₁₀ (19,27mm) et de GEN₁₀(20,93) contre ces trois bactéries respectivement. Les trois diamètres d'inhibition de ces derniers antibiotiques sont supérieurs aux diamètres d'inhibition résultant de l'effet de HE2 (10,91mm 11,20mm 9,06mm) contre les souches susmentionnées respectivement.

5.2. Extraits CHCL3 et n-hexane

Les résultats obtenues, montrent que les extraits de CHCL3 et de n-hexane aux deux concentrations de 100mg/ml et 10mg/ml exerçaient un effet antibactérien important contre la majorité des bactéries à Gram(+) et à Gram(-) testées, avec des diamètres des zones d'inhibition différents, qui sont entre 7mm et 11,06 pour n-hexane, entre 7mm et 13,26mm pour CHCL3.

Tableau N°16 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de CHCL3, n-Hex à une concentration 100mg/ml et des antibiotiques.

DI		Diamètre d'inhibition (mm)					
		Extrait		Antibiotique (ATB)			
Souche		CHCL3 100mg/ml	Hex 100mg/ml	IPM10	AK30	CZ30	C30
GRAM (-)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	NI	NI	21,5±0,71	NT	NT	NT
	<i>E-coli</i> ATCC9738	7±1,41	7±0	22,5±0,71	NT	NT	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	NI	8,5±0,71	NT	21,5±0,71	NT	NT
GRAM (+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	NI	NI	NT	NT	7±0	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	9,5±0,71	8,5±0,71	NT	NT	25±0	NT
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	9,5±0,71	9±1,41	NT	NT	NT	40,5±0,71
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	9±0	8,75±0,35	NT	NT	NT	22±0

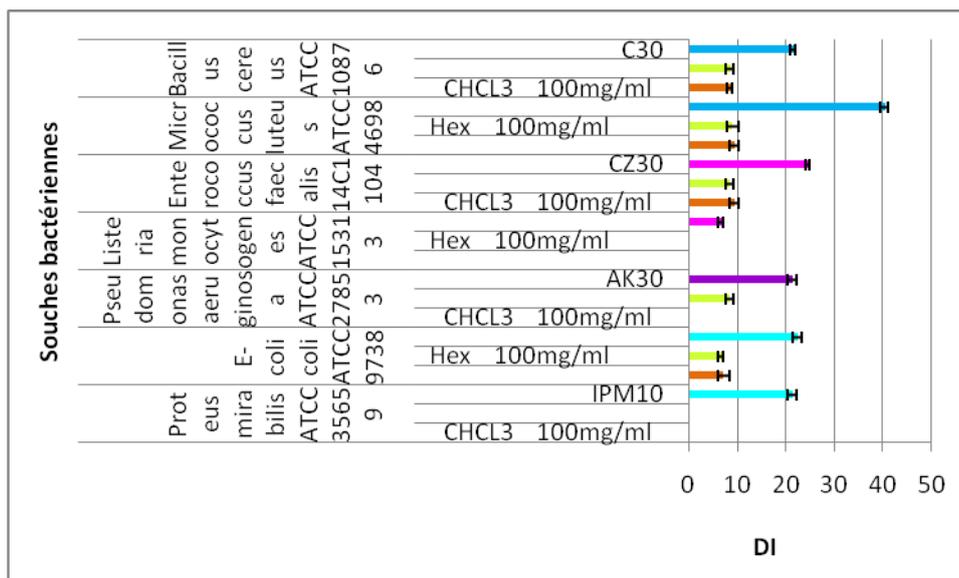


Figure N° 39: Histogrammes de l'effet antibactérien de CHCL3 et n-hexane à une concentration de 100 mg/ml

CHCL3 appliqué contre les trois souches bactériennes de l'*Enterococcus faecalis* 14C1104, *Micrococcus luteus* ATCC4698, *Bacillus cereus* ATCC10876, présente des diamètres d'inhibition (9,5mm 9,5mm 9mm respectivement) supérieurs au diamètre d'inhibition de n-hexane (8,5mm 9mm 8,75mm respectivement) de ces trois souches respectivement, par contre le n-hexane testé sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 possède un diamètre d'inhibition de 8,5mm par rapport à CHCL3 qui n'a exercé aucune activité contre cette souche. Ces deux extraits sont inactifs contre *Proteus mirabilis* ATCC35659, *Listeria monocytogenes* ATCC15313.

Tableau N°17 : Diamètres des zones d'inhibition des extraits de CHCL3, n-hexane à une concentration 10mg/ml et des antibiotique.

DI		Diamètre d'inhibition (mm)				
		Extrait		Antibiotique (ATB)		
Souche		CHCL3 10mg/ml	Hex 10mg/ml	IPM10	GEN10	AMP10
GRAM (-)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	9±0	7±0	21,5±0,71	NT	NT
	<i>E-coli</i> ATCC9738	NI	NI	22,5±0,71	22,5±2,13	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	8,5±0,71	8±1,41	NT	24±0	NT
GRAM (+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	7±0	NI	NT	19±0	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	8,5±0,71	8±0	NT	NT	16,5±0,71
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	7±0	8±0	NT	NT	50,5±0,71
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	7,5±0,71	7,25±0,35	NT	NT	NI

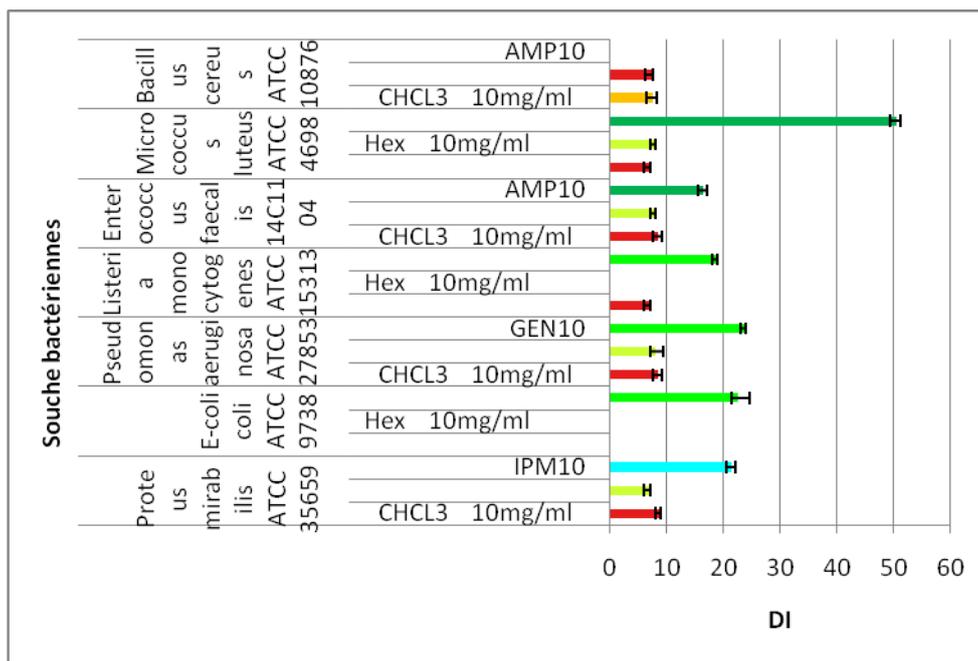


Figure N° 40: Histogrammes de l'effet antibactérien de CHCL3 et n-hexane à une concentration de 10 mg/ml

CHCL3 appliqué contre les quartes souches bactériennes de *Proteus mirabilis* ATCC35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, l'*Enterococcus faecalis* 14C1104, , *Bacillus cereus* ATCC10876, présente des diamètres d'inhibition (9mm 8,5mm 8,5mm 7,5mm respectivement) supérieurs au diamètre d'inhibition de n-hexane (7mm 8mm 8mm 7,25mm respectivement) de ces trois souches respectivement, par contre le CHCL3 testé sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 possède un diamètre d'inhibition de 7mm inférieur à diamètre d'inhibition de n-hexane (8mm). Ces deux extraits sont inactifs contre E-coli coli ATCC9738.

Tableau N°18 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) de CHCL3 (100mg /ml, 10mg/ml), testées pour chaque souche bactérienne.

DI		Diamètre d'inhibition (mm)							
		Extrait		Antibiotique (ATB)					
Souche		CHCL3 100mg/ml	CHCL3 10mg/ml	IPM10	AK30	CZ30	C30	GEN10	AMP10
GRAM (-)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	NI	9±0	21,5±0,71	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>E-coli</i> ATCC9738	7±1,41	NI	22,5±0,71	NT	NT	NT	22,5±2,13	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	NI	8,5±0,71	NT	21,5±0,71	NT	NT	24±0	NT
GRAM (+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	NI	7±0	NT	NT	7±0	NT	19±0	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	9,5±0,71	8,5±0,71	NT	NT	25±0	NT	NT	16,5±0,71
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	9,5±0,71	7±0	NT	NT	NT	40,5±0,71	NT	50,5±0,71
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	9±0	7,5±0,71	NT	NT	NT	22±0	NT	NI

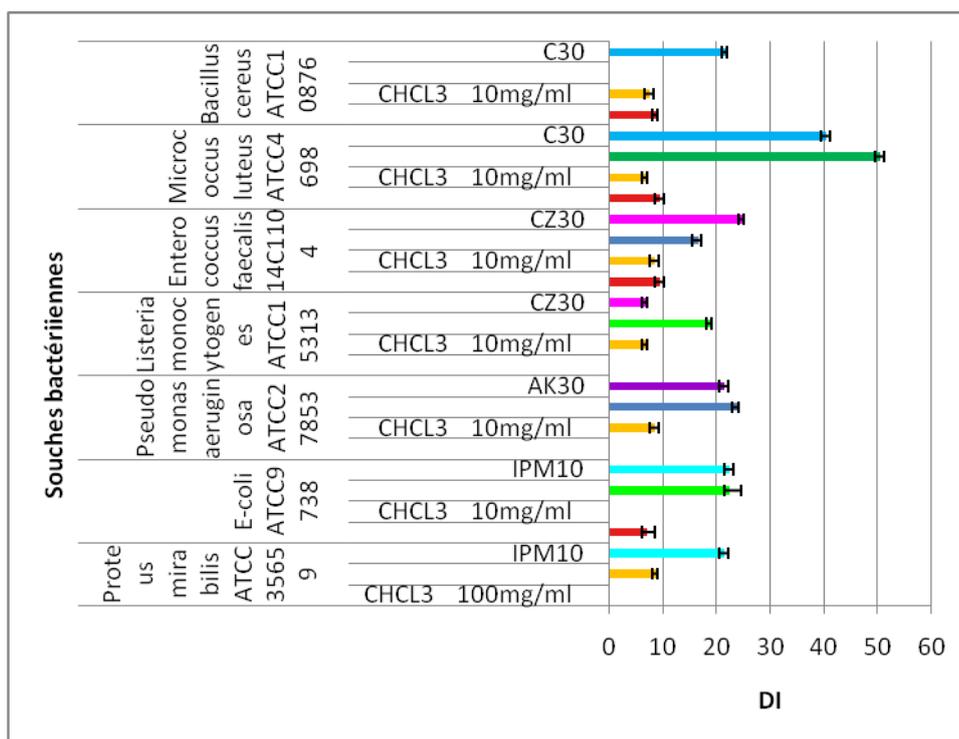


Figure N° 41: les Histogrammes des les diamètres d'inhibition des deux concentrations de CHCL3 et des antibiotiques.

L'extrait de CHCL3 à la concentration 10mg/ml qui a exercé présente un effet antibactérienne contre la majorité des souches utilisées : *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Listéria*, avec des diamètres d'inhibition de 9mm,

8,5mm, 8,5mm, 7,5mm, 7mm, 7mm respectivement à l'exception d'*E-coli* qui résiste cette concentration, par contre la concentration 100mg/ml ne montre pas une activité antibactérienne avec *Proteus*, *Pseudomonas*, *Listéria*, mais elle l'affiche avec *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *E-coli* par des zones d'inhibitions de diamètre de 8,5mm, 9,5mm, 9,5mm, 9mm, 9mm respectivement.

Tableau N°19 : les diamètres des zones d'inhibition (mm) de n-hexane (100mg /ml, 10mg/ml), testées pour chaque souche bactérienne.

DI		Diamètre d'inhibition (mm)							
		Extrait		Antibiotique (ATB)					
Souche		Hex 100mg/ml	Hex 10mg/ml	IPM10	GEN1 0	AMP1 0	C30	GEN1 0	AMP1 0
GRAM (-)	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC35659	NI	7±0	21,5±0,71	NT	NT	NT	NT	NT
	<i>E-coli</i> ATCC9738	7±0	NI	NT	22,5±2,12	NT	NT	22,5±2,13	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	8,5±0,71	8±1,41	NT	24±0	NT	NT	24±0	NT
GRAM (+)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	NI	NI	NT	19±0	NT	NT	19±0	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	8,5±0,71	8±0	NT	NT	16,5±0,71	NT	NT	16,5±0,71
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698	9±1,41	8±0	NT	NT	50,5±0,71	40,5±0,71	NT	50,5±0,71
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	8,75±0,35	7,25±0,35	NT	NT	NI	22±0	NT	NI

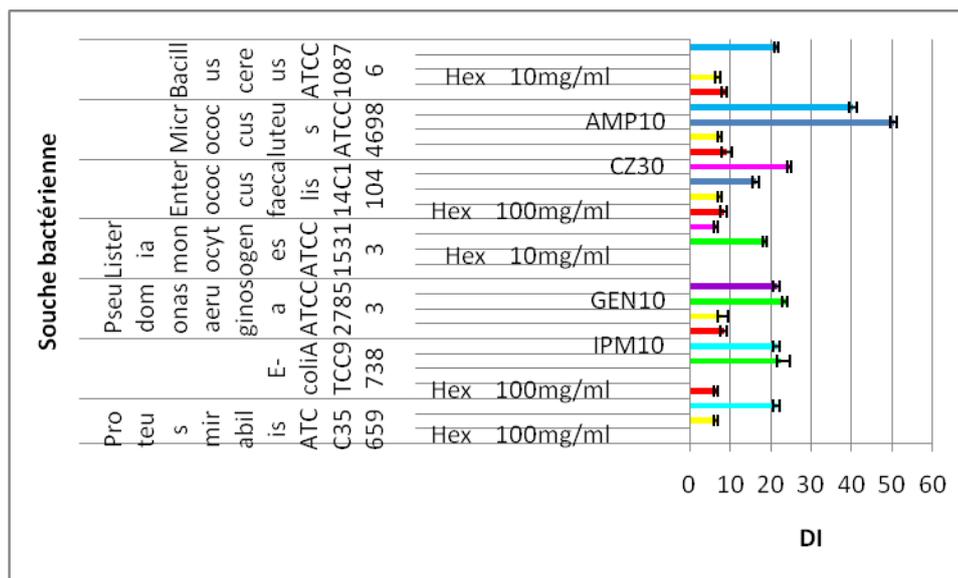


Figure N° 42: les Histogrammes des les diamètres d'inhibition des deux concentrations de n-hexane et des antibiotiques.

Les résultats obtenus, montrent que les concentrations de n-hexane présentent une activité antibactérienne pour la plupart des souches testées à l'exception de listéria et de proteus pour la concentration 100mg/ml et de E-coli pour la concentration 10mg/ml.

La concentration 100mg/ml présente des diamètres d'inhibition de 8,5mm, 8,5mm, 9mm, 8,75mm supérieurs aux diamètres d'inhibition présentés de 8mm, 8mm, 8mm, 7,25 obtenus par la concentration 10mg/ml contre Pseudomonas, Enterococcus, Micrococcus, Bacillus respectivement.

Les résultats de test d'antibiogramme obtenus, montrent que la majorité des antibiotiques utilisés ont été exercés un effet antibactérien important, contre toutes les bactéries testées avec un diamètre d'inhibition >6mm, à l'exception d'AMP₁₀ qui ne présente aucune diffusion sur le tapis bactérien gélosé de Bacillus cereus ATCC10876.

Les trois ATB de GEN, IPM et AK testés sur E-coli 9738 et P.aeruginosa 27853 présentent des effets antibactériens, contre chaque souche de ces dernières avec des diamètres d'inhibition très proches et égale 22,5mm pour GEN et IPM appliqués sur E-coli 9738, égale 24mm pour GEN et 21,5mm pour AK appliqués sur P.aeruginosa 27853. Le CZ₃₀ présente une activité très faible contre Listéria monocytogenes ATCC15313 par rapport à la GEN avec des diamètres d'inhibition de 7mm et 19mm respectivement, par contre l'AMP présente une activité très importante contre Micrococcus Luteus ATCC4698 par

rapport à C₃₀ avec des diamètres d'inhibitions de 50,5mm et de 40,5mm. Le diamètre d'inhibition d'AMP (16,5mm) est inférieur de CZ₃₀ (25mm) pour l'*Enterococcus Faecalis* 14C1104.

5.3. Association HE/ATB

Les huiles essentielles et les antibiotiques ont exercé un effet antibactérien important, cet effet sera augmenté ou diminué par l'association HE/ATB comme il montre dans le tableau et la figure suivant :

Tableau N°20 : Diamètres d'inhibition de l'association HE/ATB

DI		Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm)						
Souche bactérienne		Extraits (10mg/mL)		ATB			Association HE-ATB	
		HE1	HE2	AMP	CZ30	GEN10	ATB-HE1	ATB-HE2
GRAM (+)	<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	11,07±0,33	10,91±0,50	21,44±5,45	NT	NT	25,68±0,12	17,86±0,01
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	9,75±0,27	11,20±0,07	19,27±0,87	NT	NT	20,84±0,01	20,31±0,29
	<i>Listéria monocytogenes</i> ATCC15313	NI	NI	NT	NI	NT	NI	NI
GRAM (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC9738	9,025±0,18	9,06±0,81	NT	NT	20,93±4,93	25,03±0,88	18,66±0,01

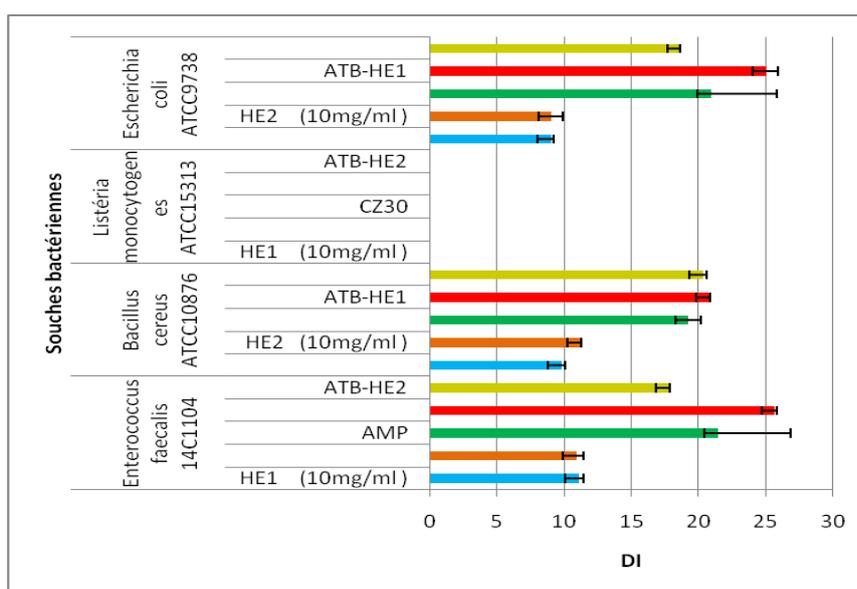


Figure N° 43: Histogrammes des diamètres d'inhibition de l'association HE/ATB

Concernant l'efficacité de l'association HE/ATB, on observe que l'HE2 n'a pas amélioré le pouvoir antibactérien des ATB testés sur *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738, mais a plutôt réduit son effet, par contre l'HE1 augmente les effets des ATB utilisées pour ces dernières souches sauf *Enterococcus faecalis* 14C1104.

On remarque les diamètres des zones d'inhibition (17,86mm 20,31mm 18,66mm respectivement) d'HE2 associée au ABT testé sur *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738 sont inférieurs aux diamètres d'inhibition d'HE1 associée aux ATB (25,86mm 20,84mm 25,03mm) contre ces trois souches respectivement.

5.4. Association extrait/ATB

Les résultats d'activité antibactérienne sont exprimés par le diamètre de zone d'inhibition en millimètre (mm) et illustrés dans le tableau N°20 et dans la figure N°45 suivants :

Tableau N°21 : Diamètres d'inhibition de CHCL3 (10mg/ml), n-hexane (10mg/ml), les ATB et de l'association ATB-CHCL, ATB-Hex (synergie) exprimés en mm.

Souches	Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne (mm)						
	Extraits (10mg/mL)		ATB			Association Extrait-ATB	
	Hex	CHCL3	AMP	CZ30	GEN10	ATB-Hex	ATB-CHCL3
<i>Enterococcus faecalis</i> 14C1104	11,06±0,23	11,75±1,06	21,44±5,45	NT	NT	18,47	24,75±0,71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	10,58±0,66	13,26±0,34	19,27±0,87	NT	NT	21,06	20,68±0,16
<i>Listéria monocytogenes</i> ATCC15313	10,58±0,67	NI	NT	NI	NT	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> ATCC9738	10,58±0,68	8,21±0,01	NT	NT	20,93±4,93	18,97±0,42	25,51±0,70

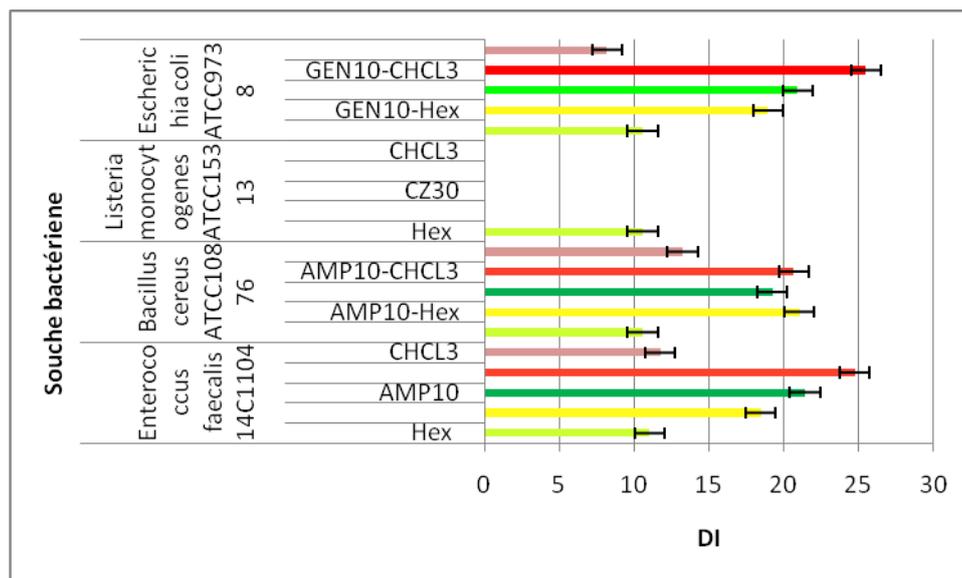


Figure N° 44: Diagrammes représentent les diamètres d'inhibition de CHCL3 (10mg/ml), n-hexane (10mg/ml), les ATB et de l'association ATB-CHCL, ATB-Hex (synergie) exprimés en mm.

Concernant l'efficacité des extraits sur l'ATB, on observe que l'extrait de CHCL3 augmente les effets des antibiotiques testés sur, *Bacillus cereus* ATCC10876, *l'Enterococcus faecalis* 14C1104, *Escherichia coli* ATCC9738 par contre l'extrait n-hexane n'augmente pas les activités des antibiotiques utilisées pour ces deux dernières souches et aussi pour la souche de *Listéria monocytogenes* ATCC15313, mais a plutôt réduit ses effets, par rapport à AMP₁₀ qui présente une amélioration d'effet par cet extrait contre *Bacillus cereus* ATCC10876

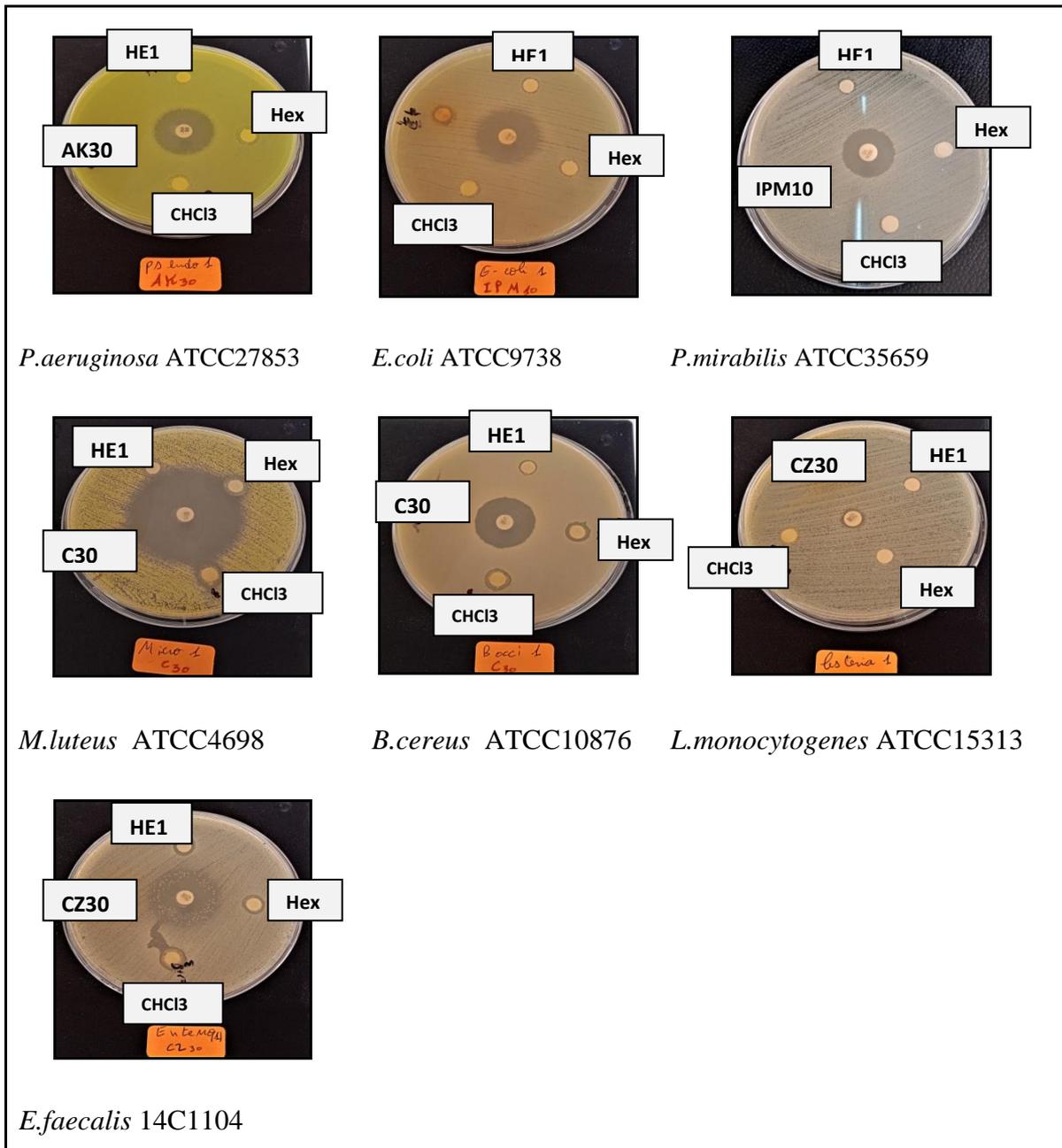


Figure N° 45: Zones d'inhibition des quelques souches bactériennes testées par HE1 (20mg/ml), les extraits de CHCL3 et n-hexane (100mg/ml)

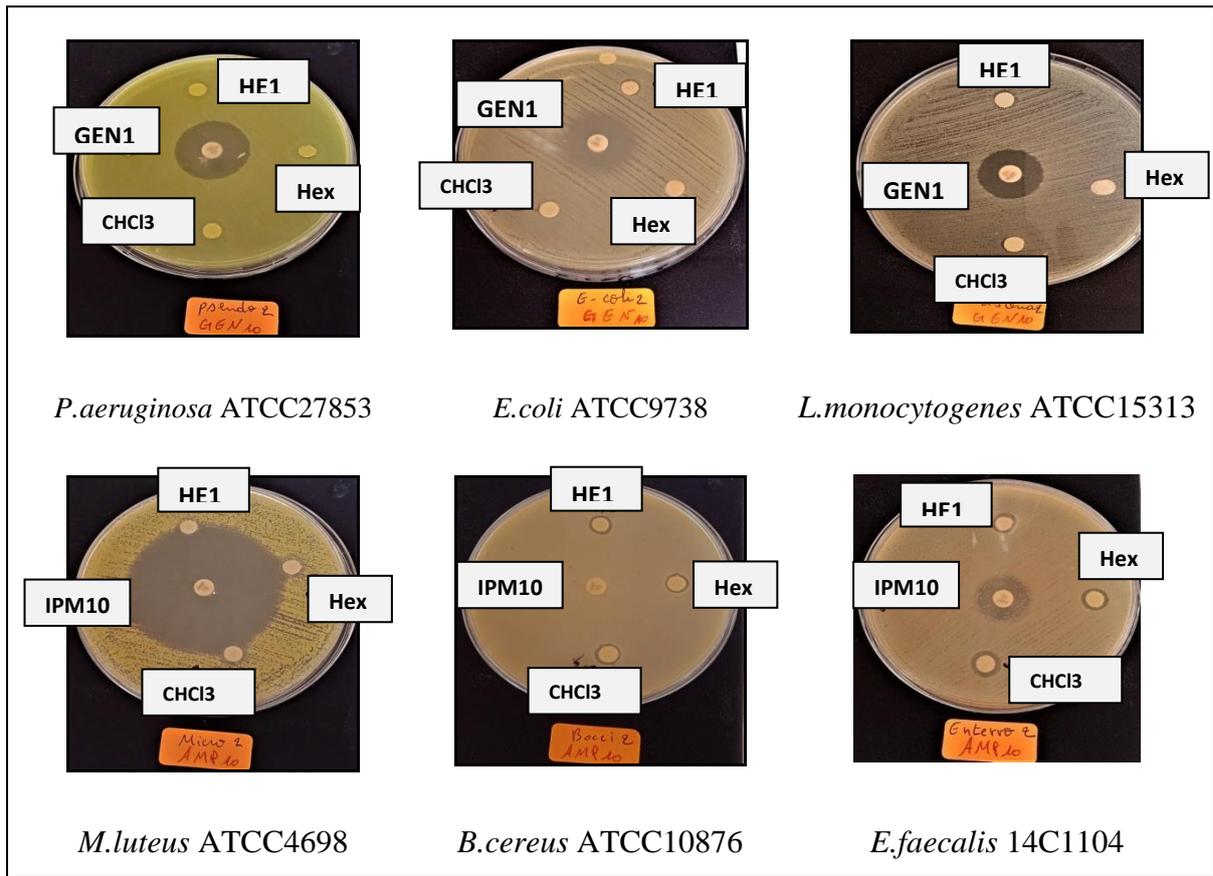


Figure N° 46: Zones d’inhibition des quelques souches bactériennes testés par HE1, les extraits de CHCL3 et n-hexane à une concentration de 10mg/ml

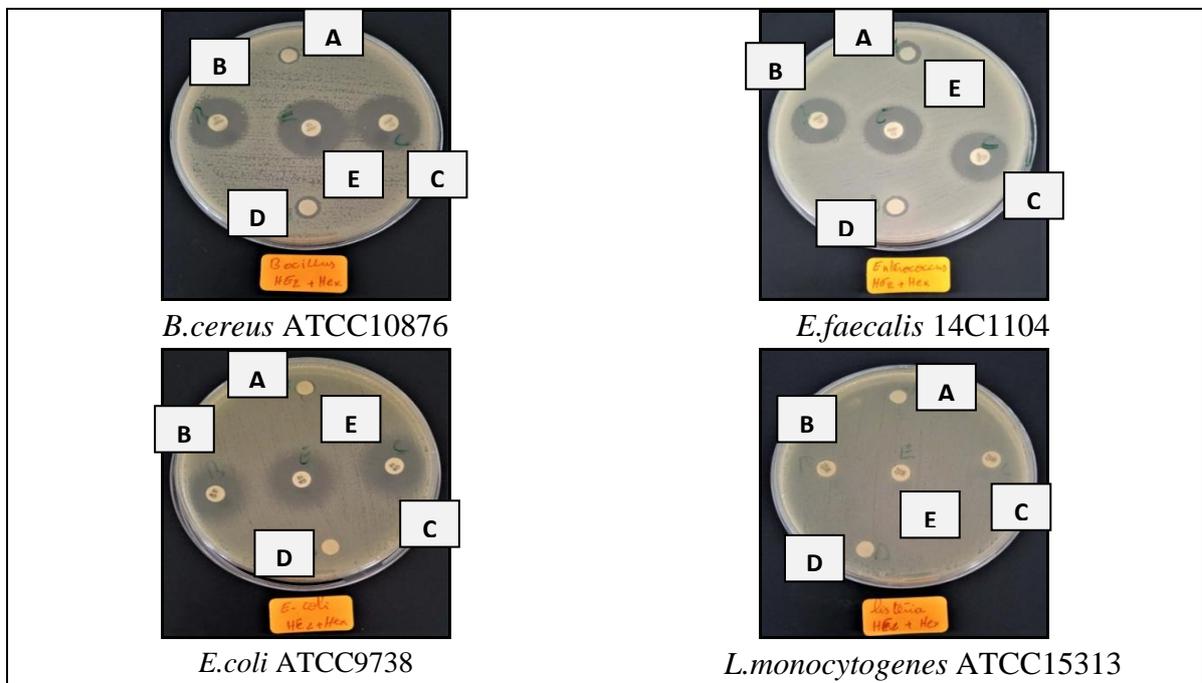


Figure N° 47: Les zones d’inhibition de HE2, n-hexane, ATB seul et leurs synergies avec l’ATB

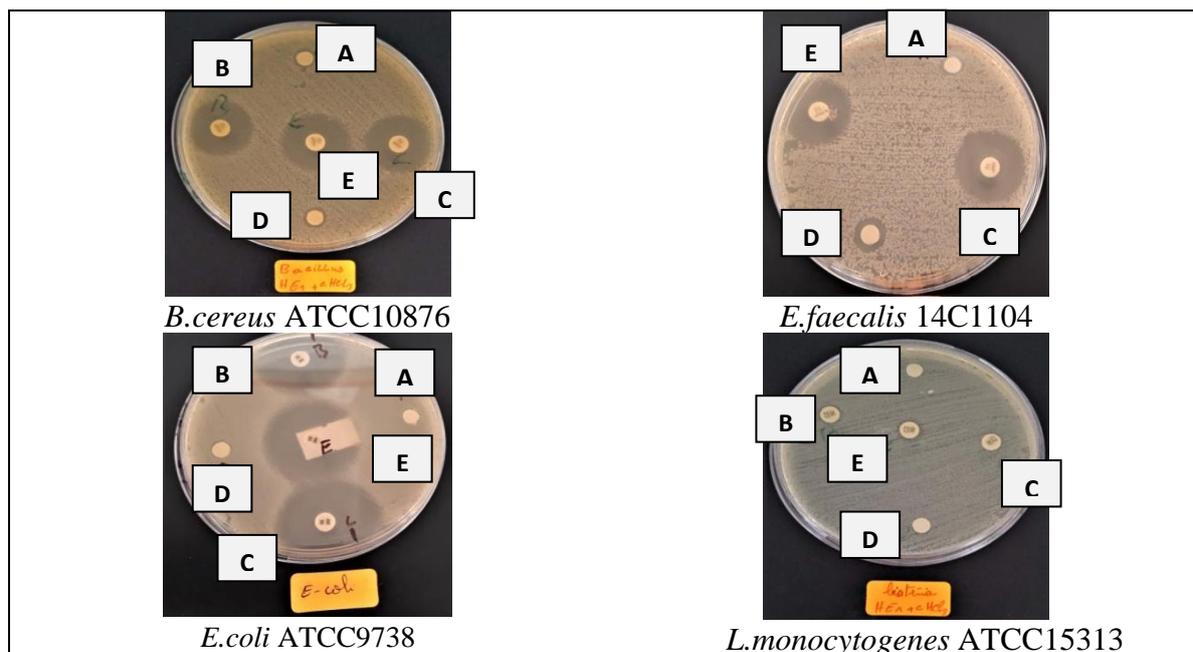


Figure N° 48: Les zones d'inhibition de HE1, CHCL3, ATB seul et leurs synergies avec l'ATB

NB : A : HE
B : ATB
C : HE/ATB
D : CHCL3, n-hexane
E : CHCL3/ATB, n-hexane/ATB

➤ Discussion

Les tests de l'activité antibactérienne évaluée, il montre que les huiles essentielles de propolis de la Wilaya de Guelma et la Wilaya de Mila sont efficaces contre la majorité de souches bactériennes testées, à Gram positif et à Gram négatif. Cette efficacité est due à la richesse des ces huiles essentielles en substances inhibitrices, il s'agit probablement des terpenoïdes qui sont doués d'une activité antibactérienne (Sacchetti et al, 2005). La puissance de cette activité prouve de plus en plus l'efficacité de ces substances face à ces bactéries pathogènes.

L'effet positif des huiles essentielles contre les bactéries a été signalé par quelques travaux, qui sont résulte en fonction de diamètre d'inhibition (DI=mm) et de concentration minimale inhibitrice (CMI= mg/ml) (Simionatto et al, 2012 ; Oliveira et al, 2010 ; Fernandes et al. 2015 ; Melliou et al. 2007).

Concernant les diamètres des zones d'inhibition calculés à partir des bactéries à Gram positif, Gram négatif on trouve que les huiles essentielles de K1, G1, G3 ont été donné la meilleur activité avec les plus grands diamètres contre *Staphylococcus aureus* avec ZI de $23,0 \pm 1,3$ mm, $21,0 \pm 2$ mm et $16,0 \pm 0,7$ mm respectivement, alors que des ZI moyenne de diamètre $4 >$ mm, $12,1 \pm 0,6$ mm, $11,5 \pm 0,3$ mm, $12,8 \pm 0,3$ mm, $11,2 \pm 0,3$, $12,3 \pm 1,1$ mm sont présentés par Bg, Br1, Br2, Br3, Br4, K2 respectivement (**Kujungie et al. 1999**). Selon (**Oliveira et al. 2010**) les huiles essentielle de Rio de Janeiro(Brésil) donnent une même activité antibactérienne avec moyenne DI de 14mm pour *Streptococcus pyogenes* 93007, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, faible DI de 10mm pour *Staphylococcus épidermides* 25/04, *Staphylococcus épidermides* 194/02 et aussi donnent des zones d'inhibition de diamètre différents 17mm, 18mm pour *Escherichia coli* 36298 et *Streptococcus pyogenes* 75194. Selon (**Simionatto et al. 2012**) les résultats des huiles essentielles de Santiago(Brésil) présentent des diamètres d'inhibition un peu importante de 10 mm pour *pseudomonas aeruginosa* ATCC25619, de 11mm pour *Escherichia coli* ATCC 25792, de 12mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Noté bien :

Bg : dans la région de Sofia, Bulgarie, Alb, près de Tirana, Albanie, Mong, près d'Ulan Bator, Mongolie, Epypte, à Bani Swaief, près de Gizeh, Egypte.

Br1 : près de Rio Claro City ,Etat de Sao Paulo, Brésil.

Br2 : près de Prudentopolis, État du Parana, Brésil.

Br3 : près de Pacajus, État du Ceara, Brésil.

Br4 : près Limera, État de Sao Paulo, Brésil.

K1 : près de SanMateo, Gran.

K2 : près Telde, Gran Canaria, Îles Canaries Canaria, Îles Canaries.

G1 : dans l'État de Picas Piani, au Brésil, recueilli par l'abeille *Melipona compressipes*, et **G3** : à Prudentopolis, État du Parana recueilli par l'abeille *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

Concernant les CMI on trouve qu'il existe une activité inhibitrice importante testé par (E. Melliou et al. 2007) des huiles essentielles de propolis de quelques régions de Grèce contre *Escherichia coli* ATCC25922 avec des concentrations minimal inhibitrice de 3,40mg/ml, 3,80mg/ml à 3,90mg/ml, et une valeur de 3,10mg/ml obtenue contre *Entérobacter cloacae* ATCC 13047 et des des valeurs CMI de 7,90mg/ml, 7,80mg/ml, 7,10mg/ml contre *Entérobacter cloacae* ATCC 13047, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *pseudomonas aeruginosa* ATCC 227853 respectivement.

La différence d'efficacité antibactérienne des huiles essentielles de nombreux échantillon de propolis est due à la différence de ces compositions chimiques majoritaire et biologiquement active (alcool, phénols, composés terpéniques et cétonique) (Touzani et al, 2018) qui sont liées aux facteurs abiotique, tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude, la nature du sol, la durée de récolte de la propolis, et la variation de la qualité des espèces végétaux et les espèces d'abeilles qui sont intervient dans sa production aussi des facteurs technologiques comme le mode d'extraction des huiles essentielles (Regnault et al, 2005).

Pour cette raison, nous confirmons la différence dans les résultats existante entre l'HE1 et l'HE2, qui ont été tirés et récoltés dans deux régions différentes.

Bien que les huiles essentielles de la propolis aient une activité antibactérienne importante, il n'y a beaucoup d'études et des références sur l'importance de ce composé.

Les sesquiterpènes (E-nerolidol et spathuléol) sont des principaux constituons des huiles essentielle de la propolis de brésil qui sont présentés un pouvoir antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Entérocooccus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (Fernandes et al, 2015), cette dernière souche aussi sensible aux composées majeurs (a-pinène, b-pinène limonène) des huiles esentielles de propolis de brésil (Simionatto et al, 2012). On mentionne encore des constituants majoritaire des huiles essentielles de propolis de différentes régions de monde qui sont intervient dans les testes d'activité antibactérienne tel que farnesol, dihydroeudesmol, guaiol de Pologne (Maciejewicz et al 1983), β -eudesmol, benzyl benzoate de Hongrie (Petri et al, 1988), α -pinene, trans- β -terpineol, Junipene, δ -cadinene de Grèce (Melliou et al, 2007), β -eudesmol, δ -cadinen, sesquiterpene alcohol de Bulgarie (Bankova et al, 1994 ; Kujumgiev et al, 1999), nerolidol, spatulenol, ledol de les îles canaries (Bankova et al, 1998).

L'extrait de DCM de propolis Iranien de quelques régions telles que Chenaran (Mashhad), MoradBeyg (Hamedan), Kalaleh (Goleatan), Alborz (Taleghan) présente respectivement des zones d'inhibition des diamètres 11mm, 12mm, 11,33mm, 10,33mm contre *E. coli* et 11mm, 11,33mm, 11,67mm, 10,33mm contre *S.aureus* (Afrouzan et al, 2018). Le screening antibactérien des fractions de DCM et d'hexane de la propolis Brésilien présente respectivement des CMI (6,25 µg/ml et 15,64 µg/ml), (125 µg/ml et 6,25 µg/ml), (15,64 µg/ml et 7,82 µg/ml) contre *S.aureus*, *E. coli*, *Streptococcus mutans* respectivement, il présente aussi des CMB (125 µg/ml et 31,25 µg/ml), (250 µg/ml et 62,5 µg/ml), (31,25 µg/ml et 7,82 µg/ml) contre les même souches bactériennes respectivement (Botteon et al, 2021).

L'activité des extraits *n*-hexane et CHCL₃ de la propolis, est due au fait qu'ils contiennent des principes actifs tels que guttiférone E, oblongifoline B (coumarine) qui caractérisent l'extrait d'hexane, et liquiritigénine (flavanone), formononétine (isoflavone), vestitol (isovlavane), néovestol, médicarpine (), 7-0-méthylvestol, guttiférone E, oblongifoline B (coumarine) qui caractérisent l'extrait de CHCL₃ (C.E.A.Botteon et al, 2021).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits, révèle qu'il existe une légère différence de sensibilité entre les bactéries Gram+ et Gram-.

La plupart des travaux antérieurs conviennent que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles que les bactéries à Gram- (Pobiega et al, 2017). En effet, les Gram- ont une résistance intrinsèque aux antibiotiques, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (Labiode, 2016). La résistance des bactéries à Gram- pourrait être due à la présence des pompes d'efflux empêchant la pénétration intracellulaire des biomolécules de la propolis (Seidel et al, 2008).

Certains composants de la propolis, tel que, l'acide cinamique, l'acide benzoïque, l'antraquinone et ses dérivés, les alcaloïdes, les sesquiterpènes, les acides gras, lanostan-3-one, 11β, la podophyllotoxine, les phénothiazines, le pyrrolidone, les dérivés de barbituriques, la chrysine, Androst-5-en-17-one, l'alpha-terpinol, le thymol, les dérivés de rhodanine, les dérivés imidazoliques, la carbamazépine et le méthylène Bis Aspidinol affecte négativement le potentiel de la membrane cellulaire bactérienne, augmentant sa

perméabilité et entraînant une diminution de la motilité (Soltani, 2017). Des protéines dénaturées (par exemple des enzymes) ont également été montrées après des doses élevées des composés phénoliques contenus dans l'extrait éthanolique de propolis (EEP) (Pobiega et al, 2017), des composés de type sesquiterpène peut entraînent des dommages à l'ADN (Soltani, 2017), des ingrédients de la propolis, principalement les flavonoïdes (quercitrine, galangine, pinocembrine), agissent sur les facteurs de virulence des bactéries à Gram positif, inhibe l'activité de la coagulase et diminuent l'activité de lipase et empêchent la formation des biofilms (Scazzocchio et al, 2006).

Le faible effet sur les bactéries à Gram négatif peut également être expliqué par le fait que la propolis contient principalement résine d'origine végétale constituants et que les résine sont sécrétées par les plantes pour se protéger principalement contre les agents pathogènes à Gram positif (Seidel et al 2018).

L'effet d'un agent antibactérien tel que HE1, HE2, ATB, l'extrait de CHCL3, l'extrait de *n*-hexane est lié à son interaction avec son site d'action. Cet agent doit avoir une certaine affinité pour son site.

Pour cette raison, l'augmentation d'efficacité de l'antibiotique peut s'expliquer par association HE1/ATB et l'extrait CHCL3/ATB qui sont appliqués contre *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738 et par association d'extariat *n*-hexane/ATB appliqué sur *Bacillus cereus* ATCC10876, où chacun des extraits (CHCL3, *n*-hexane) et de HE1 ont été utilisés comme des agonistes qui provoquent un effet comparable à celui d'ATB. Donc plus l'affinité d'agoniste pour son site d'action est grande plus sa puissance est élevée, puis l'effet biologique est s'amélioré et augmenté.

Par contre la diminution d'efficacité de l'antibiotique peut s'expliquer par association HE2/ATB appliqué sur *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738 et par l'association extariat *n*-hexane/ATB appliqué sur *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738, où chacun d'extrait *n*-hexane et de HE2 ont été utilisés comme un antagoniste qui se lie au niveau du récepteur sur un site distinct du site de liaison d'ATB (site allostérique) et entraîne des modification conformationnelles du récepteur avec diminution d'affinité du récepteur pour son ATB, l'association de l'antagoniste au récepteur est pratiquement irréversible. Dans ce cas l'efficacité d'ATB est démunie.

Selon (Monica et al, 2020) on trouve que le teste en damier a montré que les deux extraits éthanolique présentaient un effet synergique avec la gentamicine contre *E.faecalis* ATCC 29212 ;Mirim a montré une avec tous les agent antimicrobiens testés contre le *SARM* , contrairement à l'extrait de mandaçaia. L'extrait de Mandaçaia n'a pas montré d'effet synergique avec la vancamycine contre les souches VRE et HLAR.Mais le test time-kill a montré que les echantillons de mandaçaia et de mirim ont montrés un effet synergique avec la gentamicine contre *SARM* et *E.faecalis* ATTC 29212. De plus, l'extraitde mirim a montré un effet bactéricide contre le *SARM* et *E.faecalis* ATCC 29212 à 18h et 4h, respectivement. L'extrait Mandaçaia a montré un effet bactériostatique contre le *SARM* et *E.faecalis* ATCC 29212 qui a comencé à 18h et 4h, respectivement, etpersisté pendant 24h.Aucun des extraits n'a montré de synergie avec l'oxacilline et la vancamycine contre le *SARM*. Enfin, l'extrait de mandaçaia n'a pas montré d'effet synergique avec la vancamycine contre les souches VRE et HLAR.

Conclusion

Conclusion

Les produits naturels tel que les huiles essentielles et les extraits de la propolis sont une source intéressante de nouvelles thérapeutiques, compte tenu de la propagation des maladies infectieuses et de l'émergence des bactéries résistantes aux antibiotiques, dont l'effet est devenu faible, en plus de provoquer des effets secondaires indésirables chez l'homme pendant la période de traitement.

Sur la base de ces résultats, on peut conclure que l'activité antibactérienne des huiles essentielles et les extraits de CHCL₃ et de n-hexane de la propolis de l'Est Algérien est important, contre la plupart des souches bactériennes de référence à Gram négatif et à Gram positif testés avec des diamètres d'inhibition entre 6mm et 13,26mm. Cette activité antibactérienne est améliorée et augmenté, par une combinaison de chaque HE1, extrait chloroformique, avec les antibiotiques d'AMP₁₀, CZ₃₀, GEN₁₀ appliquées sur *Enterococcus faecalis* 14C1104, *Bacillus cereus* ATCC10876, *Escherichia coli* ATCC9738, par contre la combinaison de chaque HE2, extrait de n-hexane avec les mêmes antibiotiques n'augmentent pas son effet cotre ces dernies souches à l'exception de *Bacillus cereus* ATCC10876.

Les résultats des testes quantitatifs on révélés que les deux extraits de CHCL₃, n-hexane ont été caractérisés par une teneur en flavonoïdes et en polyphénol, ce qui suggère que ces composés sont cruciaux pour l'activité antibactérienne de la propolis. Donc grâce à les caractéristiques et les compositions des huiles essentielles et des extraits de la propolis, démontrant leur potentiel d'utilisation comme agent antibactérienne, ils peuvent être utilisés soit adjuvant pour les antibiotiques actuels ou comme alternatifs utilisées ultérieurement dans le domaine pharmaceutique, par l'extraction de ces principes actifs, après une analyse de GCMS.

On propose de suivre ce travaille par une méthode de micro dilution des huiles essentielles et des extraits de CHCHL₃, n-hexane de la propolis affine déterminer leurs CMI.

Références bibliographiques

1. **Ahamed Basha K. (2019)**: Mechanisms of action of antibiotics ; ICAR-Visakhapatnam research center of Central Institute of Fisheries Technology : 44-52.
2. **ALEKSHUN M.N., LEVY S.B.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance .*Cell*, 2007, 128, 1037-1050.
3. **ALEKSHUN M.N., LEVY S.B.** Molecular mechanisms of Anti bacterial multi drug resistance .*Cell*, 2007, 128, 1037-1050.
4. **Ali Mansour H. (2006)**. Plantes médicinales mondiales ;Description, Composants, Méthodes d'utilisation et de culture. P85.
5. **Anjum S I . , Ullah A . , Ali Khan K . , Attaullah M . , Khan H . , Ali H . , Bashir M A . , Tahir**
6. **Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M.A., Tahir, M., Ansari, M.J., Ghramh, H.A., Adgaba, N., Dash, C.K., 2019.** Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J. Biol. Sci.* 26 (7), 1695–1703.
7. **Anne Davin-Regli, Muriel Masi, Jean-Marie Pagès. (2020)** : Le rôle des porines dans la résistance aux antibiotiques, *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES • N° 519*
8. **Anonyme, 2008.** Pharmacopée Européenne, tome 1, Ed conseil de l'Europe, Strasbourg, 1170p.
9. **Bankova V, Christov R, Delgado Tejera A:** Lignans and other constituents of propolis from Canary Islands. *Phytochemistry* 1998, 49:1411–1415.
10. **Bankova V, Christov R, Popov S, Pureb O, Bocari G:** Volatile constituents of propolis. *Zeitschrift fuer Naturforschung C* 1994, 49:6–10.
11. **Bankova V, Popova M, Trusheva B.** *Chemistry Central Journal* 2014, 8:28. <http://journal.chemistrycentral.com/content/8/1/28>
12. **Boisard S., 2014.** Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. Thèse de Doctorat : Pharmacochimie. Université Nantes Angers Le Mans, p.13
13. **Botteon, C.E.A., Silva, L.B., Ccana-Capatinta, G.V. et al.** Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. *Sci Rep* 11, 1974 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81281-w>

14. **Boulant, E., Davin-Regli, A., Pagès, J.-M., & Bolla, J.-M. (2020).** *Les pompes d'efflux, mécanisme de résistance bactérien. Revue Francophone Des Laboratoires, 2020(519), 38–49.* doi:10.1016/s1773-035x(20)30061-7
15. **Bouyahya A., Abrini J., Bakri Y., Dakka N. (2016).** Les huiles essentielles comme agents anticancéreux: actualité sur le mode d'action, Lavoisier. 1-14.
16. **Bruneton J., 1993.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 2ème édition, 915 p.*
17. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3 eme éd, Tec et Doc, Paris: 484-540.
18. **Cardinault N., Cayeux M.-O., Percie P du Sert. (2012) :** La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie.*10(5):298–304.
19. **CATTOIR V. (2006).** Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. In : ANTIBIOGRAMME COURVALAIN. P, LECLERCQ. R, BINGEN. E 2ème édition, : P 349-364.
20. **CAVACO L.M., HASMAN H., XIA S., AARESTRUP F.M. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica sérovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob. Agents Chemother., 2009, 53, 603-608.**
21. **Clair G, Peyron L.** The study of propolis essential oil. Riv Ital EPPOS. 1981;63(3):168-70.
22. **COPYRIGHT MEDICAL, (2012).** Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques, Fiche N° 824 - Mécanisme-R-ATB).
23. **Cristina Esposito, Emanuele Ugo Garzarella, Bruno Bocchino, Maria D'Avino ^c, Giuseppe Caruso ^c, Antonio Riccardo Buonomo Roberto Sacchi, Fabio Galeotti ^f, Gian Carlo Tenore ^a, Vincenzo Zaccaria^g, Maria Daglia^l 2021**
24. **Cuvillier A.,(2015).**Miel, Propolis, Gelée royale : Les abeilles alliées de notre système immunitaire.Thèse de Doctorat:Pharmacie,p.49
25. **D'apées perry et al. 2002**
26. **Davin-Regli, A., Masi, M., & Pagès, J.-M. (2020).** *Le rôle des porines dans la résistance aux antibiotiques. Revue Francophone Des Laboratoires, 2020(519), 28–37.* doi:10.1016/s1773-035x(20)30060-5
27. **Degirmencioglu H T., Güzelmeriç E, Yuksel P I., Kırmızıbekmez H., Deniz I., Yesilada E. (2019) :** A new type of Anatolian propolis: Evaluation of its chemical

- composition, activity profile and botanical origin. *Chemistry & Biodiversity*, 16(12):1-31.
28. **Docteur Yves Donadieu**, les produit de la ruche. 3^{ième} Edition.1981
29. **E. A. Botteon¹, L. B. Silva¹, G. V. Ccana-Ccapatinta., T. S. Silva., S. R. Ambrosio., R. C. S. Veneziani., J. K. Bastos² & P. D. Marcato.(2021)** : Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities ., (11) : 1974
www.nature.com/scientificreports | <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81281-w>
30. **El housseini N. (2013)** :Interet et applcation clinique de la propolis en médecine buccodentaire .Thèse de Doctorat, Université de Nantes.
31. **El kolli M. (2016)**. Composition chimiques et activités biologiques des huiles essentielles de quelques Apiacees Carum Montanum Benth. Et Hook.et Daucus.gracilis Stem. Thèse en doctorat : Microbiologie. Sétif : Université Farhet Abbas Sétif 1,81p .
32. **Eleni Melliou., Eleftherios Stratis., Ioanna Chinou. (2007)** : Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity .Food Chemistry 103 : 375–380.
33. **Eric Debuyser., 1984**. La propolis. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. *Université De Nante, Faculté de pharmacie*.
34. **Erman W.F. 1985**. Chemistry of monoterpernes, part B. Marcel Dekker, New York.
35. **Fatiha FERHOUM**. Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*). Mémoire de magister. Université M'hamed Bougara-Boumerdes. Faculté des sciences de l'ingénieur ; Département technologie alimentaire ; Laboratoire de recherche de technologie alimentaire ; Option : Technologie alimentaire. **2010**.
36. **Fekih N. (2014)**. Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre Pinus poussant en Algérie, thèse de doctorat Es-Science en chimie, université ABOU BEKR BELKAID-TLEMEN, P :16.
37. **Ghuysen J M. (1975)** : Paroi bactérienne, membrane cytoplasmique et pénicilline.
38. **GUARDABASSI L., COURVALIN P.** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterialresistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobialresistance in bacteria of animal origin. ASM Press: Washington, 2006, 1-18.

39. **Hester Y P.,2017.**Egg Innovations and Strategies for Improvements
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00014-7>
40. **Hnich H. (2017) :** la résistance bactérienne : mécanismes et méthodes de détection au laboratoire. Thèse de doctorat en médecine. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Royaume du Maroc.
41. **Hochheim, S., Guedes, A., Faccin-Galhardi, L., Rechenchoski, D. Z., Nozawa, C., Linhares, R. E., ... Cordova, C. M. M. de. (2019).** *Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee Melipona quadrifasciata. Revista Brasileira de Farmacognosia.* doi:10.1016/j.bjp.2018.12.010
42. **Houshang Afrouzan., Azar Tahghighi., Sedigheh Zakeri., Ali Es-haghi.**2018 : Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. Iranian Biomedical Journal, 22(1): 50-65. DOI: 10.22034/ibj.22.1.50
43. **Hugues Alain N’guessan, Déliko Camille Evelyne Dago, Janat Akhanovna Mamyrbékova-Békro, Yves-Alain Békro.** CCM d’extraits sélectifs de 10 plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l’hypertension artérielle en Côte d’Ivoire. European Journal of Scientific Research, EuroJournals, 2011, 66 (4), pp.575-585. hal-01447284
44. **J.C. Quincampoix, J.L. Mainardi (2001) :** Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 10 : 267-75
45. **Jacoby GA.** Exu-achromosomal resistance in Gram-negative organisms : the evolution of B-lactamase. Trends Microbiol 1 994 ; 2 : 357-60.
- Munita J M. Arias C A (2016) :** Mechanisms of Antibiotic Resistance. Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 5 th edition : 481-506.
46. **Katarzyna Grecka , Piotr M. Kuś , Piotr Okińczyc , Randy W. Worobo , Justyna Walkusz and Piotr Szweda.(2019) :** The Anti-Staphylococcal Potential of Ethanolic Polish Propolis Extracts : *Molecules*.24 : 1732
 doi:10.3390/molecules24091732
47. **Kawtar ZIATI N°: 58 2021 UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT**
 NTIBIOPROPHYLAXIE CHIRURGICALE ET RISQUE DE RESISTANCE
 ACTERIENNE
48. **Kocot, Joanna et al. 2018.** « Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*

- 2018: 1-29.
49. **Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S:** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *J Ethnophar* 1999, 64:235–240.
50. **Kujumgiev., I. Tsvetkova., Yu. Serkedjieva., V. Bankova., R. Christov., S. Popov. (1999)** : Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64 : 235–240.
51. **Kujumgiev., I. Tsvetkova., Yu. Serkedjieva., V. Bankova., R. Christov., S. Popov. (1999)** : Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64 : 235–240
52. **Labiod, R. (2016).** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse de Doctorat en biochimie appliquée, Université Badji Mokhtar-Annaba.
53. **LAHOUEL M., 2005** - Interactions flavonoïdes - mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat, Univ. Mentouri, Constantine.
54. **LALAOUI RACHIDI S. (2016)** : Profil bactériologique des pneumopathies nosocomiales de l'adulte et état de résistance aux antibiotiques. Thèse doctorat en médecine, université cadi ayyad marrakech, 117p.
55. **Lancini G., Fransisco P., Gallo GG. (1995)** : review : The Antibiotics. : 1-14.
56. **Letullier C., Manduchet A., Dlalah N., Hugou M., Georgé S., Sforcin J M. , Cardinault N. ,2019.** Comparison of the antibacterial efficiency of propolis samples from different botanical and geographic origins with and without standardization. *Journal of Apicultural Research*. DOI:10.1080/00218839.2019.1681117
57. **Lleo M D M., Caneparl P., Cornaglia G., Fontana R., Satta G. (1987)** : Bacteriostatic and Bactericidal Acvtivities of 3-Lactams against *Streptococcus (Enterococcus) faecium* are Associated with saturation of different Penicillin-Bindin Proteins, antimicrobial agents and chemotherapy, 31(10) : 1618-1626.
58. **M. , Ansari M J ., Ghramh H A. , Adgaba N , Dash C K. (2018)** : Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*,26(7):1695-1703.
59. **M. Morri S M, et al.** MPH3 Association of Bacterial Vaginosis With Chlamydia and Gonorrhea Among Women in the U.S. *American Journal of Preventive Medicine*. 2016 *Am J Prev Med* 2017;52(5):632–639.

60. **M.Y.Boufadi (2014)**. Exploration du potentiel antimicrobien et antioxydant de la Propolis d'Algérie. Thèse de Doctorat en Sciences, Univ. Mostaganem
61. **Maciejewicz W, Scheller S, Daniewski M:** GC-MS investigation of propolis: analysis of sesquiterpenes. *Acta Pol Pharm* 1983, 40:251–253.
62. **Maïmouna DEMBELE.(2020)** : Profil de résistance aux antibiotiques des entérobactéries isolées des urines au service de bactériologie de l'INSP de 2016 à 2018 , Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako
63. **Markhem K.R. (1982)** Techniques of flavonoid identification. Biological techniques Series.Ed.TREHERNEj.e. ET Rubery P. H. AcademicPress. 113p
64. **Med Sci.(2021)** : Adjuvants : un second souffle pour les antibiotiques.Paris ,37(3) : 283-287.(<https://bibliosante.ml/handle/123456789/4561>)
65. mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 1892-1897.
66. **MetoA . , ColombariB . , MetoA . , BoarettoG . , Pinetti D . , Marchetti L . , BenvenutiS . , Pellati F . , Blasi E. (2020)** :Propolis Affects *Pseudomonas aeruginosa* Growth, Biofilm Formation, eDNA Release and Phenazine Production: *Potential Involvement of Polyphenols . Microorganisms*, 8(2):243
67. **Mohammedi D. (2010)**. Classification et mode d'action des antibiotiques. Pages (3-10).
68. **Mokrani S., Hamdani S. (2017)** : Evaluation de consommation des antibiotiques au Service de Réanimation médicale du CHU DE Tizi-Ouzou. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mouloud Mammeri.
69. **Monica Surek, Mariana M. Fachi, Alexandre de Fátima Cobre, Favízia F. de Oliveira, Roberto Pontarolo, Amanda R. Crisma, Wesley M. de Souza, Karina B. Felipe.** 2020 : Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. *Journal of Ethnopharmacology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113662>
70. **Nader EL Housseini.** Intérêt et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire. Université de Nantes ; Unité de formation et de recherche d'odontologie. 2013.
71. **Narimane SEGUENI.** Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis. Thèse présentée pour obtenir le diplôme de

doctorat en science en pharmacochimie. Université Mentouri de Constantine ; Faculté des sciences exactes ; Département de chimie ; Option : Chimie pharmaceutique. 2011.

72. **Oliveira AP., França HS., Kuster RM., Teixeira LA., Rocha LM. (2010) :** Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 16(1):121-130.
73. **Oliveira AP., França HS., Kuster RM., Teixeira LA., Rocha LM. (2010) :** Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 16(1):121-130.
J. Chil. Chem. Soc., 57, N° 3 (2012)
74. **Olivier L. (2017).** Implication du pharmacien hospitalier dans la prise en charge de infections a bactéries multirésistantes : Revue de pertinence des prescriptions de piperacilline/Tazobactam et epargne des antibiotiques a large spèctre au centre hospitalier d'Aubagne. Thèse de doctorat : pharmacie : Université d'Aix –Marseille, 197.
75. **Oryan, Ahmad, Esmat Alemzadeh, et Ali Moshiri. 2018.** « Potential Role of Propolis in Wound Healing: Biological Properties and Therapeutic Activities ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98: 469-83.
76. **Padrini F., et Luccheroni N., 2003.** Le grand livre des huiles essentielles : Médecine douce, bien être .Ed De vecchi S.A, Paris, 206 p.
77. **Paris R.R et Moyse H. ,1965.** Précis de Matière médicale, tome II : pharmacognosie spéciale. Ed .Masson et Cie, Tome I, 511 p.
78. **Pasupuleti V R , Sammugam L, Ramesh N , Hua Gan S. Honey, Propolis, and Royal Jelly. (2017):** A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits .*Oxidative Medicine and Cellular Longevity* . Volume 2017 |Article ID 1259510 :1-21.
79. **Perry J, Waglechner N, Wright G.** The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(6)
80. **Petri G, Lemberkovics E, Foldvar M:** Examination of Differences Between Propolis (bee Glue) Produced from Different Floral Environments. In *Flavors and Fragrances: a World Perspective*. Edited by Lawrence BM, Mookherjee BD, Wills BJ. Amsterdam: Elsevier; 1988:439–446.

81. **Peyrou M.** Antibiorésistance des souches bactériennes d'origine équine: étude bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de St-Hyacinthe 2001.
82. **Pino JA, Marbot R, Delgado A, Zumárraga C, Sauri E.** Volatile constituents of propolis from honeybees and stingless bees from Yucatán. *J Essent Oil Res.* 2006;18(1):53-6.
83. **Pobiega K., Gniewosz M., Kraséniewska K.** (2017) : Antimicrobial and Antiviral Propertis Of Diffrent Types Of Propolis, *Zeszyty Problemowe Postępow Nauk Rolniczychnr*, 589 :69-79 .
84. **Przybyłek I., Karpinski T M.** (2019) : Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, 24(11):2047
85. **Przybyłek I., Karpinski T.** ,2019.Antibacterial Properties of Propolis.9,24,2047; doi:10.3390/molecules24112047
86. **Regnault- Roger C., Philogene B.J.R et Vincent C.,** 2005. Biopesticides of plant origin. Ed.TEC et DOC, Lavoisier, Paris. 313 p.
87. **RegueiraNeto M S .,Tintino S R., Pereira da Silva A R ., Costa M S ., Boligon A A ., . Matias EdinarDOF.F ., Balbino V Q ., Menezes Irwin R.A. ., MeloCoutinho H D.** (2017) : Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology* ,107 :572- 580.
88. **Ripari N., Alves Sartori A., da Silva Honorio M., Lopes Conte F., Ingrid Tasca K., Basso Santiago k Maurício Sforcin j.,** 2021. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73 :.281–299
89. **Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredi S, Radice M, et al.** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005;91(4):621-32.
90. **Scazzocchio F., D'Auria F.D.,Alessandrini D., Pantanella F.** (2006) : Multifactorial aspect of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol. Re*, 161(4) :327-333.
91. **Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR.** Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17(6):431-7.
92. **Seidel V., Peyfoon E., Watson D G., Fearnley J.** (2008) : comparative study of the antibactérial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytothe, Res*, 22(9) :1256-1263.

93. **Simionatto E, Facco JT, Morel AF, Giacomelli SR, Linares CEB:** Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. *J Chil Chem Soc* 2012, 57:1240–1243.
94. **Springman AC, Lacher DW, Milton GWN, et al (2009)** Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol* 191:5419–27
95. **Sultan I., Rahman S., Jan A T., Siddiqui M T., Mondal A H., Haq Q R.** (2018) : Antibiotics Resistance and Resistance Mechanisms : *A Bacterial Perspective : Frontiers in microbiology*, 9(2066) : 1-16.
96. **Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al.** Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis *Lancet Infect Dis* 2018 ; 18 : 318–327. [PubMed][Google Scholar]]
97. **Tosi, Enzo A.; Ciappini, Maria C., Cazzolli, Ampelio F., Tapiz, Luis M. 2006.** Physico chemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *APIACTA* 41 (2006) PAGE 110-120.2
98. **Touzani S., Al-Waili N., El Menyiy N., Filipic B., Pereyra a., El Arabi I., Al-Waili W., Lyoussi B. (2018)** : chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities . *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(7) :436-442.
99. **Trémolières, F. (2010)** : *Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. Médecine/sciences*, 26(11), 925–929. doi:10.1051/medsci/20102611925
100. **Trémolières, F. (2010).** Quand le miracle antibiotique vire au cauchemar. *Médecine/sciences*, 26 (11), 925-929. doi:10.1051/medsci/20102611925
101. **Victor Fleming**, in « Penicillin finds its future », *New York Times*, 26 juin 1945
102. **Wagh VD. (2013)** : Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials *Advances in Pharmacological Sciences*, Volume 2013 |Article ID 308249:1.
103. **Walker P., Crane E. (1987)** : Constituents of propolis. *Apidologie* 18(4) : 327-334.
104. **Walmir S. Garcez., Fernanda R. Garcez. (2015)** : Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicology Reports*, 2: 1482–1488.
105. **WANG M., GUO Q., XU X., WANG X., YE X., WU S., HOOPER D.C.** New plasmid

106. **Y.DONADIEU.** La propolis. Paris : Dangles. 2008.
107. **Yahyaoui, N. (2005).** Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Menthe Spicata L* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F.)* (Coleoptera, Bostrychidae) et *Triboium confusm(Duv.)* (Coleoptera, Tenebrionidae).Thèse de Magister en sciences agronomiques, option Ecologie,INA, El-Harrach.Sité par kesbi.**A.F.N.O.R., 2000.** Association française de Normalisation. Norme Française : les huiles essentielles, monographie relatives aux huiles essentielles, Ed. Afnor, Paris, 663 p.
108. **Yala D., Merad A S., Mohamedi D., Ouar korich M N. (2001) :** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine de maghreb*, n°91 : 5-12.
109. **Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y., & Li, X. (2011).** *Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China. Molecules, 16(4), 3444–3455.* doi:10.3390/molecules16043444
110. **Zogheib E, Dupont H.** Entérobactéries multirésistantes. Conférences d'actualisation. 2005:153-65.

Site web

Site web 1 : Source [http:// upload.wikimedia.org/ wikipedia/ commons/ d/ da/ Populus_nigra_Plantierensis1.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/da/Populus_nigra_Plantierensis1.jpg))

Site web 2 : (www.naturalista.mx)

Site web 3: (Source [http:// waynesword.palomar.edu/ images2/ ClusiaRosea1b.jpg](http://waynesword.palomar.edu/images2/ClusiaRosea1b.jpg) (bien-etre-au-naturel.fr) (Bogdanov, 2016)

Site web 4: Sources en provenance de ce site: « [http://propolis-propolis.net/propolis antibiotique. html](http://propolis-propolis.net/propolis_antibiotique.html) » site consulté le 05/03/2016.

Annece

		
Plaque chauffante	Balance	Autoclave
		
Micro-onde	Agitateur magnétique	Bain marie
		
Balance de précision	Bec benzène	Etuve
		
Réfrigérateur		Spectrophotomètre

		
Vortex	Chambre noir	Pie à coulisse
Figure N° 49: Les appareillages		