

## Etude comparée des propriétés anti oxydante et anti microbienne de la propolis de quelques régions d'Algérie

BENCHABANE Otmane<sup>a\*</sup>, HAZZIT Mohamed<sup>a</sup>, BOUSTA Liliane<sup>a</sup>, ABBOU Brahim<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique, ENSA, Alger

<sup>b</sup> Département production margarine Bellat, Alger

\* Auteur correspondant

Email : obenchabane2000@yahoo.fr

### Résumé :

La présente étude porte sur les propriétés biologiques de la propolis locale, cette matière est précieuse grâce à ces propriétés thérapeutiques, qui sont liées directement à sa composition. Notre étude a porté sur 04 échantillons de propolis récoltés dans différentes régions du pays (Ain Defla, Batna, Boufarik et Ghardaia) caractérisés par des paramètres pédoclimatiques différents et avec deux races d'abeilles (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*).

L'évaluation de l'activité antioxydante a été déterminée à l'aide de trois tests standards (pouvoir de piégeage du radical DPPH, pouvoir du piégeage du radical ABTS et mesure du pouvoir réducteur des extraits) en utilisant les extraits éthanoliques de la propolis et une mesure quantitative des composés polyphénoliques. Pour l'analyse microbiologique on a testé l'effet antimicrobien des extraits de la propolis de deux régions (Propolis de Boufarik et celle de Ghardaia) sur 05 germes dont 02 sont des levures et moisissures.

Les résultats du pouvoir anti radicalaire et antioxydant de la propolis algérienne montrent une variation significative entre les différentes régions. L'analyse microbiologique a montré que les deux échantillons étudiés (propolis de Boufarik et propolis de Ghardaia) ont une activité anti microbienne avec une forte activité pour celle de Ghardaia. En comparant les résultats de nos analyses selon les régions, on constate que la propolis saharienne montre une meilleure activité antioxydante et antimicrobienne. Cette dernière est fortement liée à la végétation de la région et à la race d'abeille.

**Mots clés :** Propolis Algérienne - Activité antioxydante - Activité antimicrobienne - *Apis mellifica intermissa* - *Apis mellifica sahariensis*.

### Abstract :

The present study relates to the biological properties of the local propolis, this famous matter is very invaluable thanks to these therapeutic properties which are dependent directly on its composition. Our study was related to 04 collected samples of the propolis various areas of the countries (Northern, Southern, East and Western) characterized by its parameters pedoclimatic different and two races from bees (*Apis mellifica intermissa* and *Apis mellifica sahariensis*).

The evaluation of the antioxydant activity was proven with assistance 03 test standard (to be able of trapping of radical DPPH, capacity of the trapping of radical ABTS and measurement of the reduction of the extracts) by using the extracts ethanolic of the propolis and a measurement quantitative of the phenolic components. For the microbiological analysis one tested the antimicrobic effect of the extracts of the propolis of two areas out of 05 germs of which 02 are yeasts and moulds.

The results of the radicalizing anti capacity and antioxydant of the Algerian propolis showed a significant variation between the various areas. The microbiological analysis showed that two samples (Boufarik and Ghardaia) have a microbial anti activity but to differing degrees. By

comparing the results of our analyses according to areas, one notes that the propolis Saharan watch a better activity antioxydant, antimicrobic. The latter is strongly related to the vegetation of the area and the race of bee.

**Keywords :** Algerian Propolis - antioxydant Activity - antimicrobic Activity - *Apis mellifica intermissa* - *Apis mellifica sahariensis*.

## 1. Introduction

Depuis l'antiquité la propolis est considérée comme une barrière de défense naturelle pour les ruches. Cette substance résineuse est collectée par les abeilles à partir des bourgeons des différents arbres résineux tels que le peuplier et le chêne, puis mastiqués par ses sécrétions mandibulaires. (Agra and al.2006).

La propolis varie en fonction de sa provenance donc de son origine botanique ce qui lui donne ses propres caractéristiques notamment la couleur qui varie du brun foncé au jaune clair , l'odeur et la consistance (Bankova 2000)..La propolis connue sous le nom générique de colle d'abeille est un mélange résineux de couleur, odeur, consistance et saveur qui varient en fonction de son origine végétale et géographique, produite par les abeilles par trituration et mastication des bourgeons d'arbres résineuses et des coulées de sève , utilisée pour colmater et sceller les petits trous de la ruche et bloquer ainsi l'entrée de tous les intrus, dans la ruche particulièrement les microbes, Le mot propolis du grec :Pro défense et poli :cité (défense de la cité) ,en latin propolire signifie enduire, en effet les abeilles enduisent l'intérieur de leur habitat par la propolis pour se protéger des agressions microbiennes et désinfecter la ruche (Boyanova and al 2003.) . La propolis est considérée comme étant la barrière de défense des ruches. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter l'herpès labial, l'herpès génital, la douleur buccale, ainsi que les maux de gorge et les toux (sous forme de pastilles); des travaux récents signalent son efficacité en tant qu'immuno modulatrice, antidiabétique, antiulcéreuse et cicatrisante. (Coggsball and Morse, 1984). Jetée dans la nature, elle constitue actuellement une source importante de pollution en Algérie (Benchabane and al.2015).

Le premier objectif de ce travail est donc d'ordre écologique, qui consiste à réduire cette pollution et comme deuxième objectif la valorisation de cette propolis en l'introduisant dans les secteurs agroalimentaire, pharmaceutique et para pharmaceutique.

## 2. Matériel et Méthodes

La matière première nous a été fournie gracieusement par des apiculteurs de 04 Régions d'Algérie Aïn Defla, Batna, Boufarik et Gahrdaïa en juin 2016. La propolis est débarrassée des impuretés avec de l'eau chaude puis conservée au frais (4°C), avant son broyage.

L'extraction de la poudre de propolis a été effectuée avec l'éthanol absolu à l'aide d'un Soxhlet (solide-liquide).

### 2.1. Activité de piégeage du radical libre (DPPH)

Une solution éthanolique (solution mère ;50 µL) de chaque échantillon à différentes concentrations a été placée dans une cuvette avec 2 mL d'une solution éthanolique de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) 60 µM .la lecture des densités optiques se fait à 517 nm Trois tests ont été réalisés pour chaque échantillon. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif. (Benchabane et al.2015).

### 2.2. Détermination du pouvoir réducteur.

La méthode d'Oyaizu (1986) a été utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur des échantillons des extraits éthanoliques de propolis à différentes concentrations.

1ml de ces échantillons est mélangé à 2,5 ml d'une solution tamponnée de Phosphate de sodium 0,2 M (pH = 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium à 1% et incubé

dans un bain d'eau thermostaté à 50 ° C pendant 20 minutes. Le surnageant (2,5 ml) est ensuite mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution (0.1%) de chlorure de fer (III). L'intensité de la couleur bleu-verdâtre a été mesurée à 700 nm. Une forte absorbance indique un pouvoir réducteur élevé. Les tests ont été réalisés en triple exemplaire. La BHT a été utilisé comme témoin positif.

### 2.3. Activité antimicrobienne

La susceptibilité des souches microbiennes aux extraits éthanoliques des propolis a été étudiée en utilisant la méthode de diffusion sur disque, contre les souches bactériennes standard issues du laboratoire de recherche de l'unité de production de Saidal de Gué de Constantine, trois bactéries ensemencées sur milieu Muller Hinton (MH) : 2 Gram+ ; Staphylococcus aureus (ATCC 6538) et Bacillus subtilis (ATCC 6633) et une gram-Escherichia coli (ATCC 8739) et 2 levures qui se développent sur milieu sabouraud (S) Candida albicans (ATCC 10231) et Aspergillus Niger (ATCC 16404).

### 3. Resultats et discussions

Le rendement le plus élevé est obtenu avec la propolis de Boufarik (59.25%) suivi par celle de Ghardaia (45.03%).

Les résultats relevés sur la propolis Brésilienne confirment que le taux d'extraction change d'un échantillon à un autre de la même région. Des taux d'extraction allant de 40,7% à 73,9% avec l'éthanol (70%) (Agra and al .2006). Les résultats obtenus par notre étude sont en corroboration avec ceux obtenus dans les études précédemment indiquées. Cette différence dans le rendement est attribuée à la différence de la provenance donc la variation de la végétation et de l'espèce de l'abeille existant dans cette région. Le taux de polyphénol le plus élevé obtenu est celui de l'extrait de la propolis de Ghardaia, qui donne pour une concentration de 5mg/l une teneur de 148,19 mgEAG/g d'extrait, Suivi par l'extrait de la propolis de Boufarik pour la même concentration avec une teneur de 116,81 mgEAG/g , les extraits de la propolis de Batna et de Ain defla

représentent les valeurs les plus faibles, à savoir 23,90 mgEAG/g d'extrait pour une concentration de 100 mg/l et 45,87 mgEAG/g d'extrait pour une concentration de 10 mg/l respectivement. Les teneurs en phénols totaux dans la propolis polonaise sont beaucoup plus faibles. (15,01–19,71 mg EAG/ g) ( Khayyal and al.2003).

Les résultats de l'analyse de la variance font ressortir que la teneur en composés phénoliques est significativement affectée par la provenance de la matière première ( $p < 0.001$ ). Compte tenu des résultats obtenus, on peut dire que la teneur en polyphénols totaux est différente d'un échantillon à un autre, selon les régions de récolte. la teneur la plus élevée en flavonoïdes est celle de l'extrait de Ghardaia qui pour une concentration de 5 mg/l dose 66.80 mgEQ/g d'extrait, suivi par l'extrait de Batna et l'extrait de la propolis de Boufarik qui donnent pour la même concentration une teneur de 35,66 mgEQ/g d'extrait et 21,15 mgEQ/g d'extrait respectivement. L'extrait de la propolis de Ain defla représente la plus faible teneur en flavonoïdes (51,38 mgEQ/g) pour une concentration de 100 mg/l. Une étude menée sur la propolis du Brésil indique une teneur en flavonoïdes de l'ordre de 43 mg EQ / g d'extrait (Khayyal and al.2003).

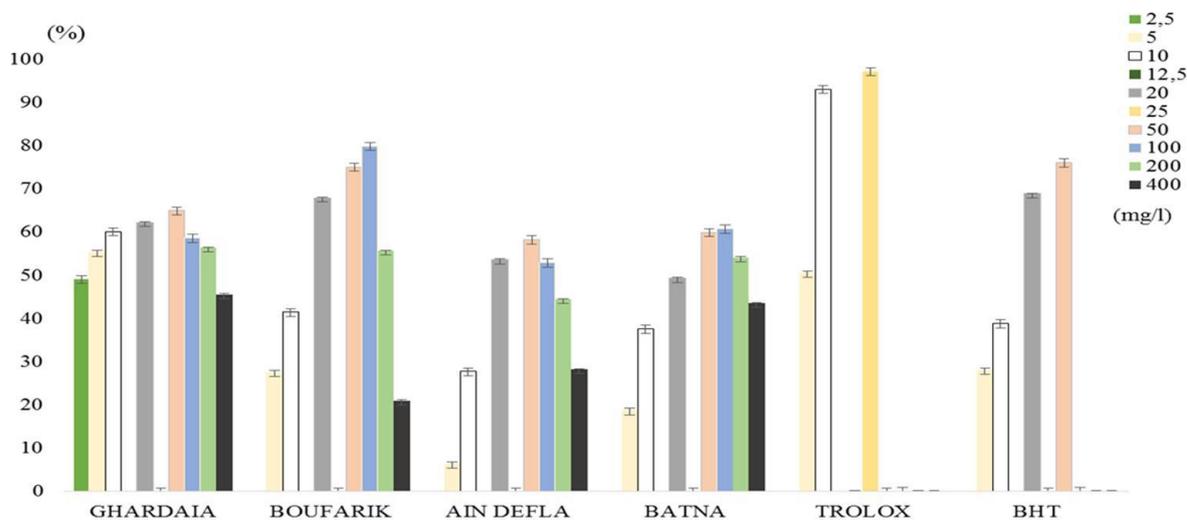
Cette variation est fonction de la provenance de l'échantillon. L'étude réalisée par (Samet, 2007) confirme que la teneur en flavonoïdes dépend de la région (Krell, 1996). La capacité de réduction ou de piégeage du radical DPPH par le BHT (butyl hydroxy toluene) est importante. En effet la valeur minimale obtenue par le BHT est de 28.07% pour une concentration de (5 mg/l). Et la valeur maximale est de 76.03% pour des concentrations de (25 mg/l). Pour l'échantillon de Ghardaia la valeur minimale obtenue est de 55.25% pour une concentration de 5 mg/l, valeur légèrement supérieure par rapport à celle du BHT (50.45%) pour la même concentration.

### 3.1. Scavenging du radical DPPH

On note une augmentation du pouvoir de nos échantillons à réduire le radical de (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (DPPH) en fonction des concentrations pour atteindre les valeurs maximales respectives de

64.95%, 79.8%, 58.23% et 60.66% pour les échantillons de propolis de Ghardaia, Boufarik, Ain Defla et Batna aux concentrations de 50 mg/l, 100mg/l, 50mg/l et 100mg/l respectivement (fig.1). Les résultats obtenus montrent qu'il existe une

forte corrélation entre le pouvoir de piégeage du radical DPPH et la teneur en polyphénols totaux. En effet le coefficient de corrélation linéaire relevé pour la propolis algérienne est ( $R^2=0.818$ ).



**Figure 1 :** Scavenging du DPPH par les solutions de propolis à différentes concentrations.

### 3.2. Scavenging du radical ABTS et pouvoir réducteur

La réduction et la neutralisation du radical ABTS par les extraits de la propolis algérienne augmentent avec l'augmentation de la concentration jusqu'à une valeur maximale au-delà de laquelle le pouvoir de réduction diminue. Le pouvoir de réduction du radical ABTS par l'extrait de la propolis de Ghardaia (41.17%) est nettement supérieur à celui obtenu par le BHT (27.73%), alors que les pouvoirs réducteurs des extraits de la propolis de Boufarik et de Batna ((0.26%) et ((0.23%) respectivement sont légèrement meilleurs. Le maximum de réduction du radical ABTS est obtenu avec l'extrait de la propolis de Ghardaia (98.16 %) pour une concentration de 100mg/l suivi par l'extrait de la propolis de Boufarik (94.62%) pour la même concentration. Les valeurs des IC50 montre que la propolis de Ghardaia a le pouvoir anti radicalaire le plus important, elle inhibe 50 % du radical ABTS à partir de la concentration 5,52 mg/l. En général, Les résultats obtenus, montrent une augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur de l'extrait de la

propolis avec l'augmentation de la concentration. Les absorbances mesurées à la concentration la plus élevée (400mg/l) ont été de ( $1.03 \pm 0.05\%$ ) pour le BHT, alors que celles enregistrées pour les extraits éthanoliques des propolis de Ghardaia, Boufarik, Ain Defla et Batna sont respectivement de ( $3,59 \pm 0,00\%$ ,  $3,83 \pm 0,02\%$ ,  $3,74 \pm 0,01\%$ ,  $3,72 \pm 0,01\%$ ). Donc nos différents extraits des propolis étudiées ont enregistré des pouvoirs réducteurs plus importants que ceux du BHT avec toutes les concentrations. D'après Les résultats des IC50 obtenus, il ressort que l'extrait de la propolis de Ghardaia présente la concentration inhibitrice la plus faible soit (9.04 mg/l) donc le pouvoir réducteur le plus important par rapport aux autres extraits et au BHT, ce qui peut s'expliquer par la présence importante des polyphénols (Papotte and al.2012). Selon les résultats trouvés dans une étude sur la propolis bulgare menée par (Boyanova and al, 2003), on remarque une grande différence avec un  $IC_{50} = 0,55$  mg/l, cette différence est due probablement à la nature de la flore botanique et de la race de l'abeille (*Apis mellifica intermissa* pour les

régions de Ain Defla, Batna et Boufarik et, *Apis mellifica sahariensis* pour Ghardaia)

### 3.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans le but d'une investigation de l'exacte dose au-delà de laquelle toute croissance microbienne est inhibée et de la dose bactéricide, nous avons procédé à la détermination des valeurs de la CMI

(Concentration Minimale Inhibitrice) contre chaque souche testée et de la CMB (Concentration Minimale Bactéricide) pour l'extrait de la propolis de la région Ghardaïa. (fig.2) Pour les concentrations 2000 et 1000 mg/l, on remarque que la croissance des germes testés est inhibée (inhibition assez importante, par contre à une concentration de 500 mg/l, les germes continuent leur développement.

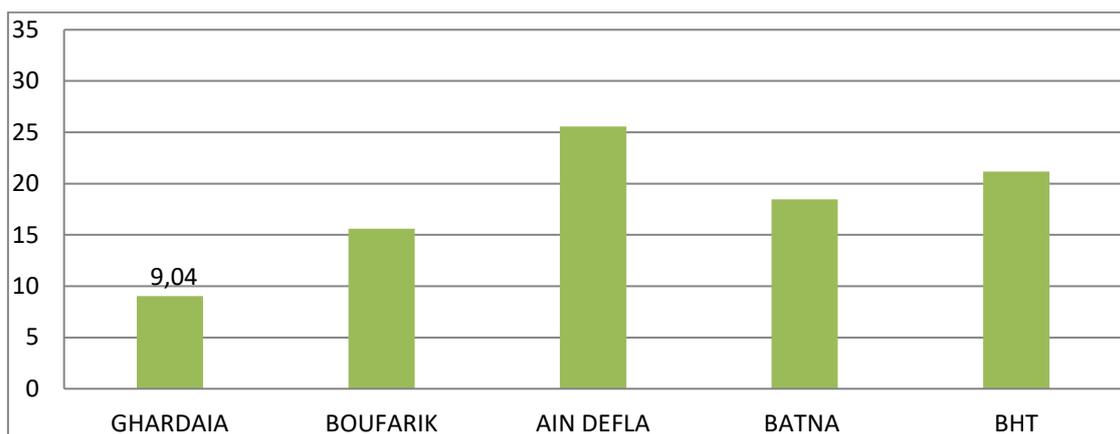


Figure 2 : CMI des quatre propolis étudiées et du BHT

A une concentration de 2000 et 1000 mg/l on remarque qu'il n'y a aucune croissance bactérienne pour tous les germes testés. Ces deux concentrations ont un effet bactéricide par contre à une concentration de 500 mg/l on observe qu'il y a une croissance des germes précédemment cités donc à cette dernière les germes testés sont seulement inhibés les *Staphylococcus aureus* et les *Bacillus subtilis* sont généralement inhibés aux concentrations respectives de 0.3 mg/ml et 0.25 mg/ml Selon une étude sur la propolis Grecque (Kalagrepoulos and al 2009, Khayyal and al. 2003). Ces concentrations sont largement inférieures à nos résultats (la concentration minimale inhibitrice pour les deux germes est estimée à 0.5 mg/ml). Dans une étude menée par Lu and al., (2005), *Candida albicans* est inhibée à une concentration de 3.8 mg/ml, valeur supérieure à celle trouvée dans nos résultats ou *Candida albicans* est inhibée à 0.5 mg/ml.

### 4. Conclusion

Les rendements d'extraction varient en fonction de la provenance de la propolis allant de 59,25 % à 32,93% Les teneurs en polyphénols varient également en fonction des régions de provenances de la propolis avec une forte teneur pour la propolis saharienne. 23,89 à 148,19 (mg EAG/g extrait). Les teneurs en flavonoïdes, varient aussi en fonction de la région de récolte allant de 66,80. 21,146. (mg de quercitrine/g) avec une prédominance de la propolis de Ghardaia.

Les valeurs des zones d'inhibition de la propolis de Ghardaïa varient entre 12 et 17mm pour le disque et entre 16 et 29mm pour les puits. La concentration de (500ppm) est notée comme concentration minimal inhibitrice(CMI), (2000ppm) et (1000ppm) sont des concentrations bactéricides (CMB). Il est important d'identifier la composition analytique, le seuil de toxicité et les propriétés thérapeutiques de la propolis avant de l'intégrer dans les domaines

agroalimentaire, pharmaceutique et para pharmaceutique.

## 5. Références Bibliographiques

- Agra D.R., Evangelista A., Marcucci M.C., (2006). Physicochemical characteristics and antimicrobial activity of the extracts propolis of the Paraiba, Brazil. *Cienc Rural*, 36(6):1842-1848.
- Bankova V.S., De castro S.L et Marcucci M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*, vol. 31, p.p. 3 -15.
- Benchabane, O.; Hazzit, M.; Mouhouche, F.; Baaliouamer,(2015) *A. Arab. J.Sci. Eng.* ,40, 1855–1865.
- Boyanova L., Derejian S., Koumanova R. (2003). Inhibition of helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis, Preliminary Report *J Medical Microbiol*, 52(5):417-419.
- Coggsall W., Morse R.A. (1984). *Beeswax: production, harvesting, processing and products*. Wicwas Press, Ithaca, NY, USA, 192 pp.
- Eric D. (1984). *La propolis*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante, Faculté de pharmacie. 255 p.
- Grange J.M., Davey R.W.,(1990). Antibacterial properties of propolis (beeglue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 83, p.p. 159–60.
- Kalogleopoulos N., Spyros J., Troullidou K. (2009). Chemical composition, Antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and cyprus, *food chemistry*, 116 :452-461
- Khayyal M.T., El-Ghazaly M.A., El-Khatib A.S. (2003). A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmaticpatients. *Fundam Clin Pharmacol* 17: 93–102.
- Koo H., Rosalen P.L., Cury J.A. et al. (2002). Effects of compounds found in Propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity, *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1302–9.
- Krell R. (1996). Value - edded products from beekeeping. Food and agriculture organization of the United Nations Rone. Chapitre 5.
- Lu L.C., Chen Y.W., Chou C.C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Condida albicans*. *Int J Food Microbiol*, 102: 213–20.
- Oyaizu, M.(1986) *Jpn. J. Nutr.* (1986), 44, 307–315
- Ozcan M. (2004). Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by pollen and propolis extracts. *J Med Food*, 7: 114 – 6.
- Papotti., Davide B., Laura B. (2012). “Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (11): 2852–62.