



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
L'Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued



Faculté de la Technologie  
Département de génie procède et Pétrochimique

Mémoire De Fin D'études Présente En Vue De L'obtention Du Diplôme De Master Académique

Spécialité: Génie chimique

Présenté par:

*REZZAG MOHCEN Bouchra & ZAUCHE Abdelkader & HAMIDI Limam*

Thème:

**Étude comparative de l'activité  
antioxydante de l'extrait de propolis  
Algérienne et la biosynthèse  
de NPs-ZnO à base de l'un ces extraits**

Soutenu le: 28/09/2020

Devant le Jury:

D. HAMMAMI Hadia	MAA	Président	Université d'El-Oued
D. SELMI Med Said	MAA	Examineur	Université d'El-Oued
D. REBIAI Abdelkerim	MAA	Rapporteur	Université d'El-Oued

**Année Universitaire: 2019 / 2020**





République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
L'Université Echahid Hamma Lakhdar - El Oued



Faculté de la Technologie  
Département de génie procède et Pétrochimique

Mémoire De Fin D'études Présente En Vue De L'obtention Du Diplôme De Master Académique

Spécialité: Génie chimique

Présenté par:

*REZZAG MOHCEN Bouchra & ZAUCHE Abdelkader & HAMIDI Limam*

Thème:

**Étude comparative de l'activité  
antioxydante de l'extrait de propolis  
Algérienne et la biosynthèse  
de NPs-ZnO à base de l'un ces extraits**

Soutenu le: 28/09/2020

Devant le Jury:

D. HAMMAMI Hadia	MAA	Président	Université d'El-Oued
D. SELMI Med Said	MAA	Examineur	Université d'El-Oued
D. REBIAI Abdelkerim	MAA	Rapporteur	Université d'El-Oued

**Année Universitaire: 2019 / 2020**

## *Remerciement*

*Tout d'abord, nous ne pouvons pas oublier de remercier le bon **Dieu**, le tout puissant, le plus genoux, de nous avoir donné la foi et la sagesse, qui a éclairé notre chemin et nous a donné la volonté, la puissance, la confiance la patience, et le courage pour compléter notre travail de recherche.*

*Nos remerciements s'adressent à notre encadreur de mémoire **DR. Rebiai Abdelekrim**. C'est un grand honneur pour nous, d'avoir accepté de nous encadrer.*

*Toute notre gratitude, Monsieur pour votre disponibilité, vos précieux conseils qui nous avez prodigués tout au long de ce travail ainsi que pour votre confiance et aussi votre présence à nos côtés et l'aide que vous avez porté afin d'accomplir à bien notre travail. À l'occasion de ce jour, permettez-nous de vous dire notre profonde reconnaissance ; puisse Dieu vous récompenser.*

*Nous voulons remercier aussi les membres du jury pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail*

*Nous adressons également nos plus vifs remerciements à **Zghib Khawla** et pour votre présence à nos côtés et l'aide que vous avez porté afin d'accomplir ce mémoire.*

*Un grand remerciement que nous adressons aux personnels du laboratoire de l'université Hama Lakhdar, en particulier madame **Kinza***

*Enfin, on tient à remercier, tous ceux et celles qui ont apporté aide ou soutien, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.*

*Liste d'abréviation*

**%:** Pourcentage

**°C:** Degré Celsius

**AlCl<sub>3</sub>:** Chlorure d'Aluminium

**C:** Concentration

**C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>:** Acétate de sodium

**D.O:** Densité Optique

**DMSO:** Diméthylsulfo-oxyde

**DPPH:** Le radical stable [2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl]

**EAG:** Equivalent d'acide Gallique

**EQ:** Equivalent de la Quercétine

**Fe<sup>2+</sup>:** Ions ferreux

**Fe<sup>3+</sup>:** Ions ferriques

**FeCl<sub>3</sub>:** Trichlorure de fer

**FeSO<sub>4</sub>:** Sulfate de fer

**FRAP:** Potentiel Réducteur Ferriques d'Antioxydants

**g:** gramme

**h:** heure

**HCl:** Acide chlorhydrique

**IC50:** La concentration en extrait de propolis nécessaire pour l'inhibition de 50 % des

**IR:** Infra-rouge

**K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>:** Ferricyanure de potassium

**MEB:** Microscope Electronique A Balayage

**mg:** milligramme

**mL:** millilitre

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonate de sodium.

**NCCLS:** National committee for clinical laboratory standards; organisme American chargé de définir les normes de biologie Clinique

**nm:** nanomètre (1 nm = 10<sup>-9</sup> m)

**NPs:** Nanoparticules

**pH:** potentiel Hydrogène

**rpm:** retour par minute

**TCA:** Acide trichloracétique

**TPTZ:** 2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine

**UFC:** Unité formant colonie.

**UV:** Ultraviolet

**ZnO:** Oxyde de zinc

**$\lambda$ :** Longueur d'onde

**$\mu\text{g}$ :** Microgramme

**$\mu\text{l}$ :** Microlitre

**$\mu\text{mol}$ :** Micromole

**C:** Extrait de Constantine

**E:** Extrait d'El Oued

**T:** Extrait de Tipaza

**Tb:** Extrait de Tébessa

**Liste Des Figures**

<i>Chapitre I : Généralité sur la propolis</i>	
Figure I.1: Récolte de la propolis	8
Figure I.2 : Propolis grattée des cadres	8
Figure I.3: Composition de la propolis	9
<i>Chapitre II : Les nanoparticules oxyde de zinc</i>	
Figure II.1: Comparaison de la taille de nanoparticules à celles des principales structures chimiques et biologiques	14
Figure II.2: Représentation des structures de ZnO : (a) cubique NaCl, (b) blende, (c) hexagonale wurtzite	18
Figure II.3 : Maille primitive de la structure Würtzite	19
Figure II.4 : Classification des nanofils	20
Figure II.5 : Images MEB : (a) fibres d'acétate de PVA / composites de zinc, (b) fibres après calcination à 700°C	21
Figure II.6: (a) Image MEB de nanotubes de ZnO, avec un agrandissement d'un nanotube	21
Figure II.7: Images MEB de nano-hélices	22
Figure II.8 : Mécanisme de croissance des nano-hélices	22
Figure II.9 : (a) nano-ceinture polaire, (b) nano-bagues, (c) nano-spirales et (d) nano-ressort de ZnO	23
Figure II.10 ; Images MEB : (a, b) coquilles et (c, d) cages polyédriques de ZnO monocristallin	23
<i>Chapitre III : Matériel et méthodes</i>	
Figure III.1: Carte géographique montrant les stations de récolte	29
Figure III.2: Réaction du Chlorure d'aluminium et des Flavonoïdes	31
Figure III.3: Equation du radical DPPH transformé en DPPH	32
Figure III.4: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)-TPTZ et un antioxydant (AH)	33
<i>Chapitre IV : Résultats et discussions</i>	
Figure IV.1: Rendement d'extraction de la propolis de diverses régions géographiques	39
Figure IV.2: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénolstotaux	40
Figure IV.3: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux	42
Figure IV.4: Les pourcentages d'activité antioxydante des standards	43

Figure IV.5: Les pourcentages d'activité antioxydante des extraits de la propolis de diverses origines géographiques	44
Figure IV.6: Droite d'étalonnage de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	46
Figure IV.7: Pouvoir réducteur des extraits et de l'acide ascorbique	48
Figure IV.8: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) de l'extrait de propolis	49
Figure IV.9: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) des NPs -ZnO synthétisées par L'extrait de propolis	50
Figure IV.10: Image MEB des NPs -ZnO biosynthétisées	51
Figure IV.11: Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS) du NP-ZnO	51
Figure IV.12: Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)	52
Figure IV.13: Effet antibactérien du NPs-ZnO sur les souches bactériennes à différentes concentrations (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)	53
Figure IV.14: Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries	55

## **Liste Des Tableaux**

### ***Chapitre I : Généralité sur la propolis***

Tableau I.1 : Origine botanique de la propolis	7
--	---

### ***Chapitre III : Matériel et méthodes***

Tableau III.1: Réactifs chimiques et matériel instrumental	29
--	----

Tableau III.2: Souches bactérienne testées	36
--	----

### ***Chapitre IV : Résultats et discussions***

Tableau IV.1: Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis	40
--	----

Tableau IV.2: La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis	42
---	----

Tableau IV.3: Les valeurs d'IC50 des différents extraits et les standards en mg/ml	44
--	----

Tableau IV.4: Le potentiel des antioxydants de l'extrait de propolis et le contrôle positive	47
--	----

## Sommaire

<i>Introduction générale</i>	1
------------------------------	---

### *Partie Théorique*

#### *Chapitre I : Généralité sur la propolis*

I.1. Un peu d'histoire	5
I.2. Définition	6
I.3. Origine botanique	6
I.4. Récolte de la propolis	8
I.4.1. Récolte de la propolis par les abeilles	8
I.4.2. Récolte de la propolis par l'homme	8
I.5. Composition	9
I.6. Caractéristiques physico-chimiques de la propolis	9
I.6.1. Caractéristiques physiques	9
I.6.2. Propriétés chimiques	10
I.7. Propriétés thérapeutiques	10
I.7.1. Activité antibactérienne	10
I.7.2. Activité antivirale	10
I.7.3. Activité antifongique	11
I.7.4. Activité anti- inflammatoire	11
I.7.5. Activité anticancéreuse	11
I.7.6. Activité antioxydant	11
I.8. Conservation de la propolis	11

#### *Chapitre II : Les nanoparticules oxyde de zinc*

II.1. Généralité sur les nanomatériaux	14
II.1.1. Terminologie et définitions	14
II.1.2. Mode de synthèse de nanomatériaux	15
II.2. Définition et caractérisation de NPs de ZnO	18
II.2.1. Les propriétés et les nanostructures du ZnO	18
II.2.1.1. Propriétés structurales	18
II.2.1.2. Propriétés physico-chimiques de ZnO	19
II.2.2. Les morphologies de ZnO	20
II.2.2.1. Nanofils	20
II.2.2.2. Nanofibres	21

II.2.2.3. Nanotubes	21
II.2.2.4. Nano-hélices	22
II.2.2.5. Nano-anneaux / nano-spirales / nano-ressorts	23
II.2.2.6. Cagepolyédrique	23
II.2.3. Les applications des NPs-ZnO	24
II.2.3.1. Utilisation de la poudre de ZnO	24
II.2.3.2. Utilisation de ZnO en couches minces	24
II.2.3.3. Utilisation biomédicale	25

## ***Partie Pratique***

### ***Chapitre III : Matériel et méthodes***

III.1 Matériel	29
III.1.1. Présentation de la matière biologique	29
III.1.2. Réactifs chimiques et matériel instrumental	29
III.2. Méthodes	30
III.2.1. Préparation des extraits	30
III.2.2. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols	30
III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux	30
III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes	31
III.2.3. Tests d'activité antioxydante in vitro	31
III.2.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)	31
III.2.3.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP- TPTZ) (Ferric Reducing Antioxydant Power)	32
III.2.3.3. Teste du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)	33
III.2.4. Biosynthèse des nanoparticules d'oxyde de zinc	34
III.2.4.1. Techniques d'analyse et de caractérisation	34
III.2.4.2. Activité antibactérienne de NPs- ZnO <i>in vitro</i>	35
III.2.5. Méthode d'analyse statistique	37

### ***Chapitre IV : Résultats et discussions***

IV.1. Rendement d'extraction	39
IV.2. Analyse quantitative des composés phénoliques	40
IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux	40
IV.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux	41
IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire	43
IV.3.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH	43
IV.3.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP- TPTZ) Ferric reducing-antioxydantpower	46

IV.3.3. Teste du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)	47
IV.4. Caractérisation des nanoparticules ZnO	49
IV.4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FTIR)	49
IV.4.2. Caractérisation par MEB couplée à l'EDX	50
IV.5. Détermination de l'activité antibactérienne des NPs-ZnO	52
IV.5.1. Effet des antibiotiques sur les différentes souches bactériennes	52
IV.5.2. Effet des NPs-ZnO sur les différentes souches bactériennes	53
<b><i>Conclusion générale</i></b>	56
<b><i>Références Bibliographiques</i></b>	59
<b><i>Annexes.</i></b>	69

## *Introduction générale*

### *Introduction générale*

Les produits de la ruche sont depuis des millénaires exploités par l'homme. Parmi ces produits, la propolis, qui est définie comme une matière mixte végétale et animale produite par les abeilles pour garantir l'asepsie de leur ruche. Elle est fabriquée à partir de leurs sécrétions et de substances, d'origines résineuse, balsamique et gommeuse, prélevées sur les arbres et les plantes. (*A. Russo et al ; 2004*)

Très complexe, la propolis est constituée de plus de 300 constituants, dont certains encore inconnus. Sa composition, de par ses origines végétales diverses, subit des variations importantes, mais de manière constante elle contient des résines, de la cire, des baumes, mais aussi des essences et du pollen. (*T. Masek et al ; 2018*)

La propolis est un sujet de recherche populaire dans le monde entier en raison de son potentiel thérapeutique. Différents travaux ont montré les variations de la composition chimique, et par voie de conséquence, l'activité biologique de la propolis associée à son type et à son origine géographique, et à son temps de la récolte et l'espèce d'abeille. (*M. Popova et al ; 2017*)

A cet effet, la propolis est extensivement utilisée dans l'industrie alimentaire, la médecine, la cosmétologie et en médecine vétérinaire et actuellement utilisée comme catalyseur dans la synthèse verte des nanoparticules en raison de ses propriétés désinfectantes, photochimiques, antifongiques, antiparasitaires, anti oxydantes et antibactériennes pour le renforcement du système immunitaire. (*Sh. Parisa, et al ; 2019*)

Les nanoparticules d'oxyde de zinc s'intéressent particulièrement à la recherche moderne de nanotechnologie en raison de ses propriétés uniques, qui peuvent être intégrées à une large gamme d'applications étendues telles que l'industrie médicale, les cosmétiques, les emballages alimentaires, la bioingénierie, l'électrochimie, la catalyse et l'environnement. (*D. Gnanasangeetha et al ; 2013*)

Dans le cadre explorer le règne naturel, afin de trouver de nouvelles substances bioactives, nous avons choisi l'étude de la propolis de plusieurs régions de l'Algérie avec l'objectif de comparer la richesse en polyphénols totaux et évaluer leur activité antioxydant de quatre extraits de propolis recueillies dans des régions de l'Algérie pour trouver celle qui correspond au meilleur emplacement, d'autre part pour mieux comprendre l'intérêt des substances bioactives de la propolis il nous a paru utile d'entreprendre ce présent travail qui porte sur la possibilité de synthèse de nanoparticules d'oxyde de zinc en utilisant les extraits de la propolis.

Pour réaliser cette recherche nous avons choisi la méthodologie adoptée à ce genre de thème qui est expérimentale et analytique basée sur l'analyse des échantillons de propolis et l'étude de la morphologie nanoparticules d'oxyde de zinc.

**Ce manuscrit se divise en deux parties:**

*La première partie théorique*, se propose de faire un point bibliographique sur la propolis du côté historique, ses origines, sa récolte, sa composition chimique, et ses propriétés thérapeutiques et encore présente des généralités sur les nanoparticules et les nanoparticules ZnO, leurs propriétés physico-chimiques, leurs différentes méthodes des synthèses et leurs domaines d'applications.

*La deuxième partie*, contient l'étude expérimentale, et subdivisé en deux chapitres :

- Le premier chapitre a groupé les méthodes et les techniques utilisées lors de l'extraction, la quantification des polyphénols et des flavonoïdes, ainsi, l'évaluation de l'activité anti oxydante, la biosynthèse des NPs-ZnO et leur application (activité antibactérienne).
- Le deuxième chapitre présente les résultats de nos expériences et leurs discussions.

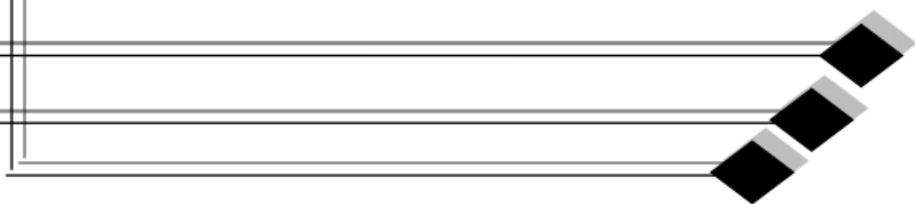
Finalement, nous avons clôturé la fin par une simple conclusion et des recommandations.



## *Partie Théorique*

Cette première partie bibliographique comporte deux chapitres: *le premier chapitre* contient des généralités sur la propolis, son origine botanique, sa récolte, ses propriétés physico-chimiques, sa composition, ses propriétés thérapeutiques et sa conservation.

*Le deuxième* consiste des généralités sur les nanoparticules et les nanoparticules de ZnO, leurs morphologies, leurs propriétés, leurs différentes méthodes des synthèses, ainsi que leurs domaines d'applications.



*Chapitre I*  
*Généralité sur la propolis*

La propolis est une substance produite par les abeilles, elle constitue un mélange de cire et de matériel botanique comme les bourgeons, les résines végétales. Elle est utilisée par les ouvrières pour colmater les trous et les fissures de leur ruche pour la protéger contre les conditions météorologiques défavorables et comme c'est une substance antiseptique, elle protège ainsi la ruche contre les contaminations bactériennes ainsi que les invasions étrangères. (*Philippe J. M ; 1999*) (*Andelkovi B et al ; 2016*)

La propolis est une matière première très étudiée et très utilisée de nos jours dans les secteurs alimentaires, Cosmétiques et pharmaceutiques.

### **I.1. Un peu d'histoire:**

Depuis l'antiquité, la propolis était employée comme moyen thérapeutique. Plus tard, les Égyptiens, les Perses, les Grecs, les Romains et même les Incas l'ont utilisée. (*Y. Donadieu; 1981*)

L'histoire atteste que les Égyptiens l'ont utilisée en médecine ainsi que pour embaumer les morts. (*Crane. E; 1999*)

Les Romains et les Grecs l'utilisaient également comme antiseptique et cicatrisant dans le traitement des plaies. (*Golder. W; 2004*)

Durant la même période, les Incas employaient la propolis qu'agent anti pyrétique. (*Castaldo. S et al; 2002*)

Les arabes connaissaient aussi la propolis. Abu Ali Iben Sina (Avicenne) a parlé de deux sortes de cire: la cire propre et la cire noire, cette dernière étant probablement la propolis. Il a dit : « par sa forte odeur, elle fait éternuer... » et « Elle a la qualité de faire éliminer les pointes des flèches et des épines, raréfie, nettoie facilement et amollit fortement » (*N. Cardinalat et al ; 2012*)

Les Géorgiens (ex URSS) l'utilisaient contre les inflammations de la cavité buccale et les caries dentaires. (*N. Cardinalat et al; 2012*)

Les ouvrages du Moyen Âge européen décrivent même les préparations médicales à base de propolis pour les traitements des maladies de la sphère ORL et de la respiration. Son activité anesthésiante reconnue permet à cette époque la chirurgie des fentes labiales chez l'enfant.

A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, la propolis était en plein essor grâce à ses vertus médicinales, employée sous forme d'onguent, d'emplâtre, de lotion ou de fumigation. De nos jours, elle est utilisée surtout en Europe de l'est, au Brésil, en Asie et notamment au Japon. (*Blanc.M ; 2010*)

Actualité les usages courants en médecine humaine se sont transmis jusqu'à nos jours. Durant ces trente dernières années, des recherches analytiques, pharmacologiques et cliniques ont été effectuées.

Elle est utilisée aussi dans le soutien et l'amélioration du système immunitaire.

Elle est largement utilisée aussi dans la dermatologie et la cosmétique. (*S. Bogdanov et al ; 2016*)

### **I.2. Définition:**

La propolis ou la colle d'abeille est une substance résineuse, gommeuse et balsamique élaborée à partir de la salive des abeilles et de la résine récoltée sur les conifères et les bourgeons de nombreux arbres telles que les chênes, peupliers, orme, saules, bouleaux, pruniers. (*A. Russo et al ; 2004*)








Cette résine végétale est utilisée par les abeilles à l'entrée de leurs ruches pour en protéger l'accès, c'est ce qui indique son étymologie Grecque *pro* qui veut dire « devant » et *polis* «la cité ». (*S. Bogdanov et al ; 2016*)

### **I.3. Origine botanique:**

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille. Tout cela explique que l'on trouve des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges. L'abeille va aller chercher sa résine dans son écosystème et c'est bien de cet écosystème que va dépendre la composition de la propolis. (*Burdock.G.A ;1998*) (*F. Galeotti et al ; 2018*)

Les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont représentées par différents conifères (pin, sapin, épicéa) et plusieurs espèces de peupliers (qui semblent la source la plus importante). (*Bankova.VS et al ;2000*)

Tableau I.1 : Origine botanique de la propolis (N. EL HOUSSEINI ; 2013)

Photos	Nom Français	Nom Anglais	Provenance
	Chêne	Oak	Asie Afrique
	Peuplier	Poplar	Afrique du nord Moyen Orient Europe
	Bouleau blanc	Birch	Europe du Nord Amérique Canada
	Orme	Elm	Amérique Europe chine
	Pine	Pine	Amérique du nord Europe du nord Russie
	Marronnier d'inde	Horse chestnut	Europe Turque Balkans
	Frêne	Ash	Europe du sud Afrique du nord

On peut également citer d'autres arbres connus dans nos régions pour être sources de propolis tels que: l'aune, le saule, le prunier.... etc.

#### I.4. Récolte de la propolis:

##### I.4.1. Récolte de la propolis par les abeilles

Le nombre de butineuses, spécialisées dans la récolte des résines et la fabrication de la propolis est relativement restreint au sein d'une colonie d'abeilles. (*Philippe. J.M; 1994*)

Les ouvrières butineuses localisent la source de résines et triturent celle-ci avec leurs mandibules, les mélangent à d'autres substances de leurs propres sécrétions afin de fabriquer de la propolis. Une fois fabriquée, la propolis est transportée à la ruche dans les cornicules situées dans les pattes postérieures de l'abeille. (*Philippe. J.M; 1994*)



**Figure I.1: Récolte de la propolis.** (*S. Bogdanov et al ; 2016*)

La quantité de propolis fabriquée dépend de la race d'abeille, de la flore butinée et de la saison. Au sein d'une même race, la quantité de propolis récoltée par les abeilles est de l'ordre de 100 à 300 g par ruche par an. (*Philippe. J.M; 1994*)

##### I.4.2. Récolte de la propolis par l'homme:

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses :

- 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. (*Eric Debuyser; 1984*)



**Figure I.2 : Propolis grattée des cadres.** (*Site web1*)

### I.5. Composition:

De manière générale, la propolis est constituée de 50% à 55% de résines et baumes, de 30% de cires et acides gras, de 10% d'huiles essentielles, de 5% de pollen et de 5% de substances organiques et minérales. (*S. El-Guendouz et al; 2018*)

Parmi ces dernières, on retrouvera beaucoup de flavonoïdes et autres dérivés phénoliques ainsi que leurs esters, des dérivés aromatiques volatils, des minéraux (fer, calcium, zinc, cuivre, manganèse) et des vitamines (C, E et du groupe B). (*M.J.G. Bùrquez et al 2018*)

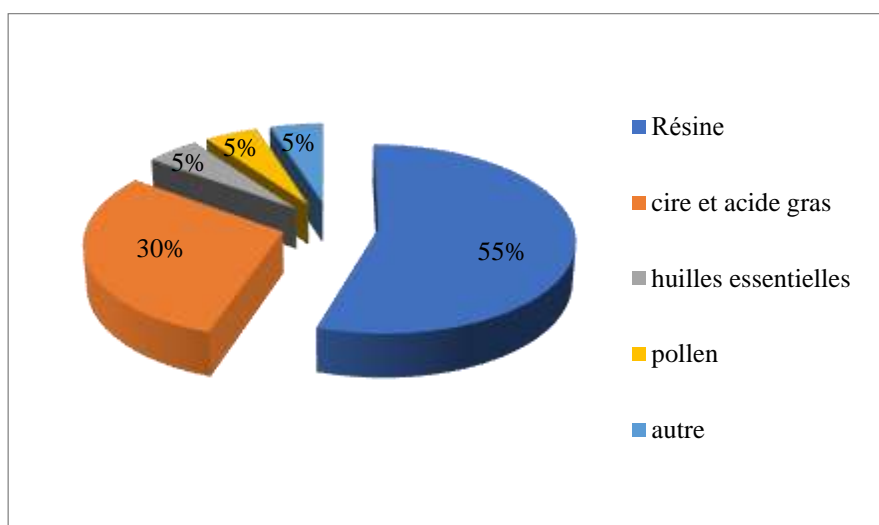


Figure I.3: Composition de la propolis

### I.6. Caractéristiques physico-chimiques de la propolis

#### I.6.1. Caractéristiques physiques

- **Consistance:**

La propolis est une substance de consistance variable suivant la température :

- 15 °C, elle est dure et friable.
- 30 °C elle est molle et malléable.
- Entre 30 °C et 60 °C elle est coulante et gluante, jusqu'à fondre en moyenne vers 60 -70°C ou plus. (*Y. Donadieu ;2008*)

- **Couleur:**

Très variable suivant sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toute la gamme des bruns. (*Y. Donadieu ;2008*)

- **Saveur:**

Elle est souvent âcre et parfois amère. (*Y. Donadieu ;2008*)

- **Odeur:**

Variable selon son origine botanique : en général arôme agréable et douceâtre, mélangé celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient. (*Y. Donnadieu ; 2008*)

### **I.6.2. Propriétés chimiques:**

- **Solubilité:**

La propolis est insoluble dans l'eau froid. Elle est, en revanche, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, etc. Il importe de noter que la propolis est beaucoup plus soluble dans une solution de soude caustique à 2%. (*Y. Donnadieu.2008*)

- **Point de fusion:**

Son point de fusion se situe autour de 70°C.

Chauffée au bain-marie, elle se divise en deux parties : Une partie visqueuse qui tombe au fond du récipient, une partie liquide appelée cire de propolis, qui reste en surface et qui a de nombreux usages dans le domaine apicole. (*Y. Donnadieu.2008*)

- **Densité:**

La densité de la propolis est de 1,2 (soit supérieure celle de l'eau). (*Y. Donnadieu.2008*)

### **I.7. Propriétés thérapeutiques:**

Un grand nombre de recherches études centrées sur les propriétés pharmacologiques et biologiques présents par propolis, la littérature scientifique a rapporté et confirmé bon nombre d'activités santé de la propolis. (*N. Cardinalat et al; 2012*)

#### **I. 7.1. Activité antibactérienne:**

De nombreux chercheurs ont été étudiés l'activité antibactérienne de la propolis et de ses extraits contre les bactéries de gram positif et de gram négatif. Ils ont trouvé que la propolis avait une activité antibactérienne contre une large gamme de souches à gram positif, mais leur nombre était limité ou aucune activité contre les souches à gram négatif. Parmi les bactéries inhibées, on retrouve des Staphylococcus, des Streptococcus, des Bacilles, des Salmonella, Escherichia coli. (*N. Cardinalat et al; 2012*)

#### **I.7.2. Activité antivirale:**

Grâce à la présence des flavonoïdes, la propolis est efficace contre le poliovirus, les virus de type Herpes (par des esters de l'acide caféique) et l'adénovirus, et présente aussi une relative efficacité dans la grippe, l'hépatite B ainsi que la zona. Même les propolis ne contenant que très peu de flavonoïdes

ont une action antivirale, expliquée par certains composants comme les sesquiterpènes ou les naphthoquinones (constituants actifs des essences végétales). (N. Cardinalat et al; 2012)

**I.7.3. Activité antifongique:**

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida*, mais aussi contre les champignons de type *Aspergillus* et *Mirosporium* ainsi que, contre les levures. (N. Cardinalat et al; 2012)

**I.7.4. Activité anti- inflammatoire:**

L'effet anti-inflammatoire de la propolis proche de l'aspirine, est dose dépendant. Les extraits aqueux donnent de meilleurs résultats. Les flavonoïdes en sont responsables, en inhibant la synthèse de NO et de PG, inducteurs d'inflammation et en supprimant la production de cytokines inflammatoires par les monocytes/ macrophages. Des études ont montré que son action est intéressante dans les trachéites et pharyngites liées à une intubation prolongée pendant une intervention chirurgicale. Les composés terpéniques agirait également dans l'action anti-inflammatoire. (Gharbi.M; 2011).

**I.7.5. Activité anticancéreuse:**

La propolis et ses composants phénoliques exercent un effet anticancéreux et des propriétés chimio-préventives par mécanisme d'action multiple affectant les voies apoptotiques dans des cellules cancéreuses. L'extrait de la propolis et les polyphénols isolés à partir de propolis ont été capables de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose induite par TRAIL. (Szliszka.E et al; 2013)

**I.7.6. Activité antioxydant:**

D'après les connaissances scientifiques, les antioxydants permettent de prévenir de nombreuses maladies de types dyslipidémie, hypercholestérolémie, diabète voire de cancer. Plusieurs études in vitro ont montré le pouvoir antioxydant de la propolis. La diminution du stress oxydant est due à la présence de polyphénols, de flavonoïdes ainsi que d'acide caféique et d'artépilline C. l'activité antioxydant de la propolis correspond à 70% de celle de la vitamine C. (Jean.N ; 2015)

**I.8. Conservation de la propolis:**

La propolis est un produit facile à conserver, quelle que soit la forme sous laquelle elle se présente. Il est toutefois préférable de la conserver dans des récipients hermétiques, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur. Pour bénéficier de toutes ses propriétés, il est recommandé d'utiliser la propolis aussi fraîche que possible. (Philippe. J.M;1994)

Elle présente un intérêt certain sous forme lyophilisée, car ce procédé de conservation assure, pendant un temps presque illimité, le maintien de toutes ses propriétés et de la

composition chimique du produit. Une première méthode de lyophilisation, brevetée aux Etats-Unis, propose une solution hydro-alcoolique de propolis évaporée sous vide à basse température. (*Philippe. J.M;1994*)

Une seconde méthode utilisée en Roumanie, propose une préparation préliminaire d'extrait mou de propolis par dissolution d'alcool éthylique. Cet extrait mou de propolis est ensuite dissout par le biais de solvants à groupe amino (amines organiques). La solution résultante est filtrée et les résidus de cire sont éliminés par précipitation. Elle devient alors soluble l'eau et cette solution aqueuse peut être lyophilisée sous vide et congelée. (*Philippe. J.M;1994*)

## *Chapitre II*

### *Les nanoparticules oxyde de zinc*

Les nanoparticules métalliques ont atteint une grande importance en raison de leur caractéristique unique. (*Garima. S et al ; 2011*) (*Vidhya. C et al ; 2013*)

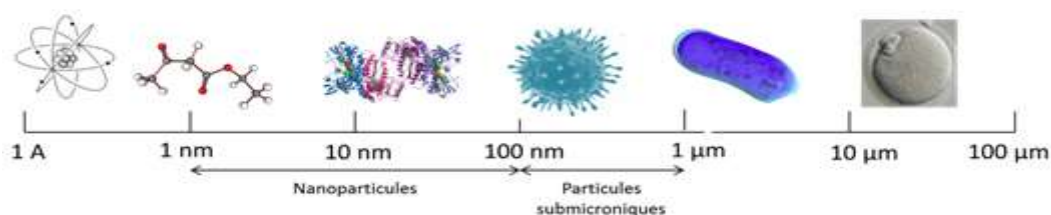
Ce qui attire tous les chercheurs scientifiques à se concentrer sur leur synthèse. (*Singh. R.P et al ; 2011*). Jusqu'à présent, plusieurs nanoparticules métalliques telles que l'argent, le cuivre, l'or, le fer, ont été explorées. Étant donné que de nombreuses recherches ont déjà été effectuées sur ces nanoparticules métalliques, Parmi les oxydes étudiés on trouve l'oxyde de zinc (ZnO) qui est parmi les oxydes métalliques retrouvés grandement dans l'environnement, présente des propriétés très intéressantes, et utilisé dans des domaines aussi divers et variés tels que les industries pharmaceutiques, électroniques, cosmétiques, médicales et dans le secteur chimique pour la catalyse. De plus, les nanoparticules d'oxyde de zinc agissent également comme un bon agent antimicrobien car elles montrent une activité antimicrobienne contre de nombreux organismes pathogènes. (*Hasna. A.S et al ; 2014*)

## II.1. Généralité sur les nanomatériaux:

### II.1.1. Terminologie et définitions:

- **Les nanotechnologies** : Ce sont l'ensemble des techniques qui permettent de fabriquer, de manipuler et de caractériser la matière à l'échelle nanométrique.

- **Un nanomatériau** : Est défini par la norme ISO TS 80004-1, est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. (*M. Ricard; 2012*)



**Figure II.1: Comparaison de la taille de nanoparticules à celles des principales structures chimiques et biologiques (*site web 2*)**

Il existe deux grandes familles de nanomatériaux :

- **Les nano-objets** qui sont des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique c'est-à-dire approximativement entre 1 et 100 nm. Parmi les nano-objets, il est possible de distinguer trois catégories:

- **Les nanoparticules** qui désignent des nano-objets dont les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique : nanoparticules de latex, d'oxyde de zinc, de fer et de cérium, d'alumine, de dioxyde de titane, de carbonate de calcium, ...etc .
- **Les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets** qui se rapportent à des nano-objets dont deux dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et la troisième dimension significativement supérieure (nanotubes de carbone, nanofibres de polyester, nanotubes de bore, etc.). Ces termes désignent des nano-objets longilignes de section comprise entre 1 et quelques dizaines de nm et de longueur comprise entre 500 et 10 000 nm ;
- **Les nano-feuillets, nano-plats ou nano-plaquettes** qui définissent des nano-objets dont une dimension externe se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres dimensions sont significativement supérieures (nano-feuillets d'argile, nano-plaquettes de séléniure de cadmium, etc.)
  - o **Les matériaux nanostructurés** : qui possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Parmi les matériaux nanostructurés, il est possible de distinguer plusieurs familles parmi lesquelles :
    - **Les agrégats et agglomérats de nano-objets** : Les nano-objets peuvent se présenter soit sous forme individuelle (c'est-à-dire sous forme de particules primaires) ou soit sous forme d'agrégats ou d'agglomérats dont la taille est sensiblement supérieure à 100 nm.
    - **Les nanocomposites** : Ces matériaux sont composés pour tout ou partie de nano-objets qui leur confèrent des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension nanométrique. Les nano-objets sont incorporés dans une matrice ou sur une surface afin d'apporter une nouvelle fonctionnalité ou de modifier certaines propriétés mécaniques, magnétiques, thermiques,..... etc
    - **Les matériaux nanoporeux** : Ces matériaux possèdent des pores de taille nanométrique. Les aérogels de silice sont des matériaux nanoporeux qui présentent d'excellentes propriétés d'isolation thermique. (*M. Ricard; 2012*)

### II.1.2. Mode de synthèse de nanomatériaux :

Les procédés actuels permettant la fabrication de nanomatériaux sont classés en quatre grandes catégories

- **Procédés par voie physique** : (*Charles P. Poole et al ; 2003*) (*K. Vijayaraghavan et al ; 2017*)
  - L'évaporation/condensation,
  - L'ablation laser,
  - La décharge électrique,
  - Les flammes de combustion,
  - La pyrolyse laser,

- Les micro-ondes,
  - L'irradiation ionique ou électronique,
  - La décomposition catalytique,
  - Les dépôts physiques en phase vapeur regroupés sous le terme de PVD (Physical Vapor Deposition), etc.
- **Procédés par voie chimique :** (*A. Demortiere et al ;2007*) (*K. Vijayaraghavan et al ; 2017*)
- Les réactions en phase vapeur regroupées sous le terme de CVD (Chemical Vapor Deposition),
  - Les réactions en milieu liquide : co-précipitation chimique, hydrolyse, etc.,
  - Les réactions en milieu solide,
  - Les fluides supercritiques avec réaction chimique,
  - Les techniques sol-gel : sol-gel à base de silice, alkoxyde de métal, etc.
- **Procédés par voie mécanique :** (*K. Vijayaraghavan, et al ; 2017*)
- Le broyage à haute énergie ou mécano-synthèse,
  - A consolidation et la densification,
  - Les techniques de forte déformation : torsion, friction, laminage, etc.
- **Procédés par voie biologique :**

Les différents procédés physico-chimiques cités précédemment utilisent des produits chimiques sont souvent toxiques et non respectueux de l'environnement.

Pour y remédier, des recherches ont été récemment menées sur la synthèse des nanoparticules en utilisant des produits biologiques naturels tels que les plantes. Ces produits sont utilisés sous forme d'extraits ou sous forme d'huiles essentielles solubles. L'intérêt de ce domaine de recherche est principalement au fait que les produits naturels n'agressent pas l'environnement et sont écologiquement satisfaisant.

Les extraits de plantes sont considérés comme des antioxydants et peuvent agir à la fois comme agents réducteurs et agents stabilisants. (*N. Jayachandra et al ; 2014*)

Au cours des dernières années, des nanoparticules de nombreux matériaux ont pu être synthétisées par ce mode de synthèse :

*D. Philip et al ; (2009)* ont utilisé le miel naturel pour une synthèse verte des nanoparticules d'or. L'éventuel agent réducteur est le fructose et les protéines présentes dans le miel sont responsables de la stabilisation.

**S. Yallappa et al ; (2013)** ont synthétisé des nanoparticules de cuivre de forme sphérique et détaillé d'environ 23 nm par irradiation micro-ondes en utilisant l'extrait d'écorce de *T.Arjuna* comme agent réducteur et agent stabilisant.

**D. Gnanasangeetha et al; (2014)** ont préparé par la méthode de synthèse verte en utilisant l'extrait de feuille aqueux d'*Acalypha indica* des nanoparticules oxyde de zinc. Ils se combinent avec les principes biologiques avec la procédure chimique et physique pour engendrer des particules nano de grandeur moyenne est 80 nm avec les fonctions précises.

**F. Gholamhoseinpoor et al ; (2015)** ont synthétisé des nanoparticules d'argent à température ambiante de taille moyenne de 20 nm en utilisant un extrait de plante de *Z. tenuior* (Zt).

**M. Bayrami et al ; (2020)** ont synthétisé des nanoparticules d'oxyde de zinc à température ambiante de taille moyenne de 19 nm en utilisant un extrait éthanolique de propolis.

## II.2. Définition et caractérisation de NPs de ZnO:

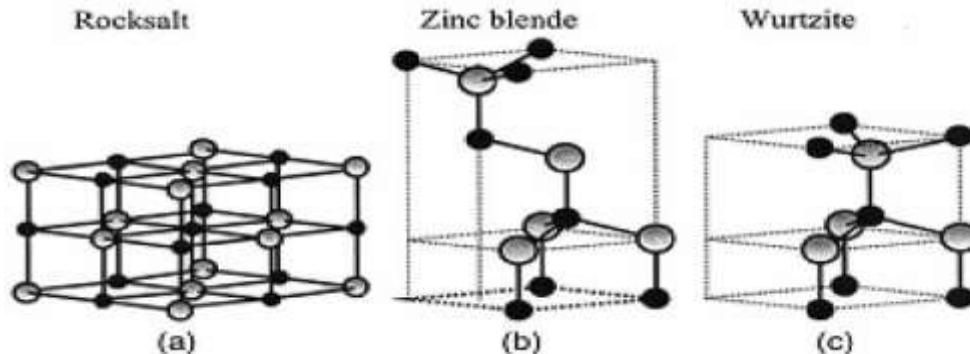
L'oxyde de zinc est un composé inorganique de formule chimique ZnO. Il apparaît généralement sous forme de poudre blanche, presque insoluble dans l'eau, largement utilisée comme additif dans de nombreux matériaux et produits biomédicaux. (*P.M. Martin et al ; 2000*).

ZnO est un semi-conducteur de la classe II-VI, de type n, car le Zinc et l'Oxygène appartiennent, respectivement, à la deuxième colonne du tableau périodique des éléments. Ce semi-conducteur possède plusieurs propriétés intéressantes : une bonne transparence, une mobilité des électrons importante, une large bande interdite et une forte luminescence à température ambiante. (*E. Harvey Brown ; 1957*)

### II.2.1. Les propriétés et les nanostructures du ZnO:

#### II.2.1.1. Propriétés structurales:

Composé binaire inorganique, Il existe sous trois formes cristallines différentes. La première est la structure cubique (Rock-Salt), qui apparaît sous des pressions très élevées, la seconde est la structure blende qui est instable et qui apparaît sous des pressions élevées, la troisième est la structure hexagonale stable dans les conditions normales. Ces structures sont illustrées sur la Figure II.2 .



**Figure II.2: Représentation des structures de ZnO : (a) cubique NaCl, (b) blende, (c) hexagonale wurtzite**

Dans des conditions normales de température et de pression, les paramètres de maille sont donnés par  $a = 0,325$  nm et  $c = 0,5206$  nm (*P. Muthukumar, et al 2013*). Le ZnO a aussi la propriété, dans certaines conditions, de posséder des atomes interstitiels, engendrés par l'espace vide entre les atomes de zinc et d'oxygène qui ne remplissent que 40% de l'espace cristallin.

Ne contenant pas de centre de symétrie, la structure compacte de type Wurtzite contient deux sous-systèmes de structure hexagonale, l'un de  $Zn^{2+}$  et l'autre de  $O^{2-}$ , décalés parallèlement à la direction  $[0001]$  définie par l'axe  $c$  (Figure II.3), selon laquelle la vitesse de croissance est plus élevée. Cette absence de symétrie lui confère la propriété de piézoélectricité et l'incorporation des défauts qui dépendent de la croissance anisotrope du ZnO le long de l'axe  $c$ . La superposition des

plans de Zn et O alternés, forment des tétraèdres dont chacun peut se partager soit avec un sommet, un bord ou une face d'un autre tétraèdre.

Cristallisée sous la forme de Wurtzite, ce matériau a la propriété d'être polaire suivant l'axe  $c$ . Par convention, la direction  $+c$  est définie par la face de l'atome de Zn, alors que la face O est notée par  $-c$ . Le ZnO possède ainsi une polarisation spontanée non nulle selon l'axe  $c$ , appelée polarisation spontanée, de valeur de  $-0,05 \text{ C/m}^2$  (A. Dal Corso, *et al* ; 1994).

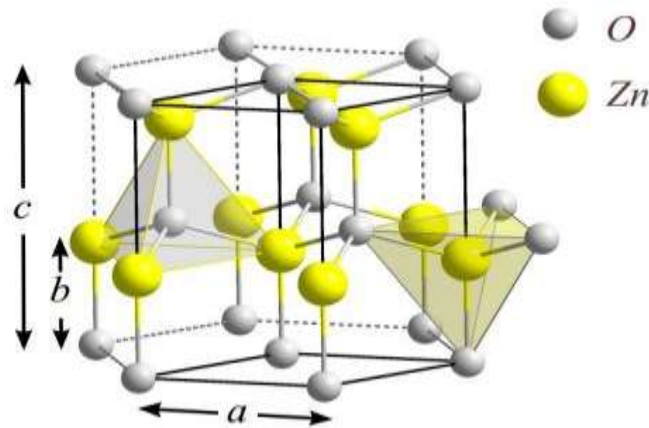


Figure II.3 : Maille primitive de la structure Wurtzite

### II.2.1.2. Propriétés physico-chimiques de ZnO :

Les caractéristiques physico-chimiques de l'oxyde de zinc sont les suivantes : (S. Liebus *et al* ; 2000), (P. Jenouvrier *et al* ; 2003) :

- Masse molaire :  $M=81.37\text{g}$ .
- Température de fusion très élevée :  $1975^\circ\text{C}$ .
- Mode de réseau : hexagonal.
- Densité :  $d=5.06\text{g/cm}^3$ .
- Force de liaison chimique O-Zn :  $66\text{Kcal/mol}$ .
- Résistivité électrique : à  $1073^\circ\text{K}$ ,  $\rho = 67\Omega\cdot\text{m}$  et  $1623^\circ\text{K}$ ,  $\rho=1.2\cdot 10^{-2}\Omega\cdot\text{m}$ .
- Température de vaporisation :  $1370^\circ\text{C}-1400^\circ\text{C}$ .
- Pression de vapeur : à  $1300^\circ\text{C}$ ,  $200\text{N/m}^2$ , à  $1400^\circ\text{C}$ ,  $400\text{N/m}^2$  et à  $1500^\circ\text{C}$ ,  $1387\text{N/m}^2$ .
- Solubilité : ZnO n'est pas soluble dans l'eau.

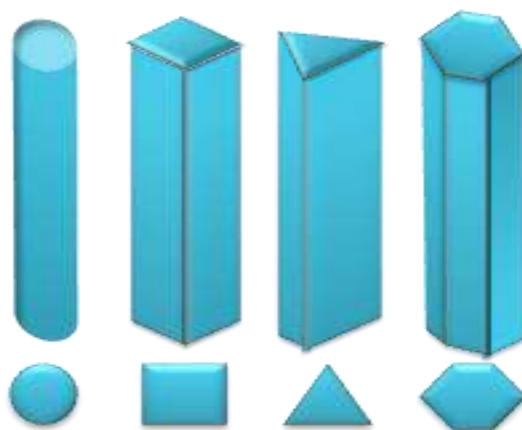
- Réaction avec l'oxyde de baryum :
  - $\text{ZnO (s)} + \text{BaO(s)} \rightarrow \text{BaZnO}_2 \text{ (s)}$  à 1100°C.
- Il est soluble dans l'acide chloridrique est forme  $\text{ZnCl}_2$ .
- Il est soluble dans l'acide acétique est forme l'acétate de zinc de forme  $\text{Zn(C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ .

## II.2.2. Les morphologies de ZnO :

Nous pouvons synthétiser une large gamme de nanostructures de ZnO de morphologies différentes.

### II.2.2.1. Nanofils:

Connus pour être des nanostructures longilignes, dont le diamètre est bien plus petit que la longueur, les nanofils ont des dimensions qui peuvent varier de quelques nanomètres jusqu'à une centaine de nanomètres pour le diamètre et de centaines de nanomètres à plusieurs micromètres pour la longueur. Cette structure est devenue l'objet de forte intensité de recherche, en raison de leur géométrie unique, car ils ont l'avantage d'avoir une structure unidimensionnelle qui leur confère une large surface spécifique par rapport au volume du matériau. Les nanofils aux faibles dimensions présentent différentes formes de section transversale (**Figure II.4**) circulaire, carré, triangulaire et hexagonale. En plus de ses bonnes propriétés structurales, le ZnO possède aussi des propriétés optiques très intéressantes. (*J.M. Chovelon et al ; 2006*)



**Figure II.4 : Classification des nanofils**

### II.2.2.2. Nanofibres:

Les nanofibres sont des fibres ultrafines avec de très petits diamètres, allant de quelques nanomètres à plus d'une centaine de nanomètres (Figure II.5). Ces structures sont particulièrement intéressantes en raison de leur grand rapport axial dû à leur importante longueur, qui a un impact direct sur les caractéristiques physico-chimiques du matériau. (Z.M. Huang *et al* ; 2003) (J.Park *et al*; 2009)

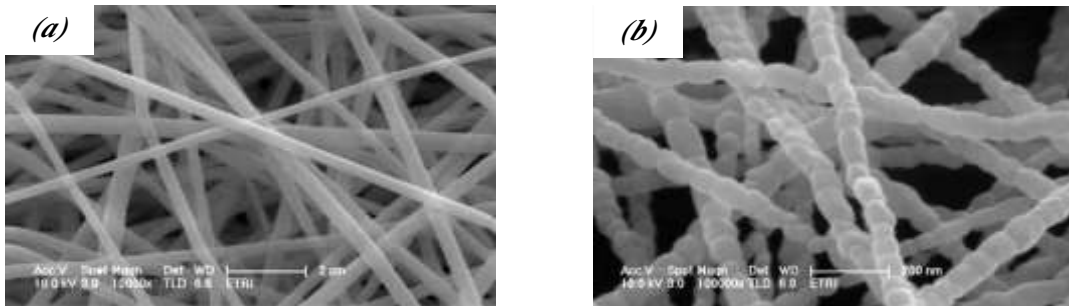


Figure II.5 : Images MEB : (a) fibres d'acétate de PVA / composites de zinc, (b) fibres après calcination à 700°C (J. Park *et al*; 2009)

### II.2.2.3. Nanotubes:

Depuis quelques années les nanotubes présentent un intérêt certain en raison de leur structure tubulaire, ainsi que de leurs propriétés optoélectroniques intéressantes similaires à celle des nanofils. Par contre, les rapports de surface-sur-volume et le facteur de rugosité ( $F_R$ ) de nanotubes sont plus élevés que ceux des nanofils, d'où l'intérêt de leur utilisation dans certaines applications (J. Elias *et al* ; 2008). La rugosité est un paramètre lié aux défauts micro-géométriques de la surface réelle. La Figure II.6 illustre les images MEB et TEM de nanotubes de ZnO.



Figure II.6: (a) Image MEB de nanotubes de ZnO, avec un agrandissement d'un nanotube. (J.X. Wang *et al* ; 2009)

#### II.2.2.4. Nano-hélices:

Les nano-hélices de ZnO peuvent être synthétisées par un procédé d'évaporation thermique, en présence des particules de catalyseur d'étain (Sn), obtenues par la décomposition du SnO<sub>2</sub> à haute température (Figure II.7). (P.X. Gao et al; 2004)

La croissance des nano-hélices de ZnO se déroule en deux séquences : la première comprend une croissance rapide nanofils de ZnO suivant l'axe [0001] (Figure II.8 (a)) ; la deuxième étape est la nucléation et la croissance épitaxiale de forme de nano-lames hexagonales, à la suite de l'arrivée de minuscules gouttelettes de Sn sur les faces  $\pm (2110)$ ,  $\pm (2112)$ ,  $\pm (1210)$  des nanofils de ZnO (Figure II.8 (b)). La longueur des tiges est assez homogène, mais elles sont beaucoup plus courtes que les nanofils. Les nano-lames croissent aussi transversalement le long de la surface (0110), alors que la croissance se poursuit le long de la surface (2110) ; ce qui entraîne des étapes de croissance vers la pointe (Figure II.8 (c)).

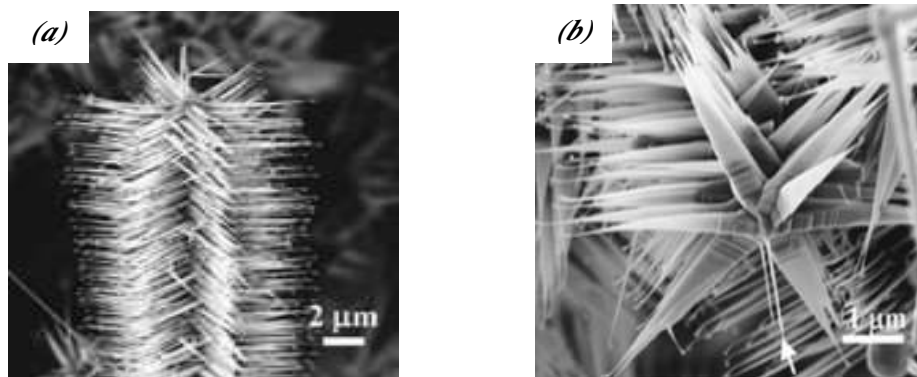


Figure II.7: Images MEB de nano-hélices. (P.X. Gao et al; 2004)

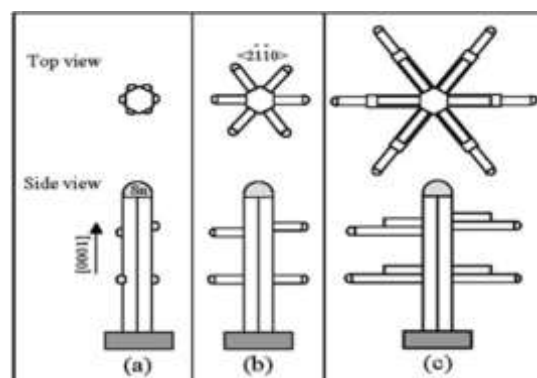
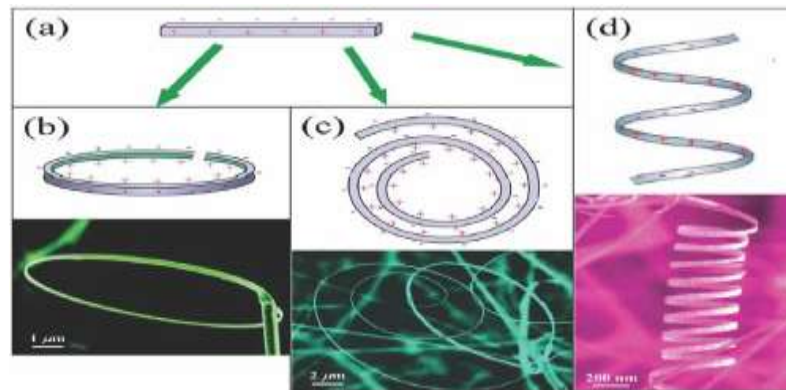


Figure II.8 : Mécanisme de croissance des nano-hélices. (P.X. Gao et al; 2004)

### II.2.2.5. Nano-anneaux / nano-spirales / nano-ressorts:

Il existe aussi d'autres variétés de nanostructures de ZnO, telles que les nano-anneaux, nano-spirales ou encore nano-ressorts. La croissance de ces nanostructures se base sur les surfaces polaires. Ces dernières représentent le bloc de construction de ces structures qui croissent le long du plan (1010), fermées par des surfaces latérales de  $\pm(1210)$ ; le sommet et le bas de la structure suivent les plans  $\pm(0001)$ . (X.Y. Kong *et al* ; 2003)

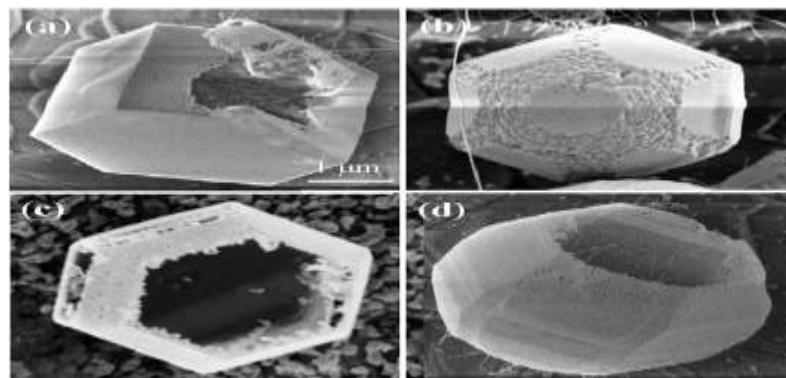
Ces structures sont obtenues par des nano-ceintures chargées en surface (Figure II.9 (a)), qui ont une flexibilité et une tenue mécanique extrêmement élevées. Si les charges ne sont pas compensées pendant la croissance, le matériau a tendance à se replier afin de réduire l'énergie électrostatique, et peut donner par la suite les différentes formes telles que : un anneau fermé formant une nano-bague (Figure II.9 (b)), une nano-spirale (Figure II.9 (c)), ou un nano-ressort (Figure II.9 (d)). (Z.L. Wang *et al* ; 2004)



**Figure II.9 :** (a) nano-ceinture polaire, (b) nano-bagues, (c) nano-spirales et (d) nano-ressort de ZnO (Z.L. Wang *et al* ; 2004)

### II.2.2.6. Cagepolyédrique:

Synthétisées par procédé de dépôt solide-vapeur, ces structures méso-poreuses ont une forme de tambour polyédrique structurée sous forme de cage sphérique et leurs coquilles texturées sont obtenues par un auto-assemblage de nanocristaux de ZnO suivant un processus d'oxydation de surface épitaxiale. (Figure II.10) (P.X. Gao *et al* ; 2003)



**Figure II.10 ;** Images MEB : (a, b) coquilles et (c, d) cages polyédriques de ZnO monocristallin (P.X. Gao *et al* ; 2003)

### II.2.3. Les applications des NPs-ZnO:

Depuis ces dernières années, les applications des nanostructures de ZnO ont reçu beaucoup d'attention en raison de ses multiples propriétés intéressantes (structurales, optiques, électriques, etc....) ; ce qui en fait un matériau très prometteur pour une large gamme de dispositifs, il est actuellement utilisé de plusieurs 100.000 tonnes par an, nous présentons quelques-unes ci-après. (*C. F. Klingshirn ; 2010*)

#### II.2.3.1. Utilisation de la poudre de ZnO:

L'industrie du caoutchouc est la plus grosse consommatrice d'oxyde de zinc, avec 57% du marché. On l'utilise pour améliorer la conductibilité thermique et la résistance et ralentit le vieillissement du caoutchouc. L'industrie de la peinture l'utilise également beaucoup car il permet d'obtenir un grand pouvoir couvrant, une meilleure rétention de la couleur, une durabilité plus grande et une protection contre les rayons ultraviolets, du fait de sa capacité à absorber ces rayonnements. Il entre également dans l'industrie des céramiques, en participant à la fabrication du verre, car il permet de diminuer le coefficient de dilatation. (*J. Whao et al ; 1988*) En présence de petites quantités d'oxydes métalliques (bismuth), l'oxyde de zinc présente d'excellentes propriétés électriques. Ceci permet de l'utiliser largement dans la protection de dispositifs électroniques et notamment dans les stations électriques à haute tension. (*M.K. Jayaraj et al ; 2002*)

#### II.2.3.2. Utilisation de ZnO en couches minces:

Grâce à ses propriétés semi-conductrices, piézo-électriques, optiques et catalytiques (*J. Nishino et al ; 1992*), l'oxyde de zinc en couches minces a de multiples applications. Il occupe une place importante dans l'industrie électronique. En raison de leurs propriétés piézo-électriques, des films de ZnO peuvent être utilisés comme détecteurs de pression (*J. D. H. Donnay et al ; 1973*), ou dans des dispositifs électroniques tels que les redresseurs, les filtres, les résonateurs pour les communications radio et dans les traitements d'image. (*Khaled Zhour ; 2014*).

Des couches minces d'oxyde de zinc peuvent servir également de capteurs chimiques très sensibles dans des détecteurs de gaz. (*S. J. Chen et al ; 2002*) Il est montré que des couches minces de ZnO, dopées à l'aluminium, présentent une très grande sensibilité et une excellente sélectivité pour des amines de type diméthylamine et triéthylamine.

Des revêtements d'oxyde de zinc peuvent être déposés sur des polymères et permettent ainsi d'augmenter leur durabilité. Les travaux réalisés par le laboratoire des matériaux inorganique (Université Blaise Pascal, France) montrent la grande efficacité des couches minces de ZnO déposées par pulvérisation cathodique pour protéger le poly éthylène-tétraphthalate (PET) ou le polycarbonate de bisphénol contre la photo dégradation. (*Père Roca et al 1988*) (*H. J. Michel et al 1998*)

**II.2.3.3. Utilisation biomédicale:**

Le développement de nanomatériaux biocompatibles, biodégradables et fonctionnalisés pour des applications biomédicales a été un domaine de recherche extrêmement dynamique plus importante de notre vie où l'utilisation de la nanotechnologie en médecine offre des possibilités intéressantes. (*Yin Zhang et al; 2014*) ( *Afaf D. Abd El Megid et al; 2018*)

Les NP synthétisées par des méthodes biologiques sont connues pour avoir d'immenses applications dans le domaine de la médecine et dans un système biologique en raison de leur stabilité dans divers milieux biologiques. (*A. Rastogi et al ; 2018*)

Les propriétés physicochimiques uniques NPs-ZnO permettent de créer de nouvelles structures, systèmes, nanoplates formes ou dispositifs avec des applications potentielles dans une grande variété de disciplines. L'une des caractéristiques les plus importantes des nanomatériaux ZnO est leur faible toxicité et leur biodégradabilité. De par leur taille, leur conférant des propriétés nouvelles. Ils sont utilisés dans de nombreux produits de la vie quotidienne. Ils s'agissent d'un produit de l'industrie pharmaceutique et cosmétique, antiseptique connu bien. (*A. Nicolosi; 2017*) Principalement en tant que systèmes d'administration de médicaments ciblés pour minimiser et effets négatifs de différentes maladies dégénératives chroniques comme retard. (*Sh. Parisa et al ; 2019*)

Par exemple, il existe de nombreux écrans solaires et cosmétiques produits actuellement sur le marché contenant des NPs - ZnO. Ils sont couramment trouvés dans les produits de soin solaire pour permettre un large spectre protection contre la lumière UV (*A. Rastogi et al ; 2018*)

Ils étaient employés en poudre (la poudre de bébé), ou encore incorporé à des onguents ou des pommades pour les affections de la peau, et aussi utilisé sous forme de baumes médicinaux pour le traitement de plaies ouvertes ou d'irritations des yeux, car il neutralise les productions acides tout en détruisant le plus grand nombre de bactéries présentes sur la peau et pommades antiseptiques. En effet, ils sont capables de pénétrer dans l'organisme, traverser différentes barrières biologiques telles les barrières alvéolaires, placentaire, ou encore hématoencéphalique, s'accumuler dans certains organes et potentiellement induire diverses pathologies. Pouvant s'agréger dans le cerveau. (*A. Nicolosi; 2017*)

Aujourd'hui, les chercheurs essaient d'utiliser des médicaments sous forme de nanoparticules plus efficaces, pour le traitement de diverses maladies. De nombreux rapports existent dans la littérature sur l'utilisation de nanomatériaux ZnO dans différentes applications biologiques et médicales.

Dans une étude intéressante, *Y. Zhang et al (2014)* ont présentés les propriétés souhaitables des nanomatériaux ZnO qui ont suscité un énorme intérêt dans les applications biomédicales.

Ont notés que le  $Zn^{2+}$  est un oligo-élément indispensable pour les adultes et il est impliqué dans divers aspects du métabolisme. 11,0 mg et 9,0 mg de  $Zn^{2+}$  par jour sont recommandés pour

les hommes et les femmes adultes aux États-Unis, respectivement. Chimiquement, la surface de ZnO est riche en groupes -OH, qui peuvent être facilement fonctionnalisés par diverses molécules de décoration de surface. Le ZnO peut se dissoudre lentement dans des conditions acides (par exemple dans les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral) et dans des conditions basiques fortes si la surface est en contact direct avec la solution

Dans une autre étude, réalisée in-vivo par **A. Nicolosi (2017)** sur des préparations de moelle-épine/le tronc cérébral ou de tranches bulbaires isolées. Elle est attachée à déterminer si les NPs, en particulier d'oxyde de zinc (ZnO), pouvaient modifier l'activité des réseaux de neurones responsables de la genèse des activités respiratoire et locomotrice.

**D. Rania et al 2017** ont fait une étude pour but de mesurer et d'optimiser l'activité microcicide des NPs -ZnO notamment pour la décontamination de surfaces. Qui ont montré que, même à basse concentration les nanoparticules d'oxydes de zinc présentent une activité bactérienne. Car à l'échelle nanométrique les nanoparticules possèdent une efficacité améliorée par rapport aux mêmes matériaux de plus grande taille due à leur surface spécifique.

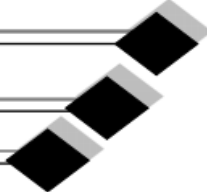
Et également **Afaf D. et ses collaborateurs (2018)** ont utilisé l'oxyde de zinc nanoparticules comme thérapie contre la coccidiose, qui est une infection protozoaire des animaux qui entraîne un retard de croissance et une mortalité élevée chez les lapins.

De plus, ces nanoparticules ont montré une cytotoxicité sélective pour les bactéries et une efficacité antimicrobienne contre divers agents pathogènes bactériens et fongiques en raison de la dissolution de la couche de ZnO de surface.



## *Partie Pratique*

Notre expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de l'université Hama Lakhdar d'El-oued. Cette étude comporte deux grandes parties: la première partie consiste à évaluer l'activité anti oxydante des différents échantillons de la propolis, la deuxième consiste à la synthèse verte de NPs-ZnO et évaluer leur activité antibactérienne.



***Chapitre III***  
***Matériel et méthodes***

III.1 Matériel:

III.1.1. Présentation de la matière biologique:

Quatre échantillons de propolis brute Algérienne ont été récoltés dans différentes régions géographiques au cours l’année 2019. Les quatre sites des ruches sont distribués comme suit dans l'Algérie: Tipaza, Tébessa, El-Oued et Constantine. Les échantillons de propolis ont été conservés à l'obscurité et à 4°C jusqu'à leurs utilisations.

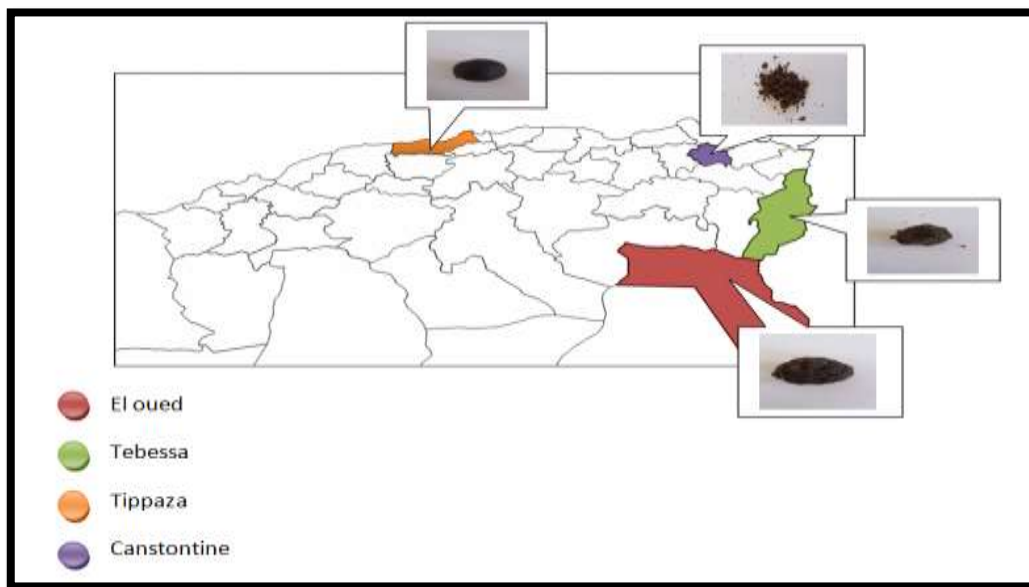


Figure III.1: Carte géographique montrant les stations de récolte

III.1.2. Réactifs chimiques et matériel instrumental:

Tableau III.1: Réactifs chimiques et matériel instrumental

Matériels	Verrerie	Réactif et produits chimique
Rotavapor , Centrifugeuse, pH-mètre, Spectrophotomètre UV-visible - Balance analytique, Plaque chauffante agitateur, Etuve, Bec benzene, Autoclave Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) Microscopie électronique à balayage (MEB)	Becher, Spatula, Erlenmeyer, Flacon, Cristallisoire, Verre de montre, Papier aluminium- Entonnoire, Papier filtre, Papier Wattman, Pipette, Micropipette, Tube sec, Boîte pétri.	Ethanol, Méthanol Acétate de zinc, Hydroxyde de sodium, Folin Ciocalteu, Carbonate de sodium, Acide gallique, Trichlorure d’aluminium, Acide ascorbique, Quercetine, DPPH, DMSO Solution tampon phosphate pH=6.6, Ferricyanure de potassium, Trichlorure de fer, Acétate de sodium, Sulfate de fer, Acide chlorhydrique, 2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine (TPTZ)

### III.2. Méthodes:

#### III.2.1. Préparation des extraits:

Les composés phénoliques totaux de la propolis ont été extraits en utilisant comme solvant l'éthanol 70%. Celui-ci possède l'avantage d'être plus facilement éliminé sous vide, il donne en plus un meilleur rendement d'extraction (7 fois plus que celui d'eau) et il évite l'extraction de la cire qui se trouve mélangée. (*Ribéreau-Gayon ; 1968*)

- La propolis de chaque région est coupée en petits morceaux puis lissée pour macération dans le solvant (10g de propolis dans 100 ml d'éthanol 70%) afin d'extraire à la fois la partie soluble dans l'eau et celle soluble dans l'alcool (*S. Touzani, et al ; 2018*)

- Une agitation magnétique avec peu de chauffage pour confirmer que les morceaux de propolis est imprégnée par le solvant. Après l'incubation pendant 24 heures à l'abri de la lumière, le mélange est filtré sur un papier filtre. 100 ml d'éthanol 70% est ajouté aux résidus de première filtration pour effectuer la deuxième macération. Après 48 heures d'incubation, le mélange est filtré. (*I. Escriche et al ; 2018*)

- Les extraits hydroalcooliques récupérés sont réunis et conservés dans le réfrigérateur pendant une heure et ont été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min (*S. Touzani et al ; 2018*)

- Une évaporation de solvant par rotavaport à 45°C. (*F.A.Badria et al ; 2018*)

- Les extraits ainsi obtenus, ont été conservés à 4°C dans des flacons en verre bien fermés et conservés à l'abri de la lumière.

#### Rendements d'extraction:

Le rendement de l'extrait de la propolis a été calculé selon la formule suivante: (*I. Escriche et al ; 2018*)

$$R (\%) = [(P1-P2) / P] \times 100$$

P: Poids de la propolis de départ.

P1: Poids du ballon après évaporation.

P2: Poids du ballon vide.

#### III.2.2. Méthodes de caractérisation quantitative des polyphénols

##### III.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux:

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode colorimétrique de (*Singleton & Rossi ; 1965*) a été déterminée par le Folin-Ciocalteu.

On commence par mélanger 200 µl de chaque extrait de propolis avec un 1 ml de réactif Folin-ciocalteu dilue 10 fois, et 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7,5%. Les

tubes sont agités et laisser incuber 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue contre un blanc (eau distillée à la place de l'échantillon dans un même volume réactionnel) à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible.

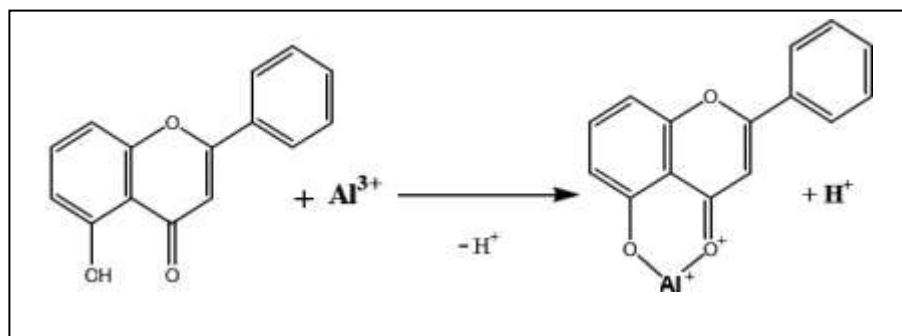
Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations.

Le contenu phénolique total a été exprimé en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon. (Figure IV.2)

### III.2.2.2. Dosage des flavonoïdes:

La teneur en flavonoïdes des différents extraits de propolis a été déterminée selon la méthode (*Djeridane et al ; 2006*) qui utilise le trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) comme réactif (Figure III.2).

La procédure consiste à mélanger 1,5 ml des différents extraits de propolis avec 1,5 ml de solution d' $AlCl_3$  à 2% qu'on laisse réagir 30 min avant de lire l'absorbance contre un blanc à 430 nm.



**Figure III.2: Réaction du Chlorure d'aluminium et des Flavonoïdes. (*Ribéreau-Gayon ; 1968*)**

Une solution méthanolique de quercétine a été préparée à différentes concentrations permettant de tracer la courbe d'étalonnage. (Figure IV.3)

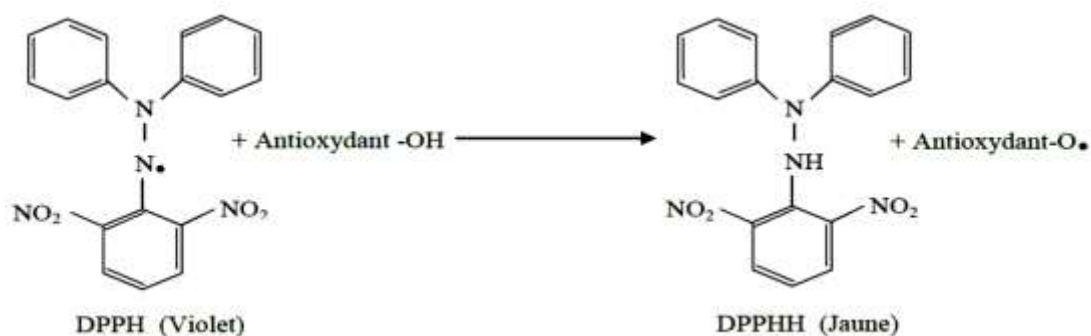
Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme d'échantillon.

### III.2.3. Tests d'activité antioxydante in vitro:

L'activité antioxydante d'un extrait correspond à sa capacité à protéger un substrat de l'oxydation, notamment par le piégeage des radicaux libres. Trois méthodes ont été choisies afin d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de propolis sont: le radical DPPH le radical TPTZ et le test FRAP.

#### III.2.3.1. Test d'activité anti-radicalaire (DPPH):

Cette méthode est basée sur la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH (2,2 – Diphényl- 1-picrylhydrazyle) de couleur violette foncée, qui se transforme en coloration jaunâtre (Figure III.3) cette délocalisation mesurable par spectrophotométrie.



**Figure III.3: Equation du radical DPPH transformé en DPPH (H.Talbi et al ; 2015)**

Le teste de DPPH a été réalisé selon le protocole décrit par *Brands-williams et al (1995)*. Une série de solution à différentes concentrations de chaque extrait est préparée, 100  $\mu$ l de chacune sont ajoutés à 2,9 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,025g/l) parallèlement, un témoin négatif est préparé en remplaçant l'échenillant par 100  $\mu$ l de méthanol. Après de 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard: l'acide ascorbique et  $\alpha$ -tocophérol dont l'absorbance a été mesuré dans les mémés conditions que les échantillons et pour chaque concentration. L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage I% est estimée selon l'équation suivante: (*M. L. Belfar et al ; 2015*)

$$I \% = [(A_{blanc} - A_{\acute{e}chantillon}) / A_{blanc}] \times 100$$

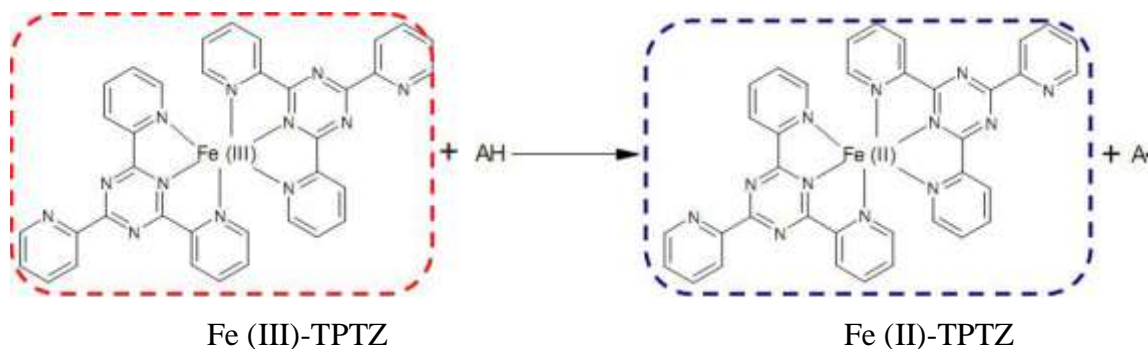
$A_{blanc}$ : absorbance du blanc

$A_{\acute{e}chantillon}$ : absorbance de l'échantillon

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant des extraits, nous avons introduit le paramètre  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du fonction de différentes concentrations des extraits testés, la valeur d' $IC_{50}$  la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. Les résultats sont exprimés en mg/ml. (3 répétitions pour chaque concentration). (*M. L. Belfar et al ; 2015*)

### III.2.3.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP- TPTZ) (Ferric Reducing Antioxydant Power)

La méthode FRAP développée par *Benzie et Strain (1996)* correspond à la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe (III)-TPTZ)<sub>2</sub>] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe (II)-TPTZ)<sub>2</sub>] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer (Figure III.4).



**Figure III.4: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)-TPTZ et un antioxydant (AH). (Thomas; 2011)**

Le test FRAP a été réalisé selon la méthode de *Benzie et Strain (1996)* avec quelques modifications. La solution de travail FRAP est préparée en mélangeant dans un rapport de volume 10:1:1 les trois solutions suivantes: une solution tampon d'acétate de sodium à 300 mM (3.1 g  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  et 16 mL  $C_2H_4O_2$  pH= 3.6), une solution TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) à 10 mM (HCl 40 mM comme solvant) et une solution de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  à 20 mM respectivement.

La solution de travail FRAP est maintenue dans un bain thermostaté à 37°C. Le test consiste à faire réagir, dans des tubes à hémolyse en verre, 150  $\mu$ l de chaque extrait avec 2850  $\mu$ l de la solution de travail FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 593 nm après 30 min d'incubation à température ambiante. (*K. Thaipong et al ; 2006*)

Tous les traitements ont été effectués en triple et l'acide ascorbique (vit C) a été utilisé comme témoin positif. Le potentiel des antioxydants de l'extrait de propolis à réduire  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  a été exprimé en  $\mu$ mol  $Fe^{2+} g^{-1}$  d'extrait de propolis à l'aide d'une courbe d'étalonnage de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  à différentes concentrations (Figure IV.6). On a supposé que plus la valeur de FRAP mesurée était élevée, plus la teneur en antioxydants de l'extrait de propolis pouvait réduire l'ion ferrique en ion ferreux. (*Solange M.Cottica et al; 2011*)

### III.2.3.3. Teste du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP):

Ce teste consiste à déterminer la capacité des échantillons à apporter des électrons. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extrais testés à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). En effet le  $Fe^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (*Oyaizu ; 1986*). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extrais testés. (*J.Hubert; 2006*)

A 500 $\mu$ l de l'échantillon à différentes concentrations on ajoute 1,25 ml d'une solution tampon phosphate pH 6,6 (0,2 M) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.

Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes, 1,25 ml de l'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. 1,25 ml du surnageant sont ajoutés à 1,25 ml d'eau distillée et 250µl d'une solution de trichlorure du fer ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 0,1 %. (*A.A. Erdag et al ; 2008*)

La lecture des absorbances se fait contre un blanc (assemblage préparé, en remplaçant l'échantillon par l'eau distillée pour permet de calibrer l'appareil) à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. (*Chung Y-C et al ; 2002*)

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes conditions expérimentales. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

#### **III.2.4. Biosynthèse des nanoparticules d'oxyde de zinc:**

Dans ce travail, nous avons synthétisé les NPs d'oxyde de zinc à l'aide de l'extrait de propolis de Tipaza. Nous présenterons par la suite le protocole de synthèse verte des NPs-ZnO:

50 ml d'acétate de zinc dihydrate 0,5 M ont été préparés en utilisant de l'eau désionisée. 1 ml d'extrait de propolis de Tipaza a été ajouté lentement sous une agitation continue pendant 10 minutes. Afin de maintenir le pH 12, on ajoute l'hydroxyde de sodium 2 M pour avoir atteint le pH souhaité (pH=12), le mélange a été laissé dans l'agitateur pendant 2 heures jusqu'à ce que la formation de précipité blanc soit observée. Ce mélange a été centrifugé à 3 000 tr / min pendant 20 minutes. Le culot a été lavé avec de l'eau désionisée suivie par l'éthanol pour enlever les impuretés. Ensuite, une poudre blanche de NPs-ZnO a été obtenue après le fait de sécher à 60°C dans l'étuve pendant la nuit. (*D. Gnanasangeetha et al ; 2013*) (*L.F.A. Anandraj et al ; 2015*)

##### **III.2.4.1. Techniques d'analyse et de caractérisation:**

La structure, la forme et la taille des nanoparticules de ZnO synthétisées ont été analysées par MEB, L'analyse des éléments a été obtenue à partir de la diffraction des rayons X à dispersion d'énergie (EDS), qui a été attachée avec du MEB. En plus de fournir des informations sur la structure chimique d'un échantillon, la spectroscopie infrarouge (FTIR) est également utilisée pour identifier les groupes organiques et indique la présence physique ou mécanique des particules.

- **Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR):**

- a. Principe:**

- L'infrarouge est une méthode très utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés ou de leurs groupements fonctionnels (liaisons chimiques) dans un mélange d'extraits. L'identification des liaisons se fait à l'aide du nombre d'onde correspondant et la détermination de groupe caractéristique par un spectre d'un composé inconnu qui sera identifié par comparaison à la bibliothèque des composés connus. (*S. Parisa et al ;2019*)

**b. Appareillage:**

Les échantillons ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de type Agilent Cary 630 (Agilent Technologies) disponible au Laboratoire de chimie du département science de matière. 8 balayages par échantillon dans la région de  $(4000-400) \text{ cm}^{-1}$ . (8 balayages / spectre avec une résolution nominale de  $16 \text{ cm}^{-1}$ ).

**• Microscopie électronique à balayage (MEB):****a. Principe:**

La microscopie électronique à balayage permet de balayer une partie de la surface de l'échantillon à l'aide d'un faisceau électronique d'un diamètre de quelques nanomètres. Contrairement à la microscopie optique, cette méthode permet de visualiser des caractéristiques morphologiques avec un agrandissement élevé et une profondeur de champ accrue. En outre, il se crée une interaction entre le faisceau électronique et les enveloppes atomiques des éléments du matériau à analyser. Pendant le balayage, il se crée un rayonnement par fluorescence X qui peut être enregistré par un système d'analyse dispersive en énergie (EDS) et utilisé à des fins d'analyse. (*S. Sofiane; 2014*)

**b. Appareillage:**

Les échantillons ont été visualisés sur un microscope électronique à balayage **Phenom Pro Desktop SEM** avec une plage de grossissement optique de 20 à 134 ×, une plage de grossissement électronique de 160 à 150 000 ×, un zoom numérique maximal de 12 ×, des tensions d'accélération de 5, 10 et 15 kV, un détecteur d'électrons rétrodiffusés. (BSD) et des détecteurs de spectromètres à rayons X à dispersion d'énergie (EDS), avec une résolution nominale de 6 nm ou moins. Le microscope possède un porte-échantillon à température contrôlée (plage de température  $-25^\circ \text{C}$  à  $50^\circ \text{C}$ ).

**III.2.4.2. Activité antibactérienne de NPs- ZnO *in vitro*:**

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des différentes concentrations de l'extrait de NPs-ZnO est la méthode des disques en papier. Cette technique repose sur l'apparition d'une zone d'inhibition dans le milieu de culture autour du disque contenant l'extrait testé.

**• Souches microbiennes testées:**

Cinq souches bactériennes (Tableau III.2) ont été mises à notre disposition par le laboratoire. Ces souches regroupent des bactéries Gram + et Gram -.

Tableau III.2: Souches bactérienne testées

Bactérie	Souches testées
Gram (-)	Escherichia coli (ATCC25922) Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) Salmonella enterica serovar (TyphiATCC14028)
Gram (+)	Bacillus subtilis (ATCC 6633) Staphylococcus aureus (ATCC 25923)

Les microorganismes sélectionnés dans cette étude étaient à la fois saprophytes et pathogènes, avec une grande diffusion dans le corps humain, le tractus gastro-intestinal des ruminants et l'environnement naturel tel que le sol, l'eau et peut être trouvée dans les aliments contaminés.

- **Préparation des souches bactériennes (repiquage):**

Les souches testées doivent être pures et obtenues d'une culture bactérienne jeune de 24h car elles doivent avoir le même état physiologique au moment où elles entrent en contact avec l'agent antimicrobien, donc qu'elles aient toutes la même sensibilité vis-à-vis de la substance testée. La concentration de germes est d'environ 10UFC/ml (UFC: unité formant colonies). (*Leclerc et al ; 1983*)

Les souches bactériennes ont été repiquées, en prélevant 3 à 5 colonies qui seront dissociées dans un tube à essai contenant 5ml de l'eau physiologique stérile 0.9 %, puis sont ensemencées dans des boîtes gélose à l'aide d'écouvillons stériles et incubées à 37°C/24h. L'isolement de ces bactéries a été effectué par la méthode des stries sur la gélose nutritive.

- **Préparation des dilutions des extrais:**

Différentes concentrations (10mg/ml; 5 mg/ml; 2.5mg/ml) d'extrait de nanoparticule d'oxyde de zinc ont été préparé par DMSO.

- **Préparation de L'inoculum:**

À partir d'une culture de 24 heures, quelques colonies bien isolées parfaitement identiques ont été prélevées dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % suivi d'une agitation.

L'ensemencement doit se faire en moins en quelque minute après la préparation de l'inoculum.

- **Ensemencement:**

L'ensemencement est réalisé selon la technique du (*NCCLS, 2002*), la culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzène. Le milieu nutritif est coulé dans des boîtes de pétri (4mm d'épaisseur). Les boîtes sont refroidies et séchées à température ambiante puis sont ensemencées à partir des suspensions bactériennes à l'aide d'écouvillons stériles. L'écouvillon est imbibé de la

suspension bactérienne puis essoré contre la paroi interne du tube à essai. L'ensemencement se fait par des stries serrées, de haut en bas et l'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte à chaque fois. L'écouvillon est par la suite passé sur toute la périphérie de la gélose.

Dans chaque boîte, 3 disques de papier absorbant Wattman de 6 mm de diamètre stérilisés à l'autoclave (121°C pendant 20 minutes) ont été déposés. 3 disques recevront 10 µl chacun des différentes concentrations des extraits de NPs-ZnO et un disque pour le contrôle négatif qui recevra 10µl de DMSO. L'incubation a été effectuée à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour toutes les bactéries. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre des zones d'inhibitions autour des disques. (*Karabay et al ; 2007*)

- **Etude l'effet des antibiotiques sur les souches bactériennes:**

Pour mettre en évidence la présence ou l'absence de l'effet des antibiotiques sur les souches testées, on utilise dans ce travail: la Gentamicine, Vancomycine, Pénicilline.

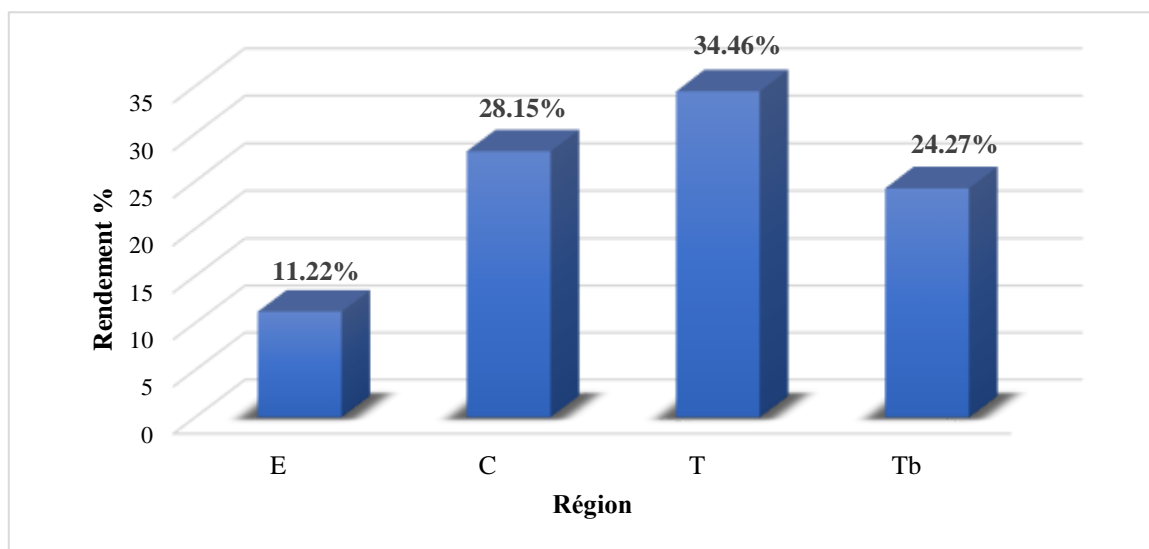
### **III.2.5. Méthode d'analyse statistique:**

Les résultats obtenus des tests effectués sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type moyenne, n = 3 en utilisant le logiciel MINITAB (version 13 Fr). Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft EXCEL (version 2016).

*Chapitre IV*  
*Résultats et discussions*

#### IV.1. Rendement d'extraction:

Les rendements d'extraction des composés phénoliques de propolis sont illustrés dans la figure ci-dessous:



**Figure IV.1: Rendement d'extraction de la propolis de diverses régions géographiques**

Sachant que l'extraction a été réalisée par l'éthanol 70%. Ces extraits renferment tous les composés qui peuvent être extraits par le solvant. Le rendement a été déterminé par rapport à 10g de propolis brute. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p/p).

Après le calcul de rendement d'extraction de propolis de chaque région, Nous constatons que les rendements de l'extraction hydroéthanolique varient considérablement. L'échantillon de Tipaza donne clairement le meilleur rendement (34,46%), suivi par l'extrait de Constantine (28,15%), puis l'extrait de Tébessa (24,27%), puis l'extrait d'El-Oued (11,22%).

Ces résultats plus proches à ceux trouvés par (*M. L. Belfar et al ; 2015*) ont indiqué des rendements de l'ordre de 41.10%, 30.01%, 23.18% et 15.57% respectivement pour la propolis du Boumerdes, de Mostaganem, de Bejaia et de Ghardaïa, et aussi la propolis de l'Irak 34.12% (*A.M.S. Ibrahim ; 2018*). Mais plus faible de ceux trouvés par (*I. Escriche et al ; 2018*) ont indiqué 69.6% ,56.8% et 46.5% respectivement pour la propolis de Roumanie, d'Espagne et de Honduras.

Cette variation est liée aux caractéristiques de la propolis brute influencées par, la saison de récolte, les espèces d'abeilles et la flore régionale. (*M.Popova et al; 2010*)

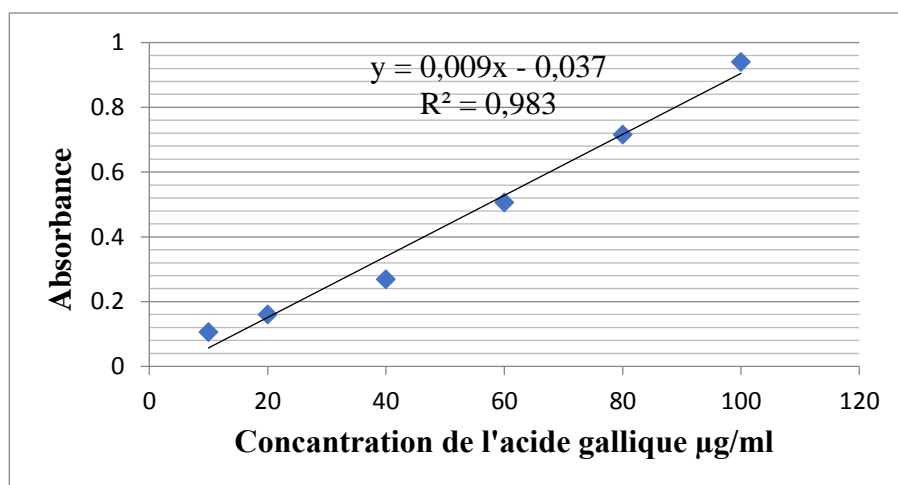
De plus ce taux varie avec l'augmentation du temps, le solvant et la méthode de macération, cependant la composition qualitative reste la même. (*Silva et al ; 2006*)

## IV.2. Analyse quantitative des composés phénoliques:

### IV.2.1. Dosage des polyphénols totaux:

L'étude quantitative des extraits éthanoliques bruts au moyen du dosage par spectrométrie utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols, en utilisant comme standard l'acide gallique. Le dosage au réactif de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols ; il réagit avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane, protéine, acide tartrique et les sulfites) et d'autres composés.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait (mg EAG/g Ex), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Figure IV.2)



**Figure IV.2:** Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Les résultats de dosage des polyphénols totaux dans les échantillons de propolis analysés sont rapportés dans le Tableau IV.1

**Tableau IV.1:** Teneurs en polyphénols des différents échantillons de propolis.

Les échantillons	Quantité de polyphénols en mg EAG/g d'extrait
T	384.7± 18.0
C	105.17±2.77
Tb	353.2±13.9
E	42.12±1.42

Compte tenu des résultats obtenus, nous remarquons que la teneur en polyphénols totaux est différente d'un échantillon à un autre. Ces résultats montrent que l'extrait de la propolis de Tipaza représente la teneur la plus élevée en polyphénols  $384.7 \pm 18.0$  mg EAG/g par rapport aux autres régions, suivi par l'échantillon de Tébessa dont la teneur est de  $353.2 \pm 13$  mg EAG/g d'extrait, puis l'extrait de Constantine  $105.17 \pm 2.77$  mg EAG/g, alors que la teneur la plus faible en polyphénols dans l'échantillon d'El Oued  $42.12 \pm 1.42$  mg EAG/g.

Les investigations faites sur la détermination de la teneur en polyphénols totaux de la propolis d'abeille sont nombreuses, et les résultats sont différents d'une étude à l'autre, on peut citer quelques-unes:

La teneur en polyphénols totaux de la propolis Espagnole est de l'ordre de 386 mg EAG/g (*I. Escriche et al ; 2018*). Cette valeur est en accord avec celle trouvée avec la propolis de Tipaza.

L'étude réalisée sur la propolis du Portugal, montre des teneurs en polyphénols totaux oscillant entre  $151,00 \pm 0,01$  et  $329,00 \pm 0,01$  mg EAG/g de propolis respectivement pour la région de Fundao et Borne. (*L. Moreira et al ; 2008*)

Les travaux réalisés sur la propolis Iraquienne, ont rapporté des teneurs en composés phénoliques de l'ordre de  $31.25\% \pm 1,08$  mg/g (*A.M.S. Ibrahim ; 2018*), Cette valeur est inférieure à celles trouvés dans la présente étude, tandis que d'autres études ont noté des résultats comparables aux nôtres.

Une étude réalisée sur la propolis de quelques régions de Croatie indique que les valeurs en composés phénoliques oscillent entre 141.34 et 215 mg/g de propolis. (*T. Masek et al ; 2018*)

Ce constat est conforme à ce qui est rapporté dans la littérature, à savoir que les différences existantes entre les teneurs en polyphénols obtenues pour les extraits poussant dans différentes régions d'études sont liées aux facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique), géographique (altitude, nature du sol, taux d'exposition au soleil) et morphogénétiques (*Levizou et al ; 2004*), ou/et aux conditions expérimentaux: les procédures d'extraction, le dosage et les différents solvants utilisés dont le contenu phénolique dans les extraits de l'échantillon dépend également du type d'extrait, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction. (*N. Boizot et al ; 2006*)

#### **IV.2.2. Teneurs en flavonoïdes totaux:**

La détermination quantitative des flavonoïdes s'effectue par la méthode de Trichlorure d'Aluminium, celle-ci est la plus employée, elle se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de propolis brut (mg EQ/g de propolis). Les taux des flavonoïdes des extraits éthanolique de la propolis ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage (Figure IV.3) qui suit une équation de type:  $y = 0,028x + 0,010$  sachant que  $R^2 = 0,998$ .

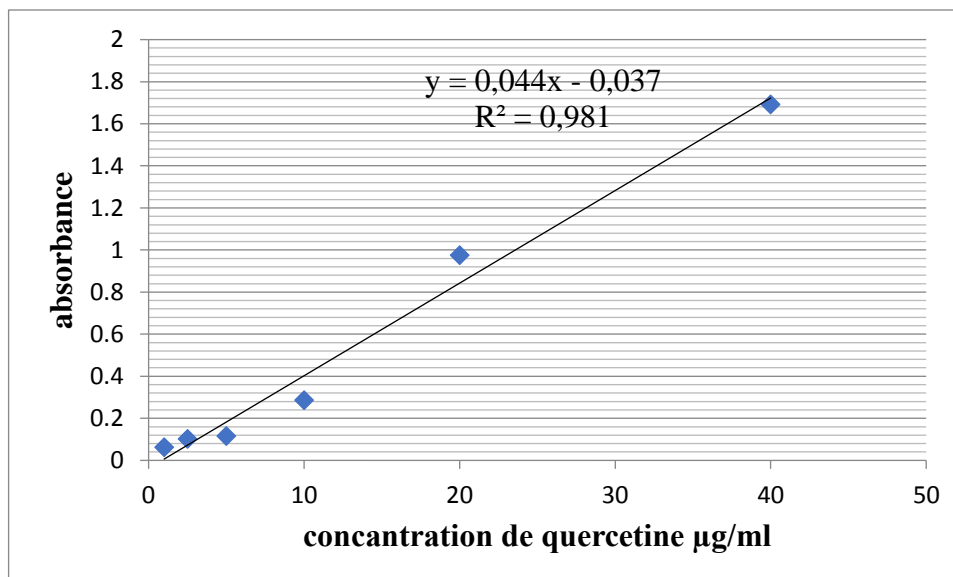


Figure IV.3: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes des différents échantillons de propolis sont reportées dans le Tableau IV.2.

Tableau IV.2: La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques et aqueux de la propolis

Les échantillons	Quantité de flavonoïdes en mg EQ/g d'extrait
T	37.27±1.86
C	2.152±0.546
Tb	35.674±0.833
E	29.42 ±3.57

D'après le tableau précédant, l'échantillon de Tipaza est classé le premier par rapport aux autres échantillons avec une concentration des flavonoïdes allant jusqu' à 37.27±1.86 mg EQ/g de propolis. Les teneurs les plus faibles sont celles des extraits de Constantine 2.152±0.546. Les autres échantillons de Tébessa et d'El oued ont présentés des valeurs moyennes allant de 35.674±0.833 à 29.42 ±3.57 mg EQ/g de propolis.

Nos résultats ne correspondent pas avec les résultats de (*M. L. Belfar et al ; 2015*) sachant que cette dernière révèle des concentrations des flavonoïdes de quatre régions algériennes. La première région Boumerdes représente une concentration des flavonoïdes allant jusqu'à

210.884±0.754 mg EQ/g. La deuxième Ghardaïa 74.827±0,995 mg EQ/g, ensuite, Mostaganem 28.304±0.232 mg EQ/g et enfin Bejaia 19.626±0.301mg EQ/g.

L'étude réalisée par (S. Touzani *et al* ; 2018) confirme que la teneur en flavonoïdes dépend de la région botanique, qui montre une teneur en flavonoïdes totale allant de 9.98±1.32 à 160,56±0.59 mg EQ/g pour des régions déférentes au Maroc.

Ces résultats sont différents d'un échantillon à un autre, ce qui signifie que la détermination de la teneur en flavonoïdes peut être utilisée comme un indice de provenance de la propolis. Et aussi peut être très utile pour différencier entre les échantillons de propolis.

### IV.3. Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire:

L'activité antioxydante des extraits éthanoliques de la propolis est évaluée par trois méthodes: test au DPPH, TPTZ et le test de FRAP.

#### IV.3.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH:

Le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) choisi dans cette étude est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule anti-radicalaire, ce qui entraîne la décoloration de ce dernier.

Les pourcentages de l'activité antioxydante des extraits de la propolis et les témoins positifs sont présentés dans les figures suivantes.

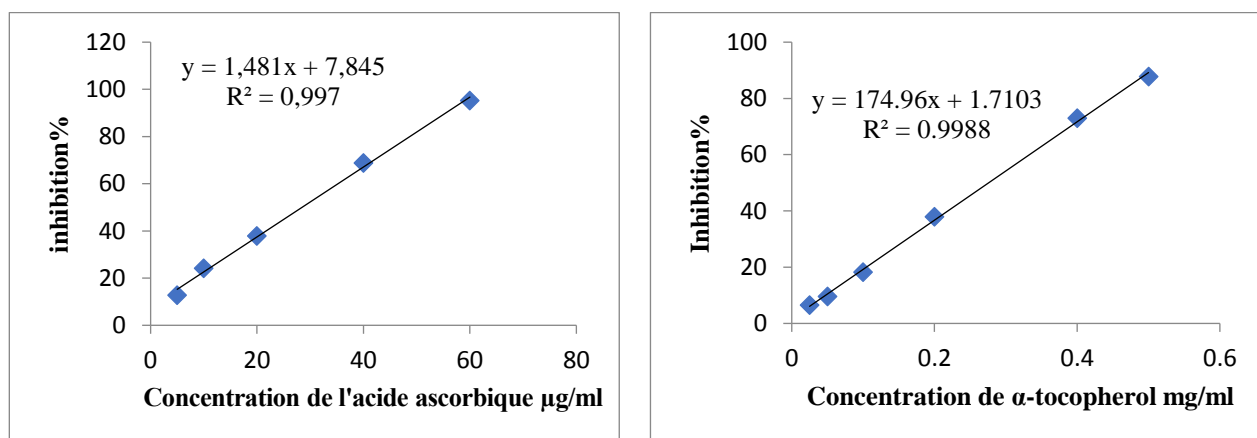


Figure IV.4: Les pourcentages d'activité antioxydante des standards

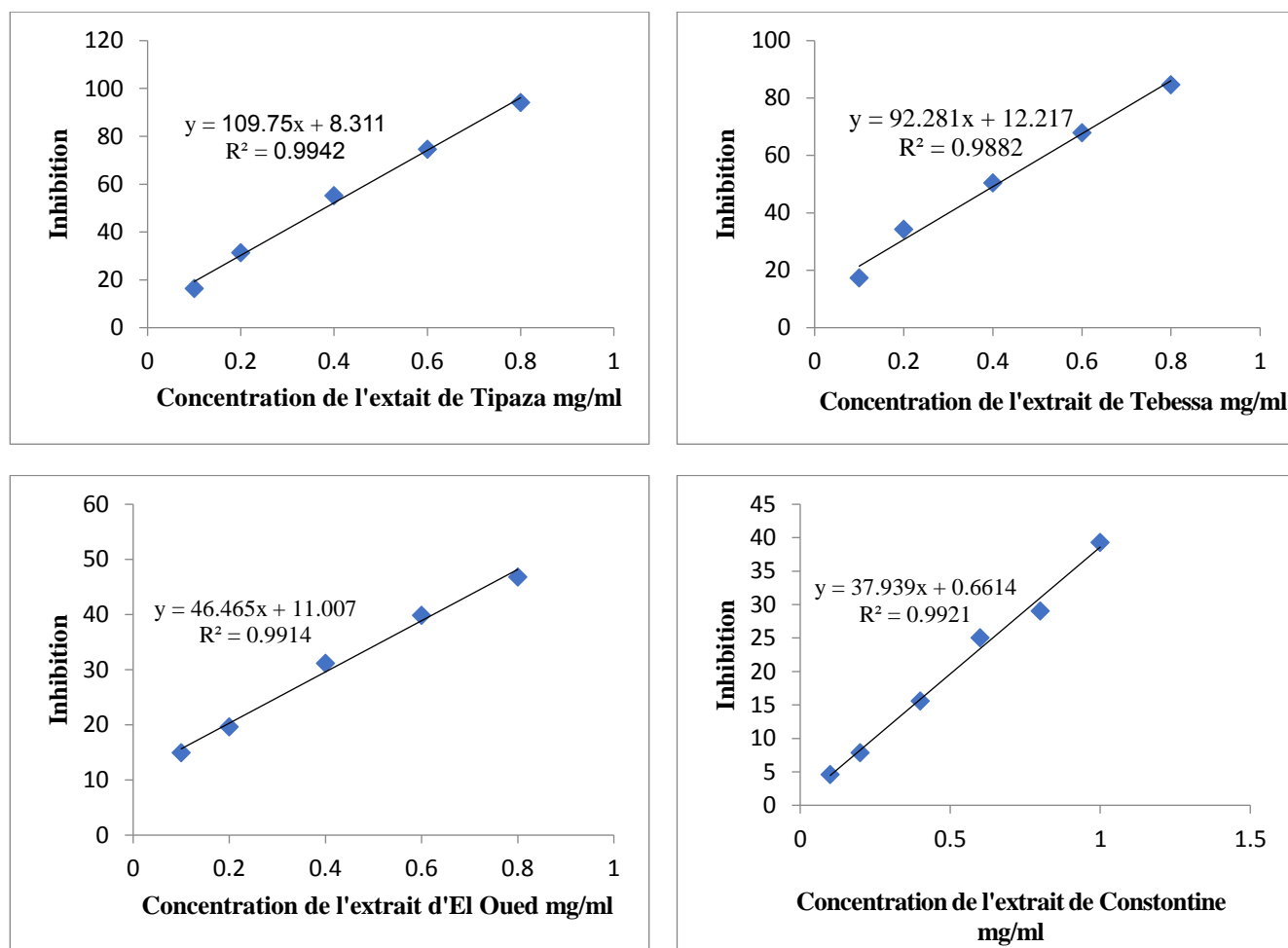


Figure IV.5: Les pourcentages d'activité antioxydante des extraits de la propolis de diverses origines géographiques

D'après les courbes illustrées dans les figures ci-dessus, nous montrons que tous les extraits testés possèdent des activités antioxydantes qui varient considérablement d'un extrait à un autre, Afin d'établir une comparaison entre les échantillons on a déterminé les IC<sub>50</sub> (présentent les concentrations d'inhibiteurs nécessaires pour balayer 50% des radicaux libres) de chaque extrait et les standards sont déduit à partir de l'équation de régression correspondant à sa courbe d'étalonnage est exprimée en mg/ml (Tableau IV.3), Plus la valeur d'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. (Hebi & Eddouks ; 2016)

Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant:

Tableau IV.3: Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des différents extraits et les standards en mg/ml

Echantillon	IC <sub>50</sub> ±Ecart type (En mg /ml)
T	0.38488±0.00960
C	1.2807±0.0589
Tb	0.4340±0.0195
E	0.8645±0.0245
Acide ascorbique	0.028401±0.158
α-tocophérol	0.26836±0.00415

D'après ce tableau, les activités antioxydantes varient considérablement entre les différents extraits. En comparant les valeurs d'IC<sub>50</sub>, nous avons observé la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique=0.028401±0.158 mg /ml, α-tocophérol=0.26836±0.00415mg /ml, (utilisés comme des molécules de référence), est bien inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevée.

On constate que, l'extrait de Tipaza possède une activité antioxydante largement supérieure à celle des autres extraits, qui est présente une activité deux fois plus supérieure à celle de l'extrait d'El Oued et trois fois à celle de l'extrait de Constantine et presque proche à l'extrait de Tébessa. Cela confirme la possibilité qu'il contient la plus grande quantité de composés accepteurs de radicaux libres et le plus grand potentiel antioxydant. Son piégeage des radicaux élevé peut être dû à son contenu en composés phénoliques.

Les recherches faites sur l'activité antiradicalaire de propolis sont nombreuses, les résultats sont différents d'une étude à l'autre, cela peut être expliqué par plusieurs facteurs influençant l'efficacité de l'extraction, la nature et le volume du solvant utilisé.

La majorité des travaux publiés portant sur la valeur IC 50 des échantillons.

L'étude menée par *Issam. J.N. et al (2018)* ont trouvé l'IC 50 de propolis Irlande et Tchèque sont 26.45±3.4 µg/ml et 36.40± 3.2µg/ml respectivement.

Selon l'étude de *T. Masek et al. (2018)* sur la propolis de Croatie ont révélé une valeur l'IC<sub>50</sub> = 9.96 à 19.96µg/ml.

Autre étude présente les valeurs IC<sub>50</sub> de l'extrait de propolis de Anhui et Chine sont 5.87 et 17.02 µg/ml respectivement. (*H. Yang et al ; 2011*)

A travers la recherche bibliographique, on note que l'activité antioxydante de la propolis dépend essentiellement de la quantité totale en flavonoïdes et polyphénols, et les résultats obtenus par notre étude confirme cette relation, plus la quantité en polyphénols augmente plus l'activité antioxydante est élevée. (*T. Masek et al ; 2018*) (*I.J.Nasser et al ; 2018*)

Parmi les principaux groupes de composés présents dans la propolis nous retrouvons les polyphénols et les flavonoïdes qui peuvent agir sur l'élimination des radicaux libres ou empêchent leur formation. Ce fait peut contribuer à la capacité de la propolis à empêcher l'oxydation. (*Ahn et al ; 2007*) (*L. Moreira et al ; 2008*)

Les travaux de *S.Touzani et al (2018)* ont reporté une corrélation positive entre l'activité antioxydante de la propolis Marocaine et sa teneur en composés phénoliques, mais cette activité n'est pas attribuée seulement au facteur quantitatif, dont la qualité (la structure et la nature des antioxydants) du contenu phénolique joue un rôle déterminant pour cette activité biologique.

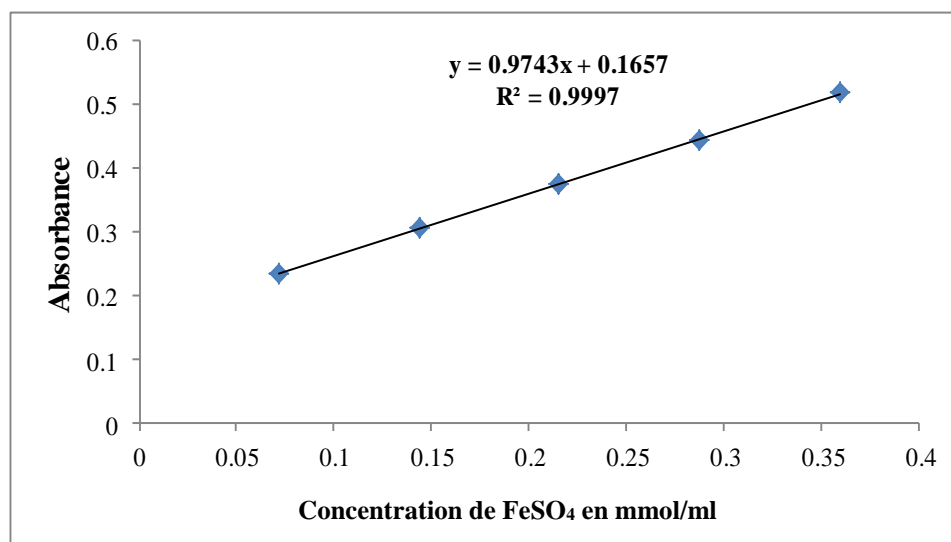
**IV.3.2. Test de pouvoir réducteur (FRAP- TPTZ) Ferric reducing-antioxydantpower:**

Le teste de pouvoir réducteur TPTZ a été déterminé comme décrit précédemment. Cette méthode est basée sur une réaction d'oxydoréduction dans laquelle les antioxydants agissent comme réducteurs, et un oxydant facilement réduit ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est utilisé en excès stoechiométrique, conduisant à un complexe ferreux bleu. L'absorbance à 593 nm a été lue en utilisant un spectrophotomètre.

On a supposé que plus la valeur de FRAP mesurée était élevée, plus la teneur en antioxydants de l'extrait de propolis pouvait réduire l'ion ferrique en ion ferreux.

La réaction chimique dans la technique FRAP implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le TPTZ- $\text{Fe}^{3+}$  et la réduction de ce dernier en TPTZ- $\text{Fe}^{2+}$ . *Benzie et ses collaborateurs (1996)* ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice.

La droite d'étalonnage (Figure IV.6) est établie à partir des absorbances lues pour la gamme de solutions de sulfate ferreux heptahydraté utilisée comme composé de référence. Elle est de la forme:  $\text{Abs} = a \times [\text{Fe}^{2+}] + b$ . Chaque extrait est testé, et l'absorbance qui en découle permet de déterminer sa concentration soit en  $\mu\text{M}$  d'équivalent  $\text{Fe}^{2+}$ . (*S. M. Cottica ; et al 2011*)



**Figure IV.6: Droite d'étalonnage de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$**

Tableau IV.4: Le potentiel des antioxydants de l'extrait de propolis et le contrôle positive

L'échantillon	Vit C	E	Tb	T	C
μmol Fe(II)/mg d'extrait	26.411±0.150	1.323±0.130	1.474±0.122	2.406 ±0.155	0.5863±0.0982

D'après les résultats illustrés dans le tableau, nous remarquons que tous les extraits présentent des pouvoirs réducteurs inférieurs à celui du produit de référence (acide ascorbique).

L'extrait de propolis de Tipaza avait également une valeur plus élevée d'équivalent  $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mg}^{-1}$  d'extrait, indiquant une activité antioxydante plus élevée.

Une activité antioxydante plus faible a été observée dans l'extrait de propolis de Constantine de même, cet extrait de propolis avait la plus faible teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes.

Plusieurs études établissent une relation entre l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de propolis et leur teneur en composés phénoliques, tels que les flavonoïdes.

*S. M. Cottica et ses collaborateurs (2011)*, ont montré que l'extrait de la propolis de Brésil a une activité réductrice dépend à la concentration en polyphénols totaux en utilisant le test de FRAP, les Résultats de l'étude montre que plus la teneur en composé phénolique est élevée, plus l'activité antioxydants est élevée. Par exemple ; l'échantillon qui contient une teneur de polyphénols totaux  $48 \pm 2$  (mg EAG /g<sup>-1</sup>propolis) a une valeur de FRAP est égale  $528 \pm 0$  ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ propolis) tandis qu'un autre échantillon contient une grande quantité de contenu phénolique  $87 \pm 3$ (mg EAG/ g<sup>-1</sup>propolis) présente un pouvoir réducteur élevé  $1365 \pm 2$  ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$ propolis).

Ces résultats sont en accord avec *T. Masek et al ; (2018)* qui ont noté une corrélation positive entre la teneur des composées phénoliques et la teneur en FRAP pour la propolis de Croatie.

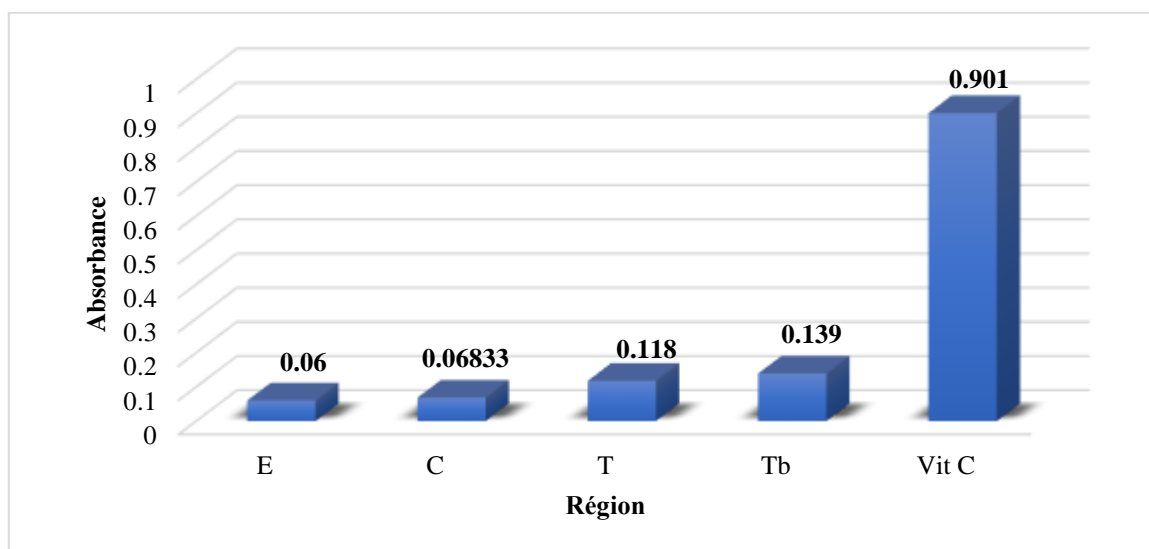
#### IV.3.3. Teste du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium (FRAP)

Le test de FRAP évalue directement la présence des antioxydants dans différents échantillons y compris la propolis. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. La présence des réducteurs dans les extraits provoque la réduction de  $\text{Fe}^{3+}$  complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent,  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm. (*Chung Y-C et al ; 2002*)

Le pouvoir réducteur de l'extrait est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composées phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants. Quelques

études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. (*Siddhuraju. P et al ; 2007*)

Les résultats de l'activité antioxydante dosée par le test de FRAP des échantillons étudiés sont représentés dans la Figure IV.7.



**Figure IV.7: Pouvoir réducteur des extraits et de l'acide ascorbique**

A partir des résultats obtenus (Figure IV.7), on remarque que tous les extraits possèdent un pouvoir réducteur plus ou moins important, et largement inférieure à celle de l'acide ascorbique, la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits étudiés.

A une concentration de 0.1 mg/ml, l'extrait de Tébessa a montré un pouvoir réducteur maximum qui présente une densité optique (DO) égale à  $0.139 \pm 0.006$  ce qui indique sa grande réduction et son potentiel antioxydant puissant, tandis que l'extrait d'El-Oued montre des valeurs plus faibles  $DO = 0.06 \pm 0.00208$ . A la même concentration, l'extrait de Tipaza et l'extrait de Constantine enregistrent des valeurs qui sont de l'ordre de  $DO = 0.118 \pm 0.00379$  et  $DO = 0.06833 \pm 0.00418$  respectivement.

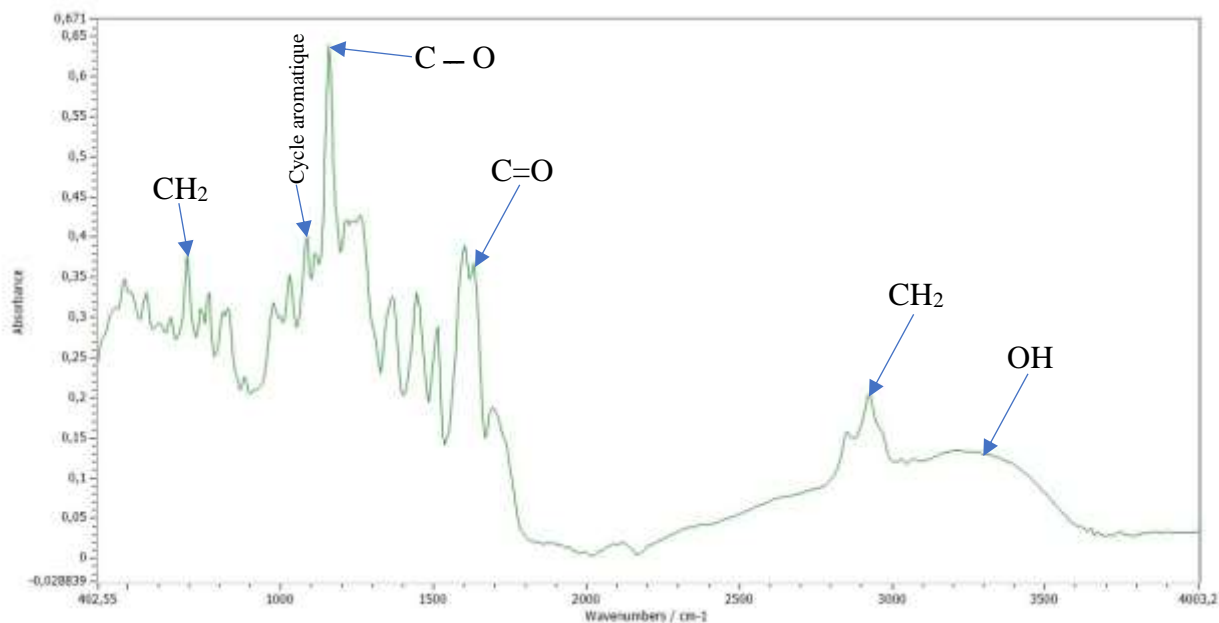
Cette méthode donne des résultats qui ne sont pas en corrélation totale avec les teneurs des phénoliques et flavoïdes car il ne prend pas en considération les mêmes paramètres. (*K. Thaipong et al ; 2006*)

#### IV.4. Caractérisation des nanoparticules ZnO:

##### IV.4.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge (FTIR):

Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) représente les pics moléculaires d'absorption et de transmission qui correspondent à la fréquence des vibrations entre les atomes du matériel. La Figure IV .8.

représente les bandes d'absorption de l'extrait de propolis de Tipaza et des NPs-ZnO synthétisées à partir de cet extrait dans la gamme 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure IV.8:** Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) de l'extrait de propolis

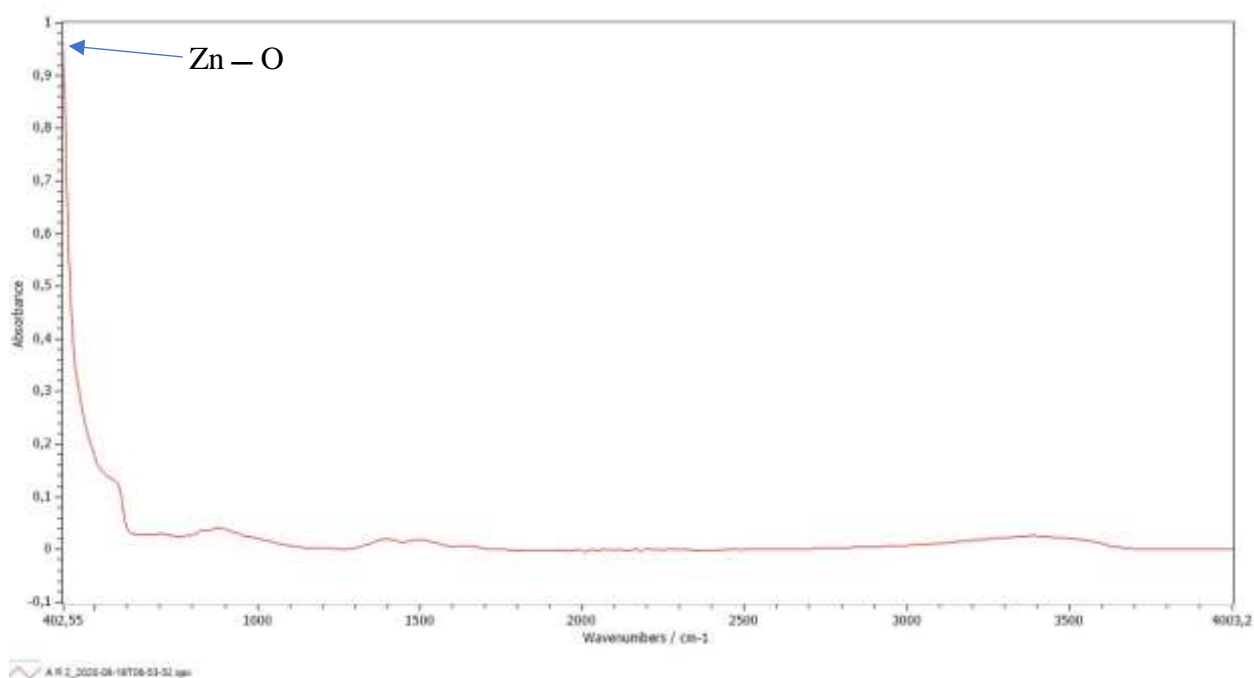
Le spectre FTIR de la propolis (Figure IV.8) reflète sa composition chimique globale. Il représente une tâche exigeante en raison d'un grand nombre de composés organiques divers et correspondants les vibrations moléculaires qui peuvent y être observées. Ces composés jouent un rôle important dans la réduction des ions métalliques et la stabilisation des nanoparticules. (*L. Svečnjak et al; 2020*)

Néanmoins, il est possible de distinguer les signaux qui sont très spécifiques pour un composé organique particulier sur la base des données bibliographiques complètes sur la composition chimique de la propolis, ainsi que diverses sources de données spectrales FTIR.

Un large pic à  $3300 \text{ cm}^{-1}$  c'est-à-dire lié à le groupe O – H des composés phénoliques. Les pics caractéristiques des vibrations C – H du  $\text{CH}_2$  et du  $\text{CH}_3$  aliphatique a été observé vers  $2920 \text{ cm}^{-1}$ . De plus, des pics de  $1630 \text{ cm}^{-1}$  peuvent être connectés à l'étirement la vibration des liaisons C = O du biomolécules trouvées dans l'extrait de propolis. L'absorption la plus importante avec un maximum d'absorption observé à  $1150 \text{ cm}^{-1}$  qui correspond à la vibration d'étirement asymétrique C – O des esters liés aux acides aliphatiques à longue chaîne. Le pic dans la gamme de  $1080 \text{ cm}^{-1}$  est en raison de l'extension d'anneau aromatique d'enceinte cyclique. Enfin, une absorption

moyenne à  $700\text{ cm}^{-1}$  culmine en raison du basculement du  $\text{CH}_2$  des hydrocarbures provenant de cire d'abeille.

Comme le montre la Figure IV.9, d'autres bandes d'absorption d'intensité moyenne et faible sont attribuées aux vibrations de divers groupes fonctionnels de phénols, de flavonoïdes et d'hydrocarbures, dont certains se chevauchent. (*R. N. Oliveira et al ; 2016*) (*L. Svečnjak et al ; 2020*) (*M. Bayrami et al ; 2020*)



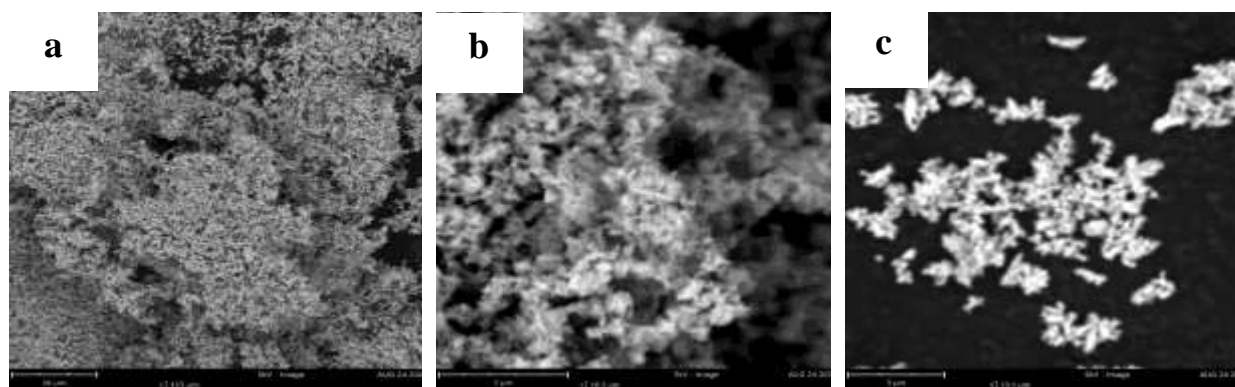
**Figure IV.9: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier (FTIR) des NPs -ZnO synthétisées par L'extrait de propolis**

La Figure IV. 9 représente une forte absorption de la nanoparticule d'oxyde de zinc entre  $400$  à  $500\text{ cm}^{-1}$ .

Le pic spécifié à la vibration d'étirement  $\text{Zn-O}$ . (*D. Gnanasangeetha et al ; 2014*) (*M. Bayrami et al ;2020*)

#### IV.4.2. Caractérisation par MEB couplée à l'EDX:

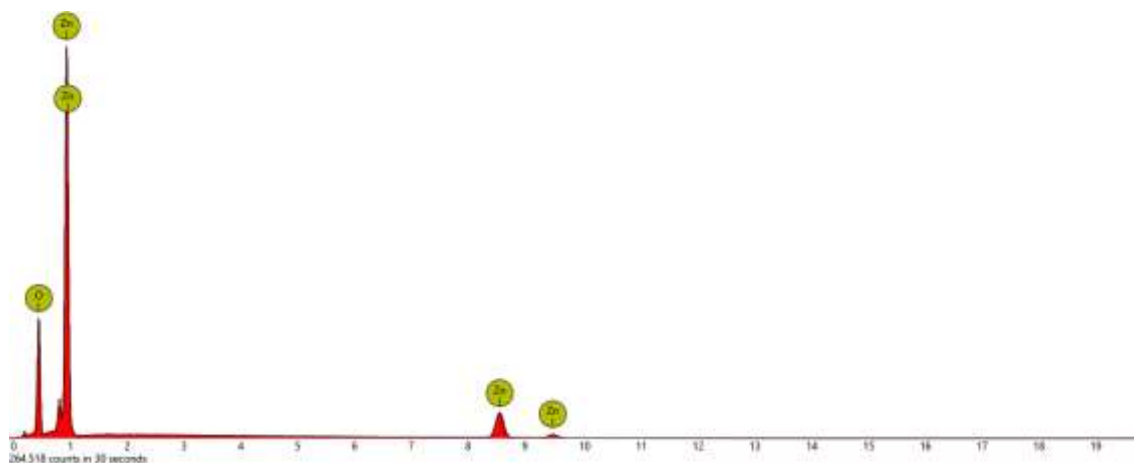
Les informations morphologiques et la conformation de dessins de MEB des nanoparticules de  $\text{ZnO}$  synthétisées sont montrées dans la Figure IV.10.



**Figure IV.10: Image MEB des NPs –ZnO biosynthétisées**

D'après ces images, il est clair que la forme de la nanoparticule de ZnO est nanofibre hexagonale. L'observation grossière de la Figure IV.10 (c) montre que leur taille était de l'ordre de 200 nm,

L'étude de la diffraction des rayons X à dispersion d'énergie (EDS) a été réalisée pour les nanoparticules de ZnO synthétisées (La Figure IV.11) afin de connaître la composition élémentaire. EDX confirme la présence des signaux zinc et oxygène de l'élément des nanoparticules d'oxyde de zinc et cette analyse a montré les pics qui correspondaient à l'absorption optique de la nanoparticule produite. Ce qui prouve que la nanoparticule produite est dans sa forme purifiée la plus élevée. Le dessin de FTIR et de MEB est en accord avec les résultats d'EDS annoncés.



**Figure IV.11: Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS) du NP-ZnO**

Ces résultats mènent à des possibilités dans la recherche pour combiner des principes biologiques avec la procédure chimique pour engendrer des nanoparticules oxyde de zinc avec des fonctions précises. Cette méthode permet à la recherche de corriger des défauts chimiques dans l'environnement malade.

#### IV.5. Détermination de l'activité antibactérienne des NPs-ZnO:

Dans cette partie du travail nous avons étudié *in vitro* l'activité antibactérienne des NPs-ZnO synthétisées sur cinq souches bactériennes. Il s'agit de:

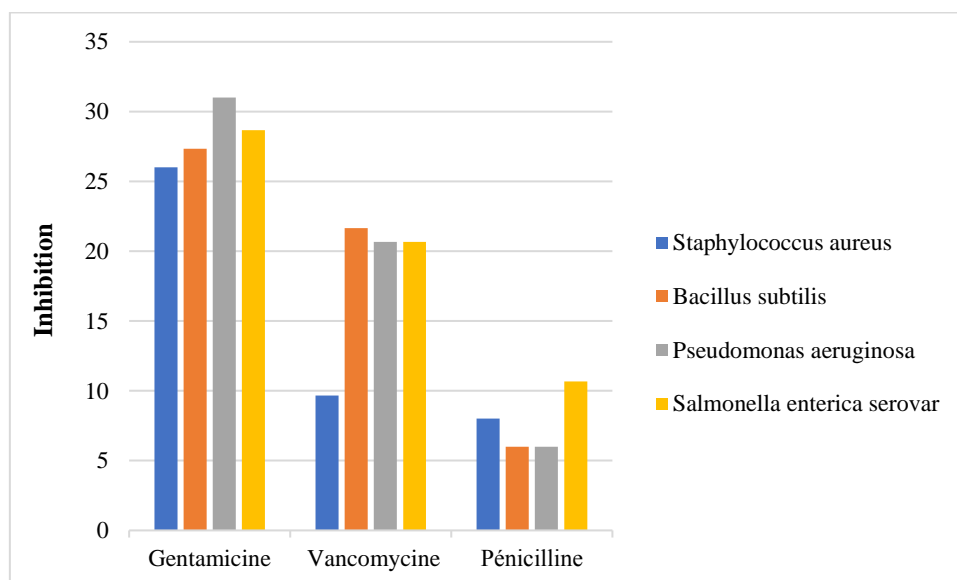
- *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica serovar Typhi* (Bactérie à GRAM négatif).
- *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* (Bactérie à GRAM positif).

Ce test a été développé pour déterminer l'activité antibactérienne d'un échantillon en mesurant une zone d'inhibition de la croissance des bactéries autour de l'échantillon. Cette zone d'inhibition met en évidence la diffusion de l'agent antibactérien. Les photographies des boîtes de Pétri sont illustrées dans la (Annexe n°:1).

##### IV.5.1. Effet des antibiotiques sur les différentes souches bactériennes:

L'antibiogramme consiste à chercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques, le tableau ci-dessous rapporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions manifestées par les antibiotiques sur les différentes souches étudiées.

Trois antibiotiques standards sont testés (Gentamicine, Vancomycine et Pénicilline) sur quatre souches bactériennes gram (+) et gram (-).



**Figure IV.12: Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)**

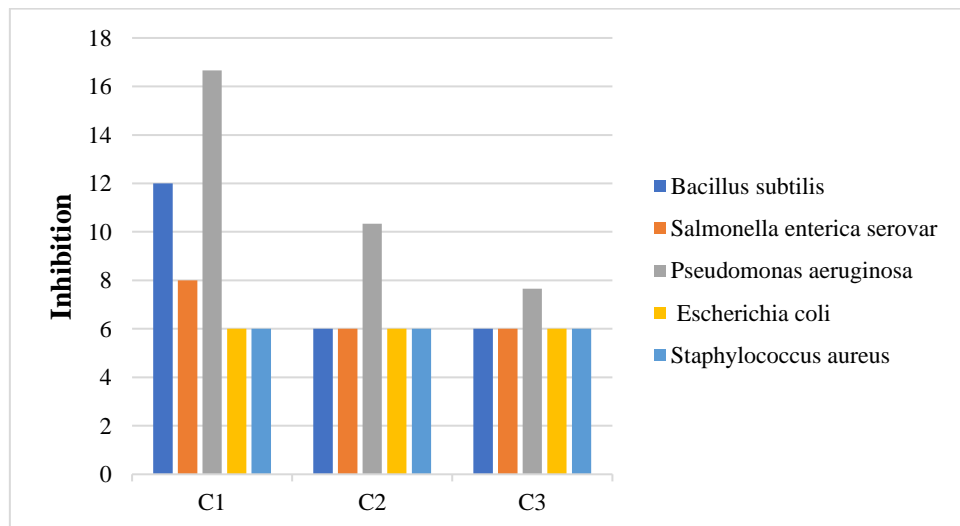
D'après la figure, on observe que les différents types de souches réagissent différemment aux majorités des antibiotiques étudiés, sauf cet effet est nul pour l'antibiotiques pénicilline contre

*P.aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Ces dernières ont présenté une véritable résistance contre l'antibiotique pénicilline, cette absence d'activité serait due à la difficulté des antibiotiques à pénétrer.

#### IV.5.2. Effet des NPs-ZnO sur les différentes souches bactériennes:

On étudie le potentiel antibactérien des NPs-ZnO par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton qui a permis de déterminer l'action des NPs-ZnO à différentes concentrations dissoutes dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier après 24h d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'une concentration à une autre. Les résultats obtenus sont récapitulés dans la figure suivante:



**Figure IV.13: Effet antibactérien du NPs-ZnO sur les souches bactériennes à différentes concentrations (Diamètre de la zone d'inhibition en mm)**

Comme la montre l'images, La souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s'est montrée très sensible vis-à-vis de NPs-ZnO à toutes les concentrations ( $C_1 = 10$  mg/ml,  $C_2 = 5$  mg/ml,  $C_3 = 2.5$  mg/ml) avec des zones d'inhibition modifiés avec différentes concentrations ( $16.66 \pm 0.333$ ,  $10.33 \pm 2.66$  et  $7.66 \pm 1.67$  mm) respectivement. En effet, cette bactérie s'est montrée résistante vis-à-vis des antibiotiques testés.

Les souches de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été sensible aussi bien au NPs-ZnO, elles ont montré une zone d'inhibition  $12 \pm 3$  et  $8 \pm 1.15$  mm respectivement à la concentration  $C_1 = 10$  mg/ml

En revanche, nous remarquons qu'aucune activité antibactérienne n'est enregistrée de NPs-ZnO pour les différentes trois concentrations sur les souches *Escherichia coli* ATCC25922 et *Salmonella enterica serovar Typhi* ATCC 14028. Ces résultats ont été comparés à des témoins

négatifs pour les mêmes souches utilisées. Les variations du diamètre de la zone d'inhibition observées à partir des trois espèces bactériennes sont dues à la différence dans la composition de la paroi cellulaire bactérienne.

Aussi cela peut être dû à l'effet de la taille des nanoparticules ; la petite taille des NPs aiderait à adhérer à la paroi bactérienne, ce qui détruirait la cellule. L'enzyme bactérienne vitale serait endommagée par les NPs qui peuvent pénétrer dans la membrane cellulaire.

Une étude menée par *Morones et al ; (2005)* démontre que seules les nanoparticules dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm interagissent avec différentes bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholera* et *S. typhus*) en inhibant la croissance cellulaire.

De plus, la physiologie, le métabolisme et le degré de contact peuvent contribuer à créer des différences de l'activité bactérienne des NPs-ZnO envers les différentes bactéries (*D. Rania et al ; 2019*)

Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs, *A. Mocanu et al ; (2019)* qui ont rapporté qu'il y a un effet synergique sur les bactéries Gram positives (*B. subtilis*) par rapport aux Gram négatif (*E. coli*) qui ne sont pas sensibles à cet effet synergique.

*D. Rania et ses collaborateurs (2017)* ont étudié l'effet des échantillons de ZnO contre *Pseudomonas aeruginosa* qui présente une sensibilité supérieure par rapport à tous les microorganismes testés.

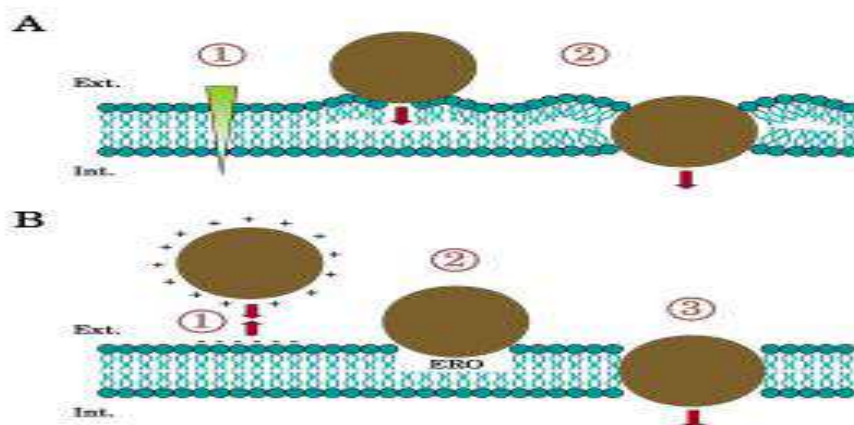
Par contre une autre étude réalisée par *E. H. Ibrahim et al ; (2019)* ont rapporté que les nanoparticules de ZnO présentent un antimicrobien considérable potentiel contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Gram positif).

D'une manière globale, ces résultats sont très encourageants et très prometteurs. Les souches de *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis* et de *Pseudomonas* qui se montraient résistantes avec pratiquement la majorité des antibiotiques testés, deviennent sensible et de manière considérable vis-à-vis des ZnO.

Les mécanismes d'action de NPs- ZnO sur les bactéries en générale ne sont pas encore élucidés. Peu de données sont actuellement disponibles sur leurs pénétrations dans les membranes cellulaires. Il semble donc urgent d'approfondir les connaissances actuelles sur les mécanismes impliqués dans la mort bactérienne pour mieux améliorer leurs effets.

En effet l'interaction de particules physiques avec la paroi bactérienne n'a été que très peu étudiée et donc leur pénétration dans la paroi bactérienne peu observée. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être formulées, la première serait un passage par des porines non spécifiques de la paroi, mais les plus grosses porines ayant un diamètre de 2 nm, cette explication semble peu

probable, la deuxième hypothèse la plus probable est que les particules sont capables d'exercer une pression mécanique sur la paroi, en raison d'une différence de concentration en osmolytes de part et d'autre de la membrane, et donc de traverser celle-ci en forçant un passage. Cependant, une mesure de l'osmolalité des suspensions de nanoparticules a été réalisée et montre qu'elle est très faible. Ainsi, les nanoparticules n'exercent aucune pression hyper osmotique et ne peuvent donc passer en force la membrane de cette manière, la troisième hypothèse serait qu'une particule en contact avec la membrane pourrait produire des ERO et ainsi provoquer des dommages membranaires. Des trous dans la membrane seraient formés et permettraient la pénétration des nanoparticules dans le périplasma ou le cytoplasme. Les auteurs suggèrent l'importance de la charge de la particule pour qu'elle puisse s'approcher de la paroi et libérer les ERO à son voisinage, les nanoparticules chargées positivement pénètrent dans la paroi bactérienne. Ainsi c'est peut-être la charge des particules, en complément ou en substitution de leur taille, qui conditionne la pénétration des nanoparticules. De plus cela conforte la troisième hypothèse de mécanisme de pénétration. (Angélique, S. D., 2008)



**Figure IV.14: Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries. (Angélique, S. D ; 2008)**

*Hypothèse du passage mécanique (A):*

En imaginant une différence de concentration en nanoparticules exerçant une pression (1), les nanoparticules forcent le passage pour aller du compartiment le plus concentré au moins concentré.

*Hypothèse du passage par détérioration de la membrane externe (B):*

Une particule chargée positivement peut se coller sur la bactérie chargée négativement (1), en imaginant que ces particules sont capables de produire des ERO (2) l'une des conséquences possibles est une détérioration de la membrane externe et une formation de puits permettant le passage des nanoparticules (3).

Enfin, d'autres tests sur de nouvelles espèces et avec de nouvelles concentrations seraient d'un grand apport scientifique pour ce domaine important de la recherche et de la vie humaine.

*Conclusion générale*

## **Conclusion générale**

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement.

La propolis est l'un des produits complexe de la ruche. Il faut retenir qu'elle est riche en composés phénolique et flavonoïde. Grâce à cette composition particulière et d'une grande complexité elle possède des propriétés pharmacologique, dont les indications thérapeutiques sont nombreuses: antibactériennes, antioxydant, antifongique, antivirale, anticancéreux, anesthésiantes et une action cicatrisante et génératrice.

L'objectif de la présente étude est double; l'un est l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits éthanoliques de la propolis provenant de quatre régions différentes de l'Algérie. En utilisant trois méthodes tel que: DPPH, FRAP, TPTZ. L'autre objectif est de proposer de nouvelles voies de biosynthèse des nanoparticules oxyde de zinc en vue de remplacer l'utilisation des réducteurs chimiques. A cet effet, nous avons choisi l'extrait de propolis de Tipaza et de mettre en évidence leurs 'activité anti-bactérienne *in vitro*.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de la propolis selon les trois méthodes mentionnées précédemment a montré que tous les extraits éthanoliques possèdent une activité antioxydante modérée. Ces extraits pourraient donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques. Cette activité reste néanmoins nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Dans la première méthode (DPPH), les extraits étudiés présentent une activité antioxydante variable. Selon les IC50 calculées graphiquement, l'extrait de Tipaza présente l'IC50 la plus basse (0.38 mg/ml) proche à celle de  $\alpha$ -tocophérol (0.26 mg/ml), ce qui reflète une activité antioxydante puissante de cet extrait, Par contre les autres extraits présentent des IC50 supérieures à celle des standards par conséquence une activité antioxydante faible.

Ces résultats ont été confirmés par la méthode de FRAP- TPTZ, puisque nous avons montré que l'extrait de la région de Tipaza présente la valeur la plus élevée  $2.406 \pm 0.155 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ mg}^{-1}$  donc l'activité la plus importante suivie par celle de la région de Tébessa, puis l'extrait d'El-Oued et enfin l'extrait de Constantine.

Tandis que pour le teste du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium, nous avons remarqué une augmentation proportionnelle de la réduction du fer avec l'augmentation des concentrations des extraits de quatre extraits étudiées (reflétée par l'augmentation des absorbances). Comme nous avons pu le voir précédemment que les extraits des quatre échantillons

présentent un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide ascorbique. Par ailleurs, l'extrait de Tébessa présente l'activité réductrice du fer la plus élevée par rapport aux autres extraits.

La synthèse des NPs-ZnO ont été réalisée avec succès en présence de l'extrait éthanolique de la propolis de Tipaza. ceci est confirmé par les analyses FTIR et MEB.

L'étude de MEB révèle que la forme de ces NPs-ZnO est nanofibre hexagonale avec une taille de 200 nm conforme à la capacité de l'extrait de propolis à synthétiser la nanoparticule de ZnO. Tandis que les pics FTIR ont confirmé la présence de liaisons chimiques indicatifs de la synthèse réussie de ZnO nano des fibres. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'EDX qui présente une forte largeur intense et étroite de Zinc et d'oxygène. Les pics d'EDX indiquent que nanoparticules ensuivis ont de la haute pureté.

Il est évident d'après la présente étude que la biosynthèse de nanoparticules de ZnO est écologique, économique, plus rapide, simple et efficace que la méthode conventionnelle avec moins d'utilisation de produits chimiques malfaisants.

D'autre part, l'évaluation de leur effet antibactérien est réalisée par la méthode de diffusion sur disque contre les cinq souches bactériennes (Trois à Gram négatif et deux à Gram positif).

Les résultats obtenus révèlent que ces nanoparticules métalliques enregistrent une activité antibactérienne importante vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif) avec un diamètre d'inhibition de  $16.66 \pm 0.33$  mm, et peu considérable potentiel envers *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (Gram positif) avec des diamètres d'inhibition de  $12 \pm 3$  et  $8 \pm 1.15$  mm respectivement, (à la concentration  $C_1=10\text{mg/ml}$ ), par rapport à la Gentamicine, Vancamicune et Pénicilline.

En revanche, pour la bactérie *E. coli* et *Salmonella enterica serovar Typhi* aucune activité antibactérienne n'est enregistrée.

Ces résultat prometteur et très encourageant nous offre une grande possibilité d'obtenir des molécules dotées d'activité antioxydante très élevée et des NPs biosynthétisées ont des activités antibactérienne.

Des travaux complémentaires sont alors nécessaires pour isoler et identifier les substances bioactives responsables des activités testées. Par ailleurs, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de propolis.

Il est également souhaitable d'étendre l'étude antimicrobienne à d'autres bactéries ainsi que à l'étude du mécanisme et de la cinétique de l'inhibition de l'accroissement de ces bactéries. Pour cela, le couplage avec des équipes de biologistes est indispensable.

## *Références*

## Références Bibliographiques

### (A)

- Afaf D Abd El Megid, Mohamed Khaled, Mohamed Abdeleghaffar Emam, Amira Adel, Biochemical rol of zinc oxide and propolis nanoparticles in protection rabbits against coccidiosis, *Benha Veterinary Medical Journal* 2018;34(1).
- Ahn M R, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang K S, Nakayama T, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007.
- Alexandra Mocanu, Gabriela Isopencu, Cristina Busuioc, Oana-Maria Popa, Paul Dietrich & Liana Socaciu-Siebert, Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect, *Scientific Reports* 2019;9:17687.
- Amit Rastogi, Poonam Singh, Farid A Haraz, Ahmed Barhoum, Biological synthesis of nanoparticles: an environmentally benign approach, Elsevier, *Fundamentals of Nanoparticles*, 2018.
- A M S Ibrahim, Phytochemical Composition of Iraqi Propolis and its effect on some Microorganism, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, *Al-Anbar J Vet Sci* 2018;4(2):13.
- Andelkovi B, Vujisi L, ckovi I V, Tesevi V, Vajs V, devac D G, Metabolomics study of Populus type propolis, *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, S0731-7085,30493-9.
- Angélique S D, Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique, Thèse de Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), France, 2008.
- Angelo Nicolosi, Effe de l'exposition périnatale aux nanoparticules d'oxyde de zinc sur l'activité des réseaux de neurones moteurs impliqués dans les fonctions respiratoire et locomotrice, Thèse de Doctorat, Institut de Neurosciences cognitives et intégratives d'Aquitaine, 2017.
- A Russo, V Cardile, F Sanchez, N Troncoso, A Vanella, J A Garbarino, Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines, Italy, Elsevier, *life sciences* 2004;76:545-558.

### (B)

- Bankova V S, De Castro S L, Marcucci M C, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie* 2000;31.
- Blanc M, Propriétés et usage médical de produits de la ruche, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Limoges, 2010.
- Burdock G A, Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis), *Food and Chemical Toxicology* 1998;36(4).

(C)

- Castaldo S, Capasso F, Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia* 2002;73(1):S1-S6.
- C F Klingshirn, Zinc Oxide: From Fundamental Properties Towards Novel Applications, Germany, Springer, 2010.
- Charles P, Poole Jr, Frank J, Owens Frank, Introduction to Nanotechnology, Wiley- Inter science Eds, New Jersey, 2003.
- Chung Y-C, Chang C-T, Chao W-W, Lin C-F, et Chou S-T, Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002.
- Clément H, Conte Y L, Barbancon J- M, Vaissière B, & Collectif, Le traité rustica de l'apiculture, Rustica éditions, 2011.
- Crane E, History of other products from bees the world history of beekeeping and honey hunting, Gerald Duckworth & Co Ltd, London, 1999.

(D)

- DADI Rania, AZOUANI Rabah, TRAORE Mamadoua, MIELCAREK Christine et KANAIEV Andrei, Elaboration de nanomatériaux fonctionnels pour des applications biomédicales, 2017.
- Daizy Philip, Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles, Elsevier, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2009;73(4).
- Dal Corso A, Posternak M, Resta R, and Baldereschi A, Ab initio study of piezoelectricity and spontaneous polarization in ZnO, *Phys Rev B* 50, 1994.
- Demortière A, Launois P, Goubet N, Albouy P A, Petit C, Shape-controlled platinum nanocubes and their assembly into two-dimensional and three-dimensional superlattices, *J Phys Chem B* 112, 2007.
- D Gnanasangeetha and D Sarala Thambavani, Biogenic Production of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Acalypha Indica*, India, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2013.
- Djeridane A, Yous M, Nadjemi B, Boutassouna D, Strocker P, Vidal N, Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chem* 2006;97.
- Donadieu Yves, La propolis, Paris, Dangles, 2008.
- Donadieu Yves, les produits de la ruche, 3<sup>ème</sup> Edition, 1981.

(E)

- E Harvey Brown, Zinc oxide Rediscovered, The New Jersey Zinc Company, New York, 1957.
- Eric Debuysse, La propolis, Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université De Nante, Faculté de Pharmacie, 1984.
- Essam H Ibrahim, Obaid Albulym, Omer Kaygili, Mona Kilany, Mohd Shkir, Mai S A Hussien, Niyazi Bulut, H Y Zahran, I S Yahia, Green Synthesis, Structural, in Vitro and Vivo Bioactivity Properties of ZnO Nanoparticles for Biomedical Applications, *Preprints*, 2019.

(F)

- F A Badria, H M Fathy, A S Fatehe, M H Ahmed, M G Ghazy, Chemical and biological diversity of propolis samples from Bulgaria, Libya, and Egypt, *Journal of Apitherapy* 2018;3(2).
- F Galeotti, F Maccari, A Fachini, N Volpi, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful For Finished Products, B Natural, Corbetta, 20121 Milano, MDPI Italy, 2018.
- F Gholamhoseinpoor, B Sadeghi, A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (Zt) extract at room temperature, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015;134.

(G)

- Garima S, Bhavesh R, Kasariya K, Ranjan A S, Singh R P, Biosynthèse de nanoparticules d'argent à l'aide d'extrait de feuilles d'*Ocimum sanctum* (Tulsi) et criblage de son activité antimicrobienne, *J Nanopart Res* 2011;13.
- Gharbi M, Les produits de la ruche: origine- fonctions naturelles- Composition - propriétés thérapeutiques: apithérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire, Thèse de Doctorat en Médecine-Pharmacie, Université Claude Bernard (Lyon I) 2011;221.
- Golder W, Propolis, The bee glue as presented by the Graeco- Roman literature, German, *Wurzbürger Medizinische torische Mitteilungen journal* 2004;23.

(H)

- Haisha Yang, Yuqiong Dong, Huijing Du, Haiming Shi, Yunhua Pengand Xiaobo Li, Antioxidant Compounds from Propolis Collected in Anhui, China, *Molecules* 2011;16(4).
- Hasna A S, Rajeshwari S, Venckatesh R, Green synthèse et caractérisation de nanoparticules d'oxyde de zinc d'*Ocimum basilicum* L var *purpurascens* Benth - Extrait de feuille de Lamiaceae, *Mater lett* 2014;131.

- Hebi M, & Eddouks M, Evaluation de l'activité antioxydante de *Stevia rebaudiana*, *Phytothérapie* 2016;14:17-22.
- H J Michel, H Leiste, K D Schierbaum, J Halbritter, *Appl Surf Sci*, 1998.
- H Leclerc, d izard, *Microbiologie generale*, Edité par Doin éditeurs, Paris, 1983.
- H Talbi, A Boumaza, K El-mostafa, J Talbi, A Hilali, Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L, (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L), *Journal of Materials and Environmental Science* 2015;6(4).

### (I)

- Iris F F Benzie, J J Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical Biochemistry* 1996;239(1).
- Isabel Escriche, Marisol Juan-Borrás, Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis, Elsevier, *Food Research International* 2018;106.
- Issam Al-Ani, Stefan Zimmermann, Jürgen Reichling and Michael Wink, Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics, *Medicines* 2018;5:2.

### (J)

- J A Park, J Moon, S J Lee, S C Lim, T Zyung, Fabrication and characterization of ZnO nanofibers by electrospinning, *Curr Appl Phys*, 9 (2009) S210-S212.
- J D H Donnay and Helen M Ondik, *Crystal data, Inorganic Compounds*, Vol 2, 3<sup>ème</sup> Edition JCPOS, 1973.
- Jean N, Perspectives d'avenir en Apithérapie à l'officine, Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université d'Angers, 2015.
- J Elias, Réseaux de nanofils et de nanotubes d'oxyde de zinc de dimensions contrôlées obtenus par voie électrochimique, Application aux cellules solaires nanostructurées, Université Paris XII Val de Marne, 2008.
- J Hubert, Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja, Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Spécialité: Qualité et sécurité des aliments 2006;174.

- Jinhuan Jiang, Jiang Pi, Jiye Cai, The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, Hindawi, *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2018;3.
- J Nishino, Shigeo Ohshio, and Kiichiro Kamata, *J Am Ceram Soc*, 75 (1992), 3469-72.
- J Whao, K H Dahmen, H Omarcy, L M Tonge, T J Marks, B W Wessels, C r Kannewurf, *Appl Phys Lett* 53, 1750 (1988).
- J X Wang, X W Sun, Y Yang, C M L Wu, N-P transition sensing behaviors of ZnO nanotubes exposed to NO<sub>2</sub> gas, *Nanotechnology* 20 (2009) 465501-495504.

(K)

- Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G et Horzum Z, Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red agla *Jania Rubens*, *Phytotherapy Research* 2007;21(2):153-6.
- Karagözler A A, Erdag B, Emek Y G, Uygun D A, Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry* 2008;111.
- Khaled Zhou, Elaboration et Caractérisation des nanopoudres de ZnO par Voie Chimique Sol-gel, Mémoire de Master, Université Med Khider Biskra, Département des Sciences de la Matière, Algérien, 2013-2014.
- Kriengsak Thaiponga, Unaroj Boonprakoba, Kevin Crosbyb, Luis Cisneros-Zevallosc, David Hawkins Byrniec, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, Elsevier, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006.
- K Vijayaraghavan, T Ashokkumar, Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications, Elsevier, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2017;5(5).

(L)

- Leandro Moreira, Luís G Dias, José Alberto Pereira, Leticia Estevinho, Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal, Elsevier, *Food and Chemical toxicology* 2008;46.
- Levizou E, Petropoulou Y, Manetas Y, Carotenoid composition of peridermal twigs does not fully conform to a shade acclimation hypothesis, *Photosynthetica* 2004;42(4).
- L F A ANAND RAJ and E JAYALAKSHMY, Biosynthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using Root Extract of *Zingiber Officinale*, India, *Oriental Journal of Chemistry* 2015;31(1):51-56.

- Lidija Svečnjak, Zvonimir Marijanović, Piotr Okińczyc, Piotr Marek Kuś, and Igor Jerković, Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MC, DPPH and FRAP Assay, MDPI, *antioxidants* 2020;9(4):337.

(M)

- Mahdi Bayrami, Abolfazl Bayrami, Aziz Habibi-Yangjeh, Mohammad Saleh Shafeeyan, Solmaz Feizpoor, Farid Mohammadi Arvanagh, Mohammad Reza Nourani, Ramezan Ali Taheri, Biologically-synthesised ZnO/CuO/Ag nanocomposite using propolis extract and coated on the gauze for wound healing applications, Nanobiotechnology, *Journal The Institution of Engineering and Technology*, 2020.
- M J G Búrquez, F R G Diaz, C G G Tovar, L C Miranda, C I S Zàrate, M M C Martinez, J G P Carrillo, T A C Sánchez, S F Coronado, Comparison between In Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus, Hindawi, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018;(2):1-9.
- M K Jayaraj, A Antony and M Ramachandran, Bull Mater Sci, 2002.
- Mohamed Lakhdar Belfar, Touhami Lanez, Abdekarim Rebiai, Zineb Ghiaba, Evaluation of Antioxidant Capacity of Propolis Collected in Various Areas of Algeria Using Electrochemical Techniques, *International Journal of Electrochemical Science* 2015;10.
- Moreira F A, Aguiar D C, Campos A C, Lisboa S F, Terzian A L, Resstel L B, Guimaraes F S, Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1, Elsevier, *Neuropharmacology* 2008;54.
- Morones J R, J L Elechiguerra, A Camacho, K Holt, J B Kouri, J T Ramirez, M J Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology* 2005;16.
- Myriam Ricaud, Olivier Witschger, Les nanomatériaux, Définition, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention, Revues, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), 2012.

(N)

- Nader El Housseini, Intérêt et Applications Cliniques de la Propolis en Médecine Bucco-Dentaire, Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire, Université de Nantes, Unité de Formation et de Recherche d'Odontologie, 2013.

- N Boizot, J P Charpentier, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, *Cahier des Techniques de l'INRA*, 2006.
- N Cardinault, M-O Cayeux, P Percie du Sert, La propolis : origine, composition et propriétés, Springer- Verlag France, *Phytothérapie* 2012;10.
- N Jayachandra Reddy, D Nagoor Vali, M Rani, S Sudha Rani, Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green Synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit, India, Elsevier, *Mat Sci and Engin* 2014;34.

### (O)

- Oliveira R N, Mancini M C, Oliveira F C S, Passos T M, Quilty B, Thiré R M S, McGuiness G B, FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing, *Revista Matéria* 2016;21(3).
- Oyaizu M, Studies on Products of Browning Reaction: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine, *Japan Journal of Nutrition* 1986;44.

### (P)

- Parisa Shaltouki, Elaheh Mohamadi, Mohammad Ali Moghaddasi, Afshin Farahbakhsh, Hooman Bahmanpour, Synthesis and Characterization of Nanoparticles Propolis Using Beeswax, Iran, *Iran J Chem Chem Eng* 2019;38(2):10.
- Père Roca i Cabarrocas, Thèse de Doctorat, Paris VII, 1988.
- Philippe J M, Le guide de l'apiculteur, Paris, Episud, 1994.
- Philippe J M, le guide de l'apiculteur, Troisième Edition EDISUD, 1999.
- P Jenouvrier, Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Grenoble, 2003.
- P M Martin, M S Good, Thin Solid Films, 2000.
- P Muthukumar, T M Selvakumari, C Rangasami, S Ganesan, Structural and optical properties of ZnO nano particles grown on copper substrate by electrode position method, *Dig J Nanomater Biostruct*, 8 (2013).
- Popova M P, Graikou K, Chinou I, Bankova V S, GC-MS Profiling of Diterpene Compounds in Mediterranean Propolis from Greece, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58(5).
- P X Gao, Z L Wang, Mesoporous Polyhedral Cages and Shells Formed by Textured Self-Assembly of ZnO Nanocrystals, *J AM Chem Soc*, 125 (2003).
- P X Gao, Z L Wang, Nanopropeller arrays of zinc oxide, *Appl Phys Lett*, 84 (2004).

(R)

- Ribereau-Gayon P, Les composées phénoliques des végétaux, Ed, Dunod, Paris, 1968.

(S)

- S Bogdanov, V Bankova, Propolis: Origin, Production, Composition Bee Product Science, 2016.
- Sedira Sofiane, Etude et synthèse des nanostructures pour application en biomédicale et environnementale: cas de nanoparticules de ZnO, Ag et couches minces de type C-TiN, Thèse pour le Diplôme de Doctorat en Sciences en Physique, Université Constantine 1, Faculte des Sciences Exactes, Algérien, 2014.
- S El-Guendouz, S Aazza, B Lyoussi, V Bankova, M Popova, L Neto, M L Faleiro, and M G Miguel, Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure, Hindawi, 2018.
- Siddhuraju P et Becker K, The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) seed extracts, *Food Chemistry* 2007;101(1).
- Silva J F M, Souza M C, Matta S R, Andrade M R, Vidal F V N, Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities, *Food Chemistry* 2006;99.
- Singh R P, Magesh S, Rakkiyappan C, Extrait de racine de gingembre (*Zingiber officinale*): une source de nanoparticules d'argent et leur application, *IJBEST* 2011;02.
- S J Chen, J G Ma, D X Zhao, Z Z Zhi, Y M lu, J Y Zhang, D Z Shen, X W Fa, *Journal of Crystal Growth* 240 (2002).
- S Liebus, Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon 1, 2000.
- Solange M Cottica, Alexandra C H F Sawaya, Marcos N Eberlin, Selma L Franco, Lucia M Zeoula and Jesuí V Visentainer, Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction, Brazil, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2011;22(5).
- Stéphanie GEORGE, Nicolas LAMPROYE, Caractérisation des nano-objets, Tech L'ingénieur, 2014.
- S Touzani, N Al-Waili, N El Menyiy, B Filipic, A Pereyra, I El Arabi, W Al-Waili, B Lyoussi, 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* 2018;11(7).
- S Yallappa, J Manjanna, M A Sindhe, N D Satyanarayan, S N Pramod, K Nagaraja, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 110 (2013).

- Szliszka E et W Krol, Review Article Polyphenols Isolated from Propolis Augment TRAIL-Induced Apoptosis in Cancer Cells, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;10.

(T)

- Tomislav Masek, Natasa Perin, Livio Racané, Maja Cindric, Hana CipicPaljetak, MihaelaPeric, Mario Matijasic, Donatella Verbanac, Bozo Radic, Jelena Suran, Kristina Starcevic, Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Different Extracts of Poplar Type Propolis, *Croatica Chemica Acta* 2018;91(1).

(V)

- Vidhya C, Shilpa H, Chandraprabha M N, Antonyraj M A L, Indu V G, Aayushi J, Bansal K, Synthèse verte de nanoparticules d'oxyde de zinc par *Calotropis gigantea*, *IJCET*, 2013.

(W)

- W Brand-Williams, M Cuvelier et C Bereset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel- Wissenschaft und - Technologie* 1995;28.

(X)

- X Y Kong, Z L Wang, Spontaneous Polarization-Induced Nanohelices, Nanosprings, and Nanorings of Piezoelectric Nanobelts, *Nano Letters* 3 (2003).

(Y)

- Yin Zhang, Tapas R Nayak, Hao Hong, and Weibo Cai, Biomedical Applications of Zinc Oxide Nanomaterials, HHS Public Access, 2014.

(Z)

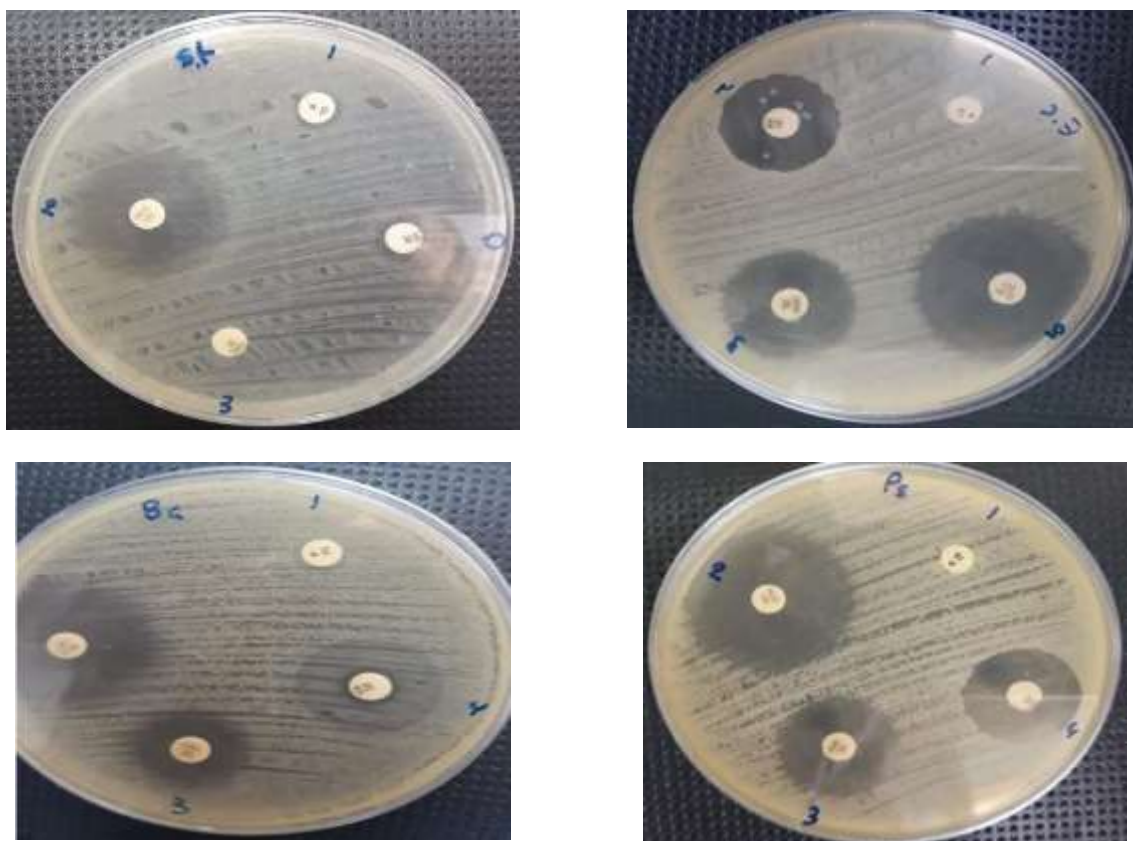
- Z L Wang, Nanostructures of zinc oxide, *SSN Elsevier Ltd*, 7 (2004).
- Z M Huanga, Y Z Zhangb, M Kotakic, S Ramakrishnab, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Compos Sci and Technol* 63 (2003).

**(Sites Web)**

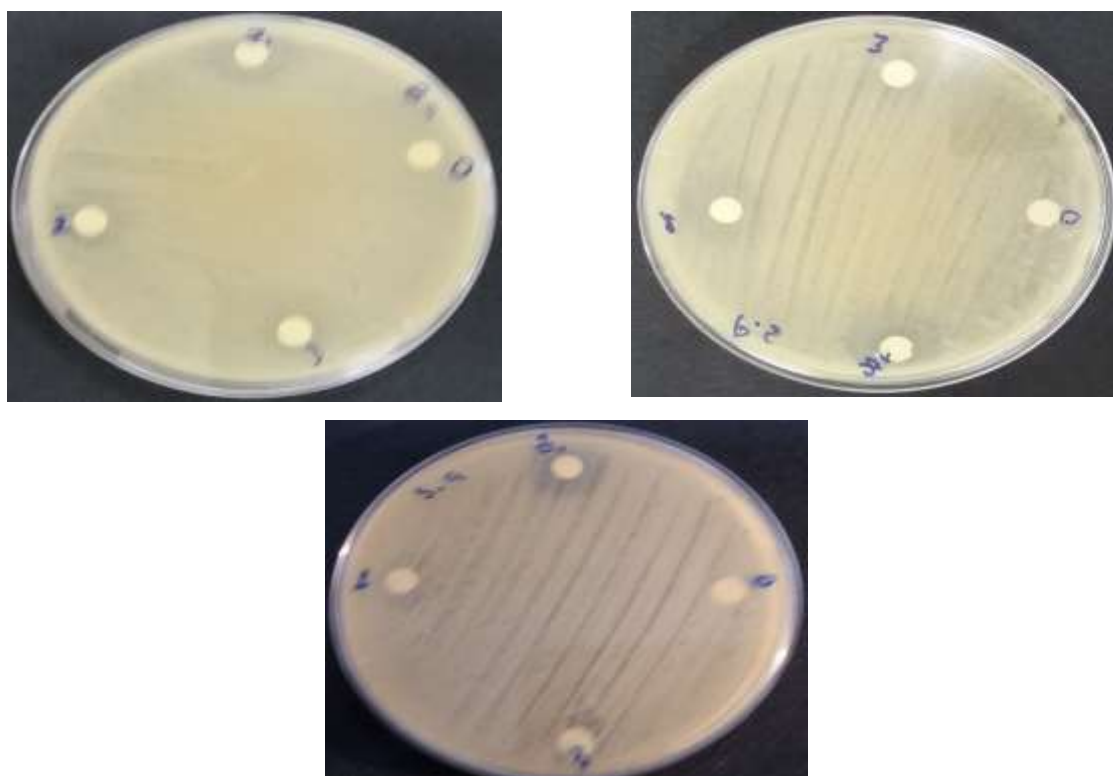
- <http://www.apimab.com/fr/propolis.html>
- [https://www.google.com/search?q=nouvelle+application+des+nanoparticules+organique&sxsrf=ALeKk00Abk5MxlA19AWznuuEsMCbeGiM6g:1599390651568&source=lnms&tbnm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwj06ZK9sfTrAhUB2BoKHeAFCAIQ\\_AUoAnoECAsQBA&biw=1252&bih=574#imgrc=f7I-YofDuRF-AM](https://www.google.com/search?q=nouvelle+application+des+nanoparticules+organique&sxsrf=ALeKk00Abk5MxlA19AWznuuEsMCbeGiM6g:1599390651568&source=lnms&tbnm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwj06ZK9sfTrAhUB2BoKHeAFCAIQ_AUoAnoECAsQBA&biw=1252&bih=574#imgrc=f7I-YofDuRF-AM)

## *Annexes*

Annexe n°: 01



Antibiogramme des germes étudiés en présence de différents antibiotiques



Effet antibactérien du NPs-ZnO sur les souches bactériennes à différentes concentrations

## ***Résumé***

La propolis est une matière première très étudiée de nos jours dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Sa composition chimique dépend de la zone de récolte ce qui reflète la différence de leurs propriétés pharmacologiques particulières. Le but de notre travail est l'extraction des substances bioactives afin de comparer leurs activités antioxydantes et de proposer de nouvelles voies de synthèse des NPs -ZnO efficaces et respectueuses de l'environnement à partir de cet extrait. Nous avons pour cela, sélectionné quatre types de propolis provenant de quatre régions pédoclimatiques différentes, à savoir El Oued, Tébessa, Tipaza et Constantine. Au préalable, Les résultats d'activité antioxydante ont révélé que tous ces extraits ont une activité anti- radicalaire. Entre autres, ces extraits sont utilisés en tant qu'agent réducteur des ions métalliques d'oxyde de zinc dans le milieu aqueux. Ensuite, les nanoparticules fabriquées ont été caractérisées par la spectroscopie FTIR, et MEB. La présente étude a permis de démontrer une activité antibactérienne importante est notée pour les NPs biosynthétisées à l'égard de *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Staphylococcus aureus*.

**Mots clés:** propolis, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne, nanoparticule oxyde de zinc.

## ***Abstract***

Propolis is a very studied raw material nowadays in the food, cosmetic and pharmaceutical sectors. Its chemical composition depends on the harvest area, which reflects the difference in their particular pharmacological properties. The goal of our work is the extraction of bioactive substances in order to compare their antioxidant activities and to propose new routes for the synthesis of effective NPs -ZnO and environmentally friendly from this extract. For this, we have selected four types of propolis from four different pedoclimatic regions, namely El Oued, Tébessa, Tipaza and Constantine. Beforehand, the results of antioxidant activity revealed that all these extracts have anti-free radical activity. Among others, these extracts are used as a reducing agent of zinc oxide metal ions in the aqueous medium. Then, the manufactured nanoparticles were characterized by FTIR, and SEM spectroscopy. The present study has demonstrated significant antibacterial activity, noted for biosynthesized NPs against *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** propolis, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, zinc oxide nanoparticle.