

Influence De L'Origine Géographique Sur Les Caractéristiques Chimiques Et Biologiques Des Propolis D'apiculture De Deux Régions Des Hautes Terres Et De La Côte Nord-Est De Madagascar

Sylviano JULLIE ANDRIANIMANANA¹ ; Rovantsoa Jemima ANDRIANARISON¹ ; Edouard Ravalison ANDRIANARISON²

¹Laboratoire de Chimie Innovante et Ingénierie de la Transformation de l'Ecole Doctorale en Sciences et Techniques de l'Ingénierie et de l'Innovation de l'Université d'Antananarivo

²Laboratoire de Chimie Organique du Département Génie des Procédés Chimiques et Industriels de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo
Correspondance e-mail : ajsylviano@gmail.com



Résumé – La propolis, fait partie de l'un des meilleurs des produits provenant de la ruche à cause de sa composition chimique. C'est une matière biologique fabriquée par les abeilles pour construire et protéger la ruche.

L'objectif de ce travail de recherche est la comparaison des caractéristiques chimiques et biologiques de propolis des communes d'Ivato et de Sambava des Hautes Terres et de la côte Nord-Est de Madagascar. Après collecte et extraction par un système de solvant hydro-éthanolique 90/10 (volume/volume), le criblage chimique réalisé sur les extractibles des propolis étudiées a montré la présence majoritaire de flavonoïdes, de coumarines, de composés terpéniques et de stérols insaturés dans ces propolis.

Les antibiogrammes réalisés sur quatre souches bactériennes et une souche fongique ont démontré que l'extrait brut éthanolique de la propolis de Sambava est moins actif biologiquement comparé à celui de la propolis d'Ivato. Cette dernière dispose particulièrement des activités biologiques vis-à-vis des souches bactériennes testées à gram positif *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus* et à gram négatif *Salmonella enteridis* avec des diamètres des halos d'inhibition respectifs allant de 7 à 11 millimètres. Après partage, l'extrait à l'acétate d'éthyle de la propolis d'Ivato s'est révélé actif contre la souche bactérienne *Bacillus cereus* (diamètre d'inhibition de 9 millimètres) et la souche fongique *Candida albicans* (diamètre d'inhibition de 11,5 millimètres).

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince suivie de la pulvérisation des plaques avec des réactifs chimiques spécifiques révèle la présence de flavonoïdes, de coumarines, de composés terpéniques et de stérols insaturés, substances chimiques probablement responsables des activités biologiques dans les propolis étudiées. Ces substances se retrouvent également dans la fraction acétate d'éthyle d'Ivato. Après extraction éthanolique, un résidu solide, dont la composition chimique reste à déterminer, a été récupéré.

Mots clés – Criblage Chimique, Antibiogramme, Chromatographie, Activité Biologique, Résidu Solide

Abstract – Propolis, is one of the best products to come from the hive, thanks to its chemical composition. It is a biological material produced by bees to build and protect the hive.

The aim of this research work is to compare the chemical and biological characteristics of propolis from the Ivato and Sambava communes in the Highlands and North-East coast of Madagascar. After collection and extraction using a hydro-ethanol solvent system 90/10 (volume/volume), chemical screening carried out on the propolis extracts studied showed the presence of a majority of flavonoids, coumarins, terpene compounds and unsaturated sterols in these propolis.

Antibiograms carried out on four bacterial strains and one fungal strain showed that the crude ethanolic extract of Sambava propolis is less biologically active than Ivato propolis. The latter is particularly active against the gram-positive bacterial strains *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereus* and gram-negative *Salmonella enteridis* tested, with respective inhibition halo diameters ranging from 7 to

11 millimeters. After partitioning, the ethyl acetate extract of Ivato propolis proved active against the bacterial strain *Bacillus cereus* (inhibition diameter 9 millimeters) and the fungal strain *Candida albicans* (inhibition diameter 11,5 millimeters).

Qualitative analysis by thin-layer chromatography followed by spraying of the plates with specific chemical reagents reveals the presence of flavonoids, coumarins, terpene compounds and unsaturated sterols, chemical substances probably responsible for the biological activities in the propolis studied. These substances are also found in the Ivato ethyl acetate fraction. After ethanolic extraction, a solid residue, whose chemical composition remains to be determined, was recovered.

Keywords – Chemical Screening, Antibiogram, Chromatography, Biological Activity, Solid Residue.

I. INTRODUCTION

La propolis, matière biologique fabriquée par les abeilles pour construire et protéger les ruches. C'est une résine dure à plusieurs composants trouvée dans les ruches d'abeilles *Apis mellifera*. La propolis est un produit dont les multiples vertus sont reconnues tant sur les humains que sur les abeilles elles-mêmes. La dénomination de propolis elle-même est formée de deux mots grecs « *pro* » qui signifie défense, et « *polis* » ou ville [1]. En fait, les abeilles utilisent la propolis pour protéger la ruche des intrus, assainir les ruches, boucher les trous dans leurs nids d'abeilles et lutter contre différentes sortes de micro-organismes.

Elle est connue depuis l'Antiquité pour ses multiples usages : vertus antiseptiques et cicatrisantes. Les Egyptiens l'utilisaient pour embaumer et conserver les momies, et les Grecs comme remède aux affections de la peau [2].

La lutte contre les maladies d'origine bactérienne et fongique et l'arrivée précoce des maladies dues au désordre métabolique du corps humain comme le cancer, les pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire), les maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale et maladie d'Alzheimer) [3], les maladies cardiovasculaires, le diabète, le syndrome métabolique et les maladies digestives [4] causée la dégradation incessante de l'environnement humain par suite du développement économique, nécessitent la recherche de produits innovants d'origine naturel, telle que la propolis. En effet, la propolis, co-produit issu de la ruche dont la première vocation est la production de miel, de par sa composition et sa variabilité chimique, s'avère une source prometteuse pour la découverte de nouveaux produits pharmaceutiques. La propolis ou colle d'abeille est une matière collante de couleur rouge foncée ou brune que les abeilles mellifères (*Apis mellifera*) recueillent sur les bourgeons et les feuilles des arbres et d'autres plantes, mélangée à du pollen ainsi qu'à des enzymes sécrétées par les abeilles [5]. La propolis brute est généralement composée de 50 % de résines végétales, de 30 % de cires, de 10 % d'huiles essentielles et aromatiques, de 5 % de pollens et de 5 % d'autres substances organiques [6]. Au cours des dernières décennies, plusieurs travaux traitant de la composition et des propriétés biologiques de la propolis ont été publiés, révélant l'intérêt des chercheurs pour ce produit apicole et son potentiel pour le développement de nouveaux médicaments [7]. Ainsi, la propolis contient divers composés chimiques tels que des composés phénoliques comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les polyphénols, des terpénoïdes, des stéroïdes, des coumarines, des acides aminés et des composés inorganiques [8]. Elle est connue depuis longtemps pour ses effets bénéfiques sur la santé et a fait l'objet de nombreuses recherches. Les analyses de divers échantillons de propolis provenant de différentes régions ont démontré une distinction significative de la composition de la propolis par variabilité géographique [9]. Ainsi, la standardisation de la composition de la propolis est un défi par sa variabilité de sa composition chimique. Cependant, riches en flavonoïdes, en acides phénoliques et en dérivés terpénoïdiques, la propolis a été largement utilisée pour ses propriétés antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires. Les analyses chimiques ont mis en évidence des molécules intéressantes qui présentent des propriétés antioxydantes et antiprolifératives intéressantes dans le domaine de la thérapie anti-cancéreuse [10]. L'objectif de cette étude est d'évaluer les activités antibactériennes et antifongique des extraits de propolis issues d'apiculture de deux régions des Hautes Terres Malgaches de la Commune d'Ivato, région Analamanga et de la côte Nord-Est de Madagascar, commune de Sambava, région de SAVA.

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Propolis

Les échantillons de propolis utilisés pour cette étude ont été récoltés des apicultures de la commune d'Ivato, de la Région Analamanga et de la commune de Sambava, de la région de SAVA respectivement aux mois de juillet et de juin des années 2020 et 2021, définies par les coordonnées géographiques des lieux de récolte, latitude -18.822157, longitude 47.46532, 18°49'19.766''S , 47°27'55.152''E et latitude -14.26667, longitude 50.16667, 14°16'0.012''S, 50°10'0.012''E. Après collecte,

les échantillons de propolis sont disposés dans des emballages étanches en matière plastique puis conservés à l'abri de la lumière avant utilisation. Avant de réaliser l'extraction de propolis, un triage a été effectué sur les propolis collectées afin d'enlever toutes les impuretés visibles comme les morceaux de bois et les débris d'insectes. Après triage, les échantillons sont alors disposés dans des flacons de verre puis acheminés vers notre Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles de l'Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo pour les études chimiques.

2.2. Extraction

L'extraction éthanolique a pour objectif d'extraire la plus grande quantité possible de substances chimiques solubles, incluses dans la propolis, par une solution hydro-éthanolique comme solvant d'extraction.

Les prélèvements d'échantillon de masse bien définie sont soumis à deux macérations successives de 48 heures dans un erlenmeyer, avec agitation au moyen d'un agitateur magnétique, dans le mélange éthanol-eau 90/10 (v/v) comme solvant d'extraction. Après cette étape de macération, le mélange est filtré sous vide au moyen d'un filtre Büchner. Le filtrat obtenu à partir de l'échantillon d'Ivato est de couleur noirâtre alors que celui de Sambava est de couleur rougeâtre. Le filtrat obtenu est soumis à l'évaporation sous pression réduite jusqu'à siccité au moyen de l'évaporateur rotatif BÜCHI combiné à une pompe à vide VACUUBRAND MD 4C CE01. Les extraits bruts éthanoliques de propolis sous forme de gomme résineuse obtenus sont alors pesés au moyen de balance de précision METTLER puis recueillis et introduits dans des flacons de verre sombres hermétiques. Ils sont finalement conservés dans le réfrigérateur maintenu à 5°C à l'abri de la lumière solaire afin d'éviter l'oxydation à l'air. Les extraits bruts éthanoliques PX de propolis d'Ivato de Sambava sont respectivement nommés PI et PS.

Après chaque extraction, les résidus solides d'extraction de la propolis sont récupérés et disposés dans des récipients hermétiques conservés à l'abri de l'air, de la lumière et de l'humidité à des fins d'utilisations ultérieures.

Rendement d'extraction éthanolique

Les rendements en extraits bruts éthanoliques R (%) obtenu sur les propolis étudiées sont calculés à partir de la relation suivante :

$$R (\%) = \frac{\text{masse de l'extrait brut éthanolique obtenu}}{\text{masse de l'échantillon de propolis prélevé}} \times 100$$

2.3. Analyse qualitative par screening chimique des extraits éthanoliques

L'objectif du screening chimique est de mettre en évidence la présence de différentes substances naturelles d'origine biologique dans les propolis étudiées par réaction avec des réactifs chimiques spécifiques de chaque famille de substances naturelles. La méthode utilisée est celle appliquée pour les screening phytochimiques des extraits de plantes.

2.3.1. Alcaloïdes

A 500 mg d'extrait brut hydroéthanolique de propolis sont ajoutés 10 ml de solution aqueuse diluée 2N d'acide chlorhydrique HCl aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 mn tout en agitant avec une baguette de verre. Après, le mélange obtenu est refroidi puis filtré sur papier Whatman. Après avoir ramené le volume du filtrat à 10mL par addition de HCl 2N, celui-ci est réparti dans quatre tubes à essai dont l'un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde [11]. La réalisation de trois tests différents est nécessaire pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans l'extrait de propolis analysé et éviter la confusion par la présence de réactions faussement positives [12] [13].

- Test au réactif de Mayer : la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de flocon de précipité blanc lors de l'addition de tétraiodomercurate de potassium (solution mélange de HgCl₂ et d'iodure de potassium KI) dans l'extrait acide.
- Test au réactif de Wagner : la présence d'alcaloïde se révèle à l'apparition de précipité rouge orangé lors de l'addition de réactif iodo-ioduré (solution mélange de diiode I₂ et d'iodure de potassium KI) dans l'extrait analysé.

- Test au réactif de Dragendorff : la présence d'alcaloïde est révélée par l'apparition de précipité orange lors de l'addition de tétraiodobismuthate de potassium (solution mélange de sous-nitrate de bismuth et d'iodure de potassium KI) dans l'extrait testé.

2.3.2. Flavonoïdes

Une masse de 200 mg d'extrait de propolis sont dissouts dans 10 ml d'éthanol à 90%. Après filtration, 1 ml de cette solution hydroéthanolique est additionné de 0,5 ml de HCl concentré et de quelques grains de tournure de magnésium. Après 10 mn de réaction, la présence de flavonoïdes est révélée par l'apparition d'une coloration rouge [11].

2.3.3. Anthocyanes

A 2 ml de solution éthanolique d'extrait de propolis, on ajoute 2 mL de solution d'acide chlorhydrique dilué à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la présence d'anthocyanes [14].

2.3.4. Leucoanthocyanes

A 2 ml de solution éthanolique d'extrait sont additionnés 2 ml de HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge démontre la présence de leucoanthocyanes [14].

2.3.5. Tanins et autres composés phénoliques

L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25ml d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4ème tube servant de témoin [11] [15].

- Tube n°1 : addition de cinq gouttes de préparation de gélatine à 1% dans l'eau. L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.
- Tube n°2 : addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume de gélatine à 1% et de solution aqueuse de NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de tanins.
- Tube n°3 : addition de cinq gouttes de FeCl₃ dilué à 1% dans le méthanol.
 - La présence de tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire.
 - La présence de tanins catéchiques (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre.
 - Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl₃, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

2.3.6. Coumarines

Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait éthanolique, on ajoute 10 ml d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 ml du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) sous UV 365nm indique la présence des coumarines (méthode indicative et non une identification) [15] [12].

2.3.7. Triterpènes et stéroïdes

Prendre 500mg de l'extrait hydroalcoolique dépigmenté ou d'extrait organique et y ajouter 20 ml de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 mn. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans cinq tubes à essais propres et secs. Le tube n°5 servira de témoin [11] [16].

- *Test de Liebermann Burchard :*

Dans le tube N°1, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :

- a) pourpre : présence de triterpènes ;
- b) violet ou bleu-vert : présence de stéroïdes.

- *Test de Salkowski :*

Incliner le tube à 45° puis ajouter 1mL d'acide sulfurique concentré. Après 30mn, la présence de stéroïdes insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.

- *Test de Badjet Kedde :*

Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.

- *Test de Keller-Killiani :*

Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl₃ à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxy-2-sucres.

2.3.8. Quinones

200 mg d'extrait organique sont dissous 5 mL d'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 ml d'extrait benzénique sont ajoutées 5 ml de solution aqueuse d'ammoniaque NH₄OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangé ou rouge violacé de la phase ammoniacale indique un test positif [12] [17] [18].

2.3.9. Saponines (test de mousse)

Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est disposée dans un tube à essai puis additionnée de 20mL d'eau distillée et agitée vigoureusement pendant 30 secondes. Le tube est ensuite disposé verticalement. Après 10 mn de repos, une hauteur de la mousse persistante, supérieure ou égale à 3 cm, indique la présence de saponines [11].

2.3.10. Composés cyanogénétiques

Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 ml de dichlorométhane. Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na₂CO₃ + 0,5g d'acide picrique + 100ml d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 heures. La présence des composés cyanogénétiques est indiquée par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN [17] [18].

2.4. Fractionnement des extraits éthanoliques

La méthode d'extraction en cascade liquide-liquide est utilisée pour effectuer la partition des substances naturelles de propolis de différentes polarités dans une succession de solvants S à polarité croissante allant du moins polaire au plus polaire (dans l'ordre hexane H, dichlorométhane D, acétate d'éthyle A, butanol B).

La masse définie d'extrait brut éthanolique de propolis PX à partager est d'abord dissoute dans le système de solvant eau - éthanol (W-E) 50/50 (v/v) puis ajouté d'un volume défini d'hexane. Le mélange est ensuite disposé dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation, on observe deux phases bien distinctes. La phase hexanique surnageante est recueillie puis la phase aqueuse inférieure est traitée deux fois par le même procédé avec le même solvant. Les phases hexaniques rassemblées sont déshydratées avec le sulfate de sodium Na₂SO₄ anhydre, puis filtrées afin d'éliminer les éléments insolubles et enfin évaporées à sec sous pression réduite à 160 mmHg et à 40°C afin d'obtenir l'extrait sec hexanique PXH correspondant.

Par le même procédé, la phase aqueuse est reprise puis extraite par mise en contact en cascade avec les autres solvants d'extraction, du moyennement polaire vers le plus polaire selon le flow-sheet du processus d'extraction par partage liquide/liquide décrit ci-dessous, conduisant alors aux extraits secs successifs PXS (PXD, PXA, PXB et PXW).

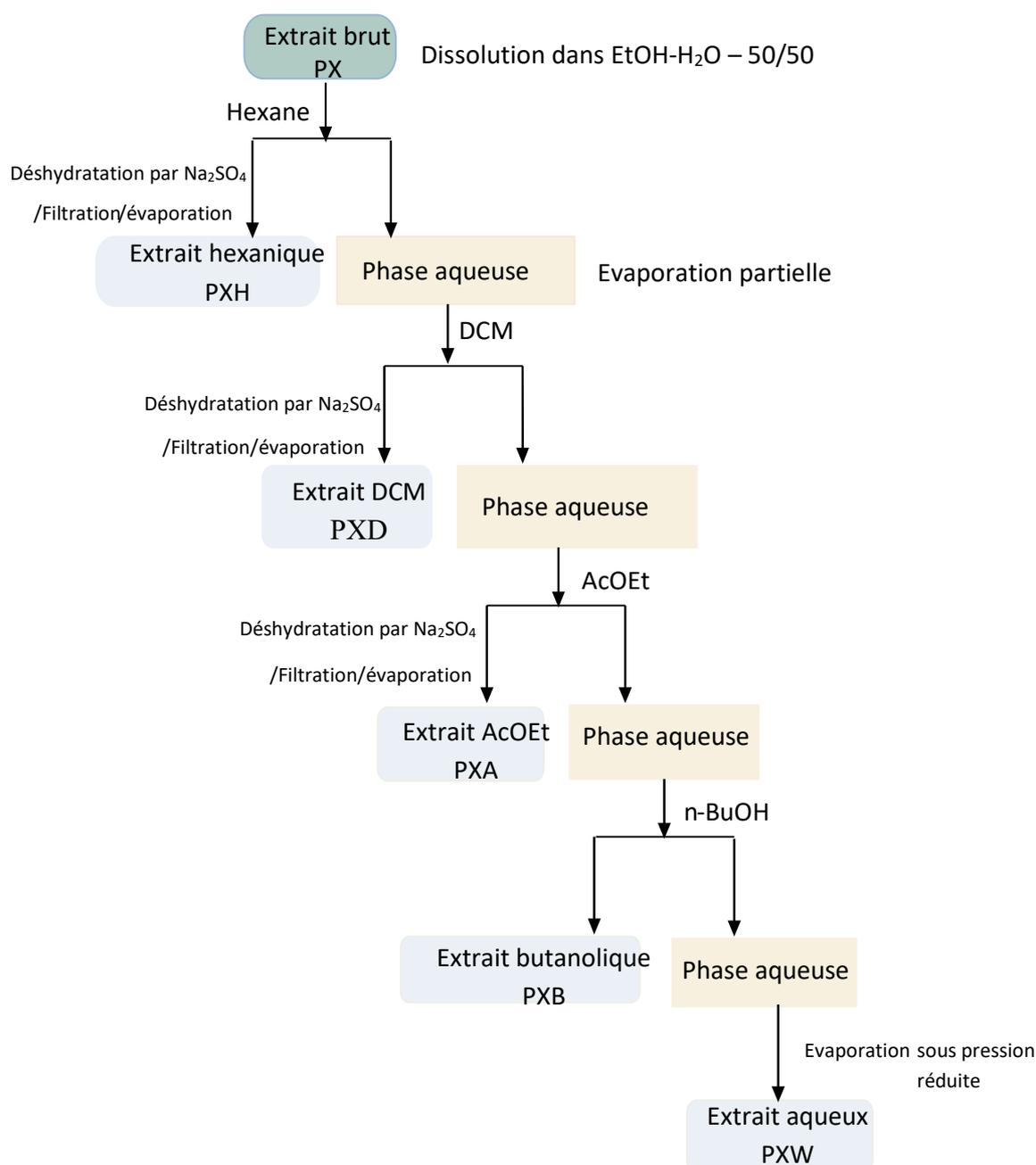


Figure 1. Flow-sheet du processus d'extraction par partage liquide/liquide

2.5. Révélation des principes actifs par CCM

Les principes actifs au sein des extraits de propolis PXS révélés biologiquement actifs sont mis en évidence par méthode « bioautography » de chromatographie sur couche mince (CCM) par élution sur des chromatoplaques à gel de silice GF254 sur

support en aluminium. Après élution, les plaques chromatographiques sont successivement observées à l'œil nu dans le visible, aux lumières UV 254 nm et 365 nm avant et après pulvérisation par des réactifs appropriés.

Les différents réactifs spécifiques utilisés pour les révélations sont :

- Le réactif de Liebermann-Bürchard et la vanilline sulfurique dans l'éthanol à 1% pour la mise en évidence des stérols et terpènes ;
- La potasse KOH méthanolique à 5% et l'ammoniaque NH₄OH à 25% sont employées pour révéler la présence des coumarines ;
- Le trichlorure d'aluminium AlCl₃ à 1% dissout dans l'éthanol absolu sert de réactif pour la révélation des flavonoïdes ;
- Le chlorure ferrique FeCl₃ à 1 % dans le méthanol sert de révélateur des tanins et des composés phénoliques [19].

2.6. Tests d'activité antibactérienne et antifongique des extraits de propolis

Les extraits partitionnés à différents solvants sont soumis à des tests d'activité biologique sur trois souches bactériennes et une souche fongique au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE. La méthode utilisée est la méthode de diffusion sur gélose. Le principe de base de cette méthode est de diffuser de l'extrait de propolis à essayer sur un disque antibiogramme de taille standard de 6 mm de diamètre. En effet, la diffusion de l'extrait sur le milieu (la gélose) peut inhiber la croissance des souches testées. Une zone d'inhibition de la culture microbienne autour du disque indique que l'extrait est actif, et la mesure de ce diamètre du halo d'inhibition permet d'évaluer la sensibilité des souches testées et l'activité biologique des extraits. Les souches de référence fournies par le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement CNRE Tsimbazaza et ayant servi aux tests d'activité antibactérienne des extraits de propolis sont respectivement :

- les bactéries Gram+ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, *Bacillus cereus* ATCC 13061 et *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 ;
- la bactérie Gram- *Salmonella enteridis* ;
- et la souche fongique *Candida albicans*.

Le bouillon Mueller-Hinton sert de milieu liquide nutritif utilisé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aérobies et anaérobies facultatives vis à vis des agents antimicrobiens. Il est utilisé comme milieu de culture pour réaliser la technique d'antibiogramme en méthode de dilution ou bien comme milieu de base pour préparer tout inoculum bactérien [20]. La méthode sert alors à évaluer les activités antimicrobiennes des extraits de propolis.

Dans notre cas, nous avons utilisé la concentration de 100 mg/ml dans le solvant de solubilisation éthanol.

Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur chaque culture ensemencée disposée dans une boîte de Pétri. Ensuite, les disques sont imprégnés de 10 µL de solution d'extraits de propolis à l'aide d'une micropipette.

Toutes les boîtes ainsi préparées sont ensuite incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes et pendant 48 h à 25°C pour *Candida albicans* [21].

Le tableau 1 indique la norme utilisée pour apprécier les sensibilités des souches microbiennes dans la méthode disque selon H. LECLERC et al. [22]. Les mesures sont exprimées en termes de diamètre X du halo de la zone d'inhibition exprimé en mm.

Tableau 1 : Norme utilisée pour l'appréciation de la sensibilité des souches microbiennes dans la méthode de disque [22]

Diamètre du halo ou de la zone d'inhibition : (X en mm)	Sensibilité des germes	Résultats
$X \leq 7$ mm	Insensible	-
$7\text{mm} < X \leq 8$ mm	Assez sensible	+
$8\text{mm} < X \leq 9\text{mm}$	Sensible	++
$X > 9\text{mm}$	Très sensible	+++

Source : H. Leclerc et al., 1983

III. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Extraction éthanolique

Les rendements d'extraction éthanolique des propolis étudiés sont donnés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Rendements en extrait éthanolique des propolis PI et PS

Désignation de l'extrait propolis étudiée	Aspect de l'extrait éthanolique	Rendement d'extraction éthanolique (%)
PI	noirâtre	49,527
PS	rougeâtre	40,631

Ce tableau nous indique à première vue la différence existante entre les couleurs et les quantités d'extractible obtenues par le système de solvant éthanol-eau 90/10 – (v/v). Ces résultats nous renseignent sommairement sur la différence de composition des deux types de propolis étudiées qui s'avère très variable en fonction des origines géographiques de prélèvement, du milieu et de la flore environnant la ruche, et probablement les plantes butinées par les abeilles.

3.2. Résultats d'analyse chimique qualitative des extraits éthanoliques

Le tableau 3 ci-dessous représente les résultats du screening chimique des extraits de propolis étudiés PI et PS.

Tableau 3 : Résultats d'analyse chimique qualitative des extraits éthanoliques PI et PS

Famille de substances naturelles analysées	Extrait éthanolique de propolis	
	PI	PS
Alcaloïdes	-	-
Flavonoïdes	+++	+++
Anthocyanes	-	-
Leucoanthocyanes	-	+
Tanins galliques et ellagiques	++	-
Tanins catéchiques	-	+
polyphénols	+	+
Coumarines	++	++

Triterpènes	+++	+++
Stérols insaturés	+++	+
Stéroïdes lactoniques	+	-
Desoxy-2-sucres	+	++
Quinones	-	-
Saponines	-	-
Composés cyanogénétiques	-	-
Iridoïdes	-	-

- : néant + : faible ++ : abondant +++ : fort

L'observation de ces résultats d'analyse par screening chimique de ce tableau 3 nous montre que les extraits éthanoliques de propolis PI et PS renferment en commun des flavonoïdes, des coumarines, des triterpènes, des stérols insaturés, des desoxy-2-sucres et des polyphénols. Leur différence revient au fait que l'extrait PI contient en particulier des tanins galliques et ellagiques et des stéroïdes lactonique alors que l'extrait PS renferme des leucoanthocyanes et des tanins catéchiqes. Cependant, malgré la variabilité de composition chimique des deux propolis étudiées, c'est la présence de ces métabolites secondaires qui procure aux propolis leurs nombreuses activités biologiques dont quelques-unes sont élucidées dans ce travail.

3.3. Résultats d'extraction de partage en cascade des propolis

Les rendements (%) de partage par extraction en cascade des extraits de propolis PI d'Ivato et PS de Sambava sont représentés dans les tableaux 4 et 5 ci-dessous.

Tableau 4 : Résultats de partage en cascade de l'extrait de propolis PI d'Ivato

Solvant de partage	Volume de solvant (ml)	Notation de l'extrait	Masse d'extrait par partage (g)	Rendement (%)
Hexane	600	PIH	0,459	11,803
DCM	600	PID	0,512	13,165
AcOEt	600	PIA	1,294	33,273
n-BuOH	600	PIB	1,422	36,565
Eau	-	PIW	0,200	5,143

Tableau 5 : Résultats de partage en cascade de l'extrait de propolis PS de Sambava

Solvant de partage	Volume de solvant (ml)	Notation de l'extrait	Masse d'extrait par partage (g)	Rendement (%)
Hexane	600	PSH	0,824	16,888
DCM	600	PSD	1,088	22,299
AcOEt	600	PSA	1,137	23,314
n-BuOH	600	PSB	1,580	32,402
Eau	-	PSW	0,237	4,857

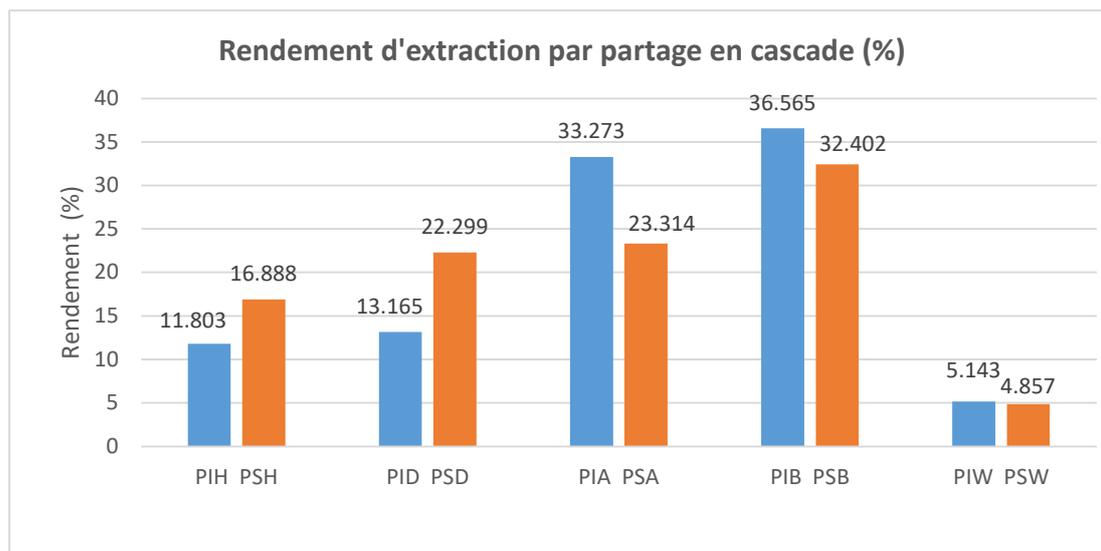


Figure 2. Histogramme des rendements d'extraction par partage des propolis PI et PS

Les résultats obtenus pour les deux variétés d'extraits de propolis montrent que celles-ci sont constituées de substances à majorité polaire qui se trouvent extraites par le n-butanol aux rendements respectifs en PIB de 36,565% et en PSB de 32,402 %. Les taux de composés moyennement extraits par le solvant acétate d'éthyle (solvant moyennement polaire) sont également élevés avec le taux de PIA de 33,273% et de PSA de 23,314 %. Les pourcentages de substances chimiques peu polaires extraites au solvant de partage DCM sont moyennement élevés avec un taux de PSD de 22,299 % et PID de 13,165%. Des substances apolaires se trouvent extraites par l'hexane (solvant apolaire) avec des rendements d'extraction respectifs de 11,803% de PIH et de 16,888% de PSH.

Nos résultats démontrent alors que les propolis d'Ivato et de Sambava sont en majorité constituées de substances polaires solubles dans l'acétate d'éthyle et dans le n-butanol, et de produits naturels moyennement polaires solubles dans dichlorométhane et en minorité contiennent des substances apolaires solubles dans l'hexane. Ces résultats ont montré aussi que respectivement 5,143% et 4,857% des substances constitutives de PI et de PS sont très polaires et se trouvent retenues dans les phases aqueuses.

3.4. Résultats de la révélation des principes actifs par CCM

La présence de substances naturelles actives dans les extraits de propolis est démontrée par chromatographie sur couche mince. L'élution des extraits de partage est réalisée par le mélange de solvant en DCM-méthanol 96/4 – (v/v). Les résultats sont répartis dans les tableaux 6, 7, 8, 9 et 10 suivants.

Tableau 6 : Résultats de CCM des stéroïdes et des terpénoïdes par révélation au réactif de Liebermann Burchard

Extraits de propolis	Rapport frontal R_f	Couleur observée après pulvérisation au réactif de Liebermann Burchard		Résultats
		254 nm	365 nm	
PIA	0,17	bleu	Jaune	Stéroïdes
PSA	0,09	bleu	jaune	Stéroïdes

Tableau 7 : Résultats de CCM des tanins et des composés phénoliques par révélation au chlorure ferrique FeCl₃

Extraits de propolis	Rapport frontal R _f	Couleur observée après révélation par FeCl ₃ à 1% dans le méthanol		Résultats
		dans le visible	UV 365 nm	
PIA	0,03	noir	bleu noir	tanins
PSA	0,52	noir	-	-

Tableau 8 : Résultats de CCM des coumarines révélée à la potasse caustique KOH

Extraits de propolis	Rapport frontal R _f	Couleur observée après révélation au KOH 5%		Résultats
		dans le visible	365 nm	
PIA	0,07	jaune	vert	coumarines
PSA	0,28	jaune pâle	bleu	coumarines

Tableau 9 : Résultats de CCM des dérivés phénoliques, stéroïdes et terpénoïdes à la vanilline sulfurique

Extraits de propolis	Rapport frontal R _f	Couleur observée dans le visible après révélation à la vanilline sulfurique	Résultats
PIA	0,45	violet	terpènes
	0,91	bleu violet	terpènes
PSA	0,49	violet	terpènes
	0,96	bleu violet	terpènes

Tableau 10 : Résultats de CCM des flavonoïdes révélée au trichlorure d'aluminium AlCl₃

Extraits de propolis	Rapport frontal R _f	Couleur observée après révélation avec AlCl ₃ à 1% dans l'EtOH absolu	Résultats
		UV-365nm	
PIA	0,06	fluorescence jaune	flavonoïdes
	0,17	jaune	flavonoïdes
	0,64	jaune	flavonoïdes
PSA	0,18	jaune	flavonoïdes

D'après ces résultats de révélation indiquent que les extraits PIA et PSA contiennent des stéroïdes, des coumarines, des terpènes et des flavonoïdes alors que seul l'extrait PIA renferme des tanins.

3.5. Résultats des tests d'activité antibactérienne et antifongique des extraits de propolis d'Ivato et de Sambava par la méthode de diffusion sur gélose

Les extraits bruts PI et PS, et les extraits partagés sont testés sur quatre souches bactériennes à gram+ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Staphylococcus aureus* ATCC 11632 et à gram- *Salmonella enteridis* et sur la souche fongique *Candida albicans*. Les résultats des tests d'activités antibactériennes et antifongique des extraits bruts PI et PS sont donnés dans le tableau 11 et ceux des extraits partagés sont résumés dans le tableau 12.

Tableau 11 : Résultats des tests d'activité biologique des extraits bruts de PI et de PS sur les souches bactériennes et fongiques testées

Germe-test	Diamètre des halos d'inhibition (mm)					
	Extrait		Antibiotique de référence			
	PI	PS	NA30	FA10	SXT25	Extrait butanolique de <i>Streptomyces</i> sp.
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6301	8	7	-	20	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	8,5	7	-	10	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 11632	6,5	6,5	-	-	16	-
<i>Salmonella enteridis</i>	11	7,5	19	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	6,5	6,5	-	-	-	21

Les résultats de tests biologiques du tableau 11 indiquent que l'extrait PS est pratiquement inactifs vis-à-vis des souches microbiennes testées malgré une activité antibactérienne vis-à-vis de *Salmonella enteridis* avec un faible diamètre de halo d'inhibition de 7,5mm alors que l'extrait brut PI possède une activité antibactérienne assez forte vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae*, de *Bacillus cereus* (d respectifs de 8mm et 8,5mm) et relativement forte sur *Salmonella enteridis* avec un diamètre d'inhibition de 11mm.

L'analyse biologique réalisée sur les deux extraits bruts de propolis étudiés démontre que la propolis PI est plus importante en activité antimicrobienne comparée à la propolis PS. Ainsi, la suite des études d'activité biologique a été uniquement menée sur les extraits partitionnés de propolis PI d'Ivato.

3.4.2. Résultats des tests antimicrobiens des extraits partagés de PI

Le tableau 12 donne les détails des résultats de ces dernières analyses d'activité antimicrobienne et antifongique des extraits obtenus après partition à divers solvants.

Tableau 12. Diamètre des halos d'inhibition (mm) des extraits partagés de PI sur les souches testées

Germe-test	Diamètre des halos d'inhibition (mm)								
	Extrait					Antibiotique de référence			
	PIH	PID	PIA	PIB	PIW	NA30	FA10	SXT25	Extrait butanolique de <i>Streptomyces</i> sp.
<i>S.pneumonia</i> ATCC 6301	7	7	7	7	7	-	20	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	7,8	7	9,0	7	7	-	14	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 11632	7	7	7	7	7	-	-	18	-
<i>S. enteridis</i>	7	7	7	7	7	17	-	-	-
<i>C. albicans</i>	7	7	11,5	7	7	-	-	-	20

Le tableau 12 ci-dessus montre que seule la fraction PIA possède une activité antimicrobienne vis-à-vis des *Bacillus cereus* et de *Candida albicans*. Ainsi, l'extrait d'acétate d'éthyle PIA d'Ivato est plus actif vis-à-vis de *Candida albicans* dont le diamètre de halo d'inhibition est de 11,5 mm. De ce fait, cet extrait PIA pourrait être utilisé pour lutter contre le champignon *Candida albicans* qui est responsable de nombreuses infections des muqueuses gynécologiques et digestives.

Selon les analyses par screening chimique des extraits partitionnés, les substances naturelles responsables des activités biologiques de l'extrait de partage à l'acétate d'éthyle PIA de la propolis d'Ivato sont probablement des stéroïdes, des coumarines, des terpènes ou des flavonoïdes et des tanins.

3.6. Discussion

Les propolis provenant des Hautes Terres et sur la côte Nord-Est de Madagascar renferment des flavonoïdes, des tanins galliques et ellagiques, des polyphénols, des leucoanthocyanes, des tanins catéchiques, des polyphénols, des coumarines, des triterpènes et des stéroïdes. La présence de ces composés chimiques dans les propolis a été confirmée par des travaux de recherches antérieures. En effet, 241 composés ont été identifiés dans la propolis entre 2000 et 2012, notamment des flavonoïdes, des phenylpropanoïdes, des terpènes, des stilbènes, des lignanes, de la coumarine et des dérivés prenylés. Cette présence est liée à la diversité des emplacements géographiques, des sources végétales et des espèces d'abeilles [23]. D'autres chercheurs ont confirmé cette diversité par la découverte d'alcaloïdes dans l'extrait éthanolique de propolis d'Indonésie [24] alors que nos échantillons n'en renferment pas. Aussi, l'étude des activités antibactérienne et antifongique de nos échantillons nous a affirmé que les propolis de Madagascar sont actives vis-à-vis des souches *Bacillus cereus*, *Salmonella enteridis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Candida albicans* et peu actives vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dont les zones d'inhibition des échantillons sur les souches testées varient de 6,5 mm à 11,5 mm à une concentration de 100 mg/ml. Des échantillons de propolis prélevés dans 15 ruchers situés dans différentes régions de Pologne sont actifs vis-à-vis de *B. cereus* avec une zone d'inhibition allant de 12 mm à 27 mm [25] et ceux de la région Nord-Ouest de l'Iran sont actifs contre les souches fongiques testées *Candida albicans* [26], de manière pareille au cas des propolis issues des régions Nord-Est et Hautes Terres de Madagascar. Des résultats intéressants ont été observés en Inde : l'extrait éthanolique a montré des diamètres d'inhibition assez élevés de 14,5 mm contre *Bacillus subtilis*, de 13,6 mm contre *Escherichia coli*, et de 13,2 mm vis-à-vis de *Candida albicans* à une concentration de 200 mg/ml [27]. De plus, une activité élevée de la propolis du Moyen-Orient a été constatée vis-à-vis des souches à gram+ (*Staphylococcus aureus*) et gram- (*Escherichia coli*). L'activité la plus faible a été démontrée pour des échantillons de propolis provenant d'Allemagne, d'Irlande et de Corée [28]. Nous pouvons dire que les flavonoïdes et les polyphénols sont responsables de l'activité antimicrobienne de la propolis. En effet, il semble que nos échantillons soient plus actifs à faible concentration.

IV. CONCLUSION

Il est important de connaître les propriétés spécifiques de la propolis, une substance résineuse récoltée par les abeilles *Apis mellifera* sur certaines parties des végétaux comme les bourgeons ou écorces, grâce à la présence des substances chimiques qu'elles contiennent. Les résultats obtenus dans ce travail permettent de conclure la différence de caractéristiques chimiques et biologiques des échantillons de propolis locales étudiées, celle d'Ivato PI et celle de Sambava PS. Cependant, nos propolis sont en commun et en majorité composées de substances polaires solubles dans le n-butanol et dans l'AcOEt. De plus, des substances naturelles moyennement polaires sont également présentes dans d'extrait au solvant dichlorométhane. La révélation des principes actifs par CCM a montré que l'extrait PIA contient des stéroïdes, des tanins, des coumarines, des terpènes et des flavonoïdes et l'extrait PS ne renferme que des stérols insaturés, des coumarines, des terpènes et des flavonoïdes. Les deux types de propolis analysées renferment des substances naturelles à activités antibactériennes vis-à-vis des *Bacillus cereus* et de *Candida albicans* et vis-à-vis du *Streptococcus pneumoniae*. Les résultats obtenus peuvent justifier l'utilisation de la propolis dans les pratiques médicinales contre les infections bactériennes. Ainsi que le résidu solide récupéré après extraction éthanolique de propolis pourrait être utilisée pour un traitement externe de la peau.

RÉFÉRENCES

- [1] Weam Siheri et al., 2017, « *The Chemical and Biological Properties of Propolis* », (pp.137-178), DOI:10.1007/978-3-319-59689-1_7
- [2] Özgür Eroğlu et Serdar Yuksel, 2020, « *Propolis From Past To Present* », Journal of social Humanities and administrative sciences, 6 (26): 623-629
- [3] Rhita Zbadi et al., 2018, « *Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales* », mt 2018 ; 24 (2) : 134-41 doi:10.1684/met.2018.
- [4] Awa D. et al., 2018, « *Pouvoir antioxydant et teneurs en composés phénoliques de deux espèces du genre Albertisia: Albertisia cordifolia (Mangenot & J. Miège) Forman et Albertisia scandens (Mangenot & J. Miège) Forman (Menispermaceae)* », European Scientific Journal October 2018 edition Vol.14, No.30, DOI:10.19044/esj.2018.v14n30p128
- [5] Aslı Ö. et al., 2015, « *A comparison of the activities of Greek and Turkish propolis against Paenibacillus larvae* », Journal of Apicultural Research, 53:5, 528-536, DOI: 10.3896/IBRA.1.53.5.01
- [6] Mônica Valero da Silva et al., 2018, « *A review of the potential therapeutic and cosmetic use of propolis in topical formulations* », Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 0(00), pp 001-011, November 2019, DOI: 10.7324/JAPS.2018.8801
- [7] Jose Mauricio S. et Vassya B., 2011, « *Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?* » Journal of Ethnopharmacology, Volume 133, Issue 2, 27 January 2011, Pages 253-260
- [8] Nazmi Gür et al., 2020, « *Determination of antimicrobial activity and some biochemical properties of honey and propolis in Turkish markets* », Progress in Nutrition 2020; Vol. 22, N. 3: e2020040 DOI: 10.23751/pn.v22i3.9166
- [9] Wiwekowiati et al., 2017, « *Antioxidant Activity of Apis Mellifera sp. Propolis Extract from Java (Indonesia)* », Vol. 3 Issue 5, September 2017, pages: 18~2, International Research Journal of Engineering, IT & Scientific Research, doi:10.21744/irjeis.v3i6.530
- [10] Nada Zabaïou et al. 2017, « *Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product* », Chemistry and physics of lipids, Volume 207, Part B, October 2017, Pages 214-222
- [11] Ranarivelo, Y. 2004, « *Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels* », Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.
- [12] Bruneton, J., 1999, « *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales* », Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p
- [13] Luhata P. et al, 2008, « *Étude chimique de l'espèce Jacobinia carnea* », Université de Lubumbashi.

- [14] Gurib-Fakim, A., Gueho J., 1997, « *Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan Indien* », Rapport ethnobotanique et phytochimique sur le projet PLARM, Projet FED – COI, 1990-1997.
- [15] Rizk, A. M. 1982, “*Constituents of plants growing in Qatar*”, *Fitoterapia*, 52 (2), p 35-42
- [16] Bolivar, P., Cruz-Parades C., Hernandez L. R., Juarez Z. N., Sanchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H., 2011, “*Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of Galium mexicanum*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 137 141– 147, published by Elsevier Ireland Ltd.
- [17] Dohou N. et al., 2003, “*Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, Thymelya lythroides*”, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142, 61-78.
- [18] Alilou H. et al., 2014, “*Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'Asteriscus graveolens subsp. Odorus*», *Afrique Science* 10(3) 316 - 328.
- [19] Kabran Guy Roger et al., 2011, « *CCM D'extrait Selectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel du Cancer du Sein en Côte d'Ivoire* », *European Journal of Scientific Research*, Vol.63 No.4 (2011), pp. 592-603
- [20] Mueller J.H. et Hinton J. , 1941. « *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*”, 48, 330-333
- [21] T. G. RAZAFIMANANTSOA, « *Contribution à l'étude chimique et biologique de l'espèce endémique Vernonia pectoralis Baker (Sakatavilotra)* », Mémoire de Master en Génie des Procédés Chimiques et Industriels, Ecole Supérieure Polytechnique, Université d'Antananarivo, 2016
- [22] H. LECLERC et al., 1983, « *Microbiologie générale* », 2eme edition, Paris : Doin éditeur ; 369 p.
- [23] S. Huang and al., 2014, “*Molecules*” 19, 19610–19632(2014)
- [24] A. H. Mulyati1 and al.. 2019, “*Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Ethanol Extract of Stingless Bee Propolis from Indonesia*” <https://doi.org/10.1063/5.0005567>
- [25] Magdalena Woźniak et al., 2022, « *Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland*”, *Molecules* 28:141DOI:10.3390/molecules28010141
- [26] Yousef-Beigi G. et al., 2007, “*Antibacterial and antifungal activity of Iranian propolis against Staphylococcus aureus and Candida albicans*”, 2007 Apr 15; 10(8):1343-5. doi: 10.3923/pjbs.2007.1343.1345.
- [27] Nilesh k., 2008, « *Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone*”, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 2(12), pp. 361-364
- [28] Izabela P. et Tomasz M. K., 2019, « *Antibacterial properties of propolis* », doi: 10.3390/molecules24112047